



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Lacticaseibacillus rhamnosus* ACS5 SUŞUNDAN ELDE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN ANTİKANSER VE
İMMUNOSTİMÜLATÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlayda Selcen KADIOĞLU

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

AKSARAY, 2023

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212330413 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi **İlayda Selcen KADIOĞLU** tarafından hazırlanan “*Lactcaseibacillus rhamnosus* ACS5 SUŞUNDAN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN ANTİKANSER VE İMMUNOSTİMÜLATÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 20/06/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

İlayda Selcen KADIOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim için sağladığı değerli danışmanlık ve rehberlik için değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a benden desteğini, sabrını ve anlayışını esirgemediği için teşekkür ederim. Öğretmenliğinin ve bilgeliğinin bana katkıları tarif edilemez. Danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'la çalışmak, öğrenmek ve büyümek benim için büyük bir onur ve büyük bir şanstı. Bu değerli deneyimi birlikte yaşadığımız için müteşekkirim. İlgisi, zamanı ve emeği için hocama tekrar teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'ın bu tez sürecindeki desteklerinin yanı sıra, babam Ulukan Sadi KADIOĞLU'na, her zaman varlığını hissettirdiği ve elini üstümden çekmediği için; annem Belgin BOSTAN'a, benimle bütün heyecanıma ortak olduğu için; abim Furkan Berk KADIOĞLU'na, bu yola adım atmamı sağladığı için minnettarım. Onların teşvikleri, motivasyonları ve sürekli destekleri sayesinde bu tezi başarıyla tamamladım. Onlar benim güç kaynağım oldular ve benimle birlikte bu süreci başarıyla tamamlamamı sağladılar.

Tezimin gerçekleşmesinde KBAG 120Z573 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

İlayda Selcen KADIOĞLU

AKSARAY, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	4
2.1 Kanser, Kolorektal Kanser ve Kolorektal Kanser Etiyolojisi	4
2.2 Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	5
2.3 Kolorektal Kanserin Moleküler Yolakları.....	7
2.3.1 Kromozomal instabilite yolu	8
2.3.2 Mikrosatellit instabilite yolu.....	9
2.3.3 CpG adası metilator fenotipi yolu	9
2.4 Kolorektal Kanserde Mevcut Tedaviler	10
2.5 Probiyotik Bakteriler ve Kanser	13
2.6 Probiyotik Bakteriler Olarak Laktik Asit Bakterileri	14
2.7 Probiyotik-Kanser İlişkisi.....	16
2.8 Probiyotik-İmmünomodulator İlişkisi	17
2.9 LAB'ların Aktif Bileşenleri Olarak Ekzopolisakkaritler	20
2.10 EPS'lerin Antikanser İlişkisi	21
2.11 EPS'lerin İmmunomodulator İlişkisi.....	25
2.12 Antikanser ve İmmunomodulator Aktivite Değerlendirmelerinde Kullanılan Hatlar	27
2.12.1 HT-29.....	27
2.12.2 RAW 264.7	28
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1 Antikanser Aktivite Çalışmaları	30
3.1.1 Hücre kültürü	30
3.1.1.1 HT-29 Hücrelerinin çözülmesi	30
3.1.1.2 HT-29 hücrelerinin pasajlanması	31
3.1.1.3 HT-29 hücrelerinin dondurulması.....	32
3.2 Antiproliferasyon Analizi.....	33
3.2.1 L- EPS için kullanılacak çözücünün belirlenmesi	34
3.2.2 L-EPS'nin HT-29 hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi için uygun doz aralıklarının belirlenmesi	36
3.2.3 MTT ve XTT analizleri	39
3.2.4 L929 Hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi	41
3.3 Koloni Oluşum Analizi	43
3.3.1 Apoptosis ilişkili gen, protein ekspresyonları ve hücre morfolojisi analizleri	44
3.3.1.1 RNA izolasyonu ve Real Time PCR.....	44
3.3.1.2 Western Blot analizi	49
3.3.2 Apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi	50
3.3.2.1 Hoescht 33258 ile hücre çekirdek boyaması	50
3.3.3.2 TEM analizi	50
3.4 İmmunostimulator Etki Analizleri.....	52

3.4.1 Hücre kültürü	52
3.4.2 Makrofaj proliferasyon analizi	53
3.4.3 Fagositoz aktivitesinin belirlenmesi	54
3.4.4 Nitrik oksit (NO) üretimi	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	55
4.1 Antiproliferasyon Analizi.....	55
4.1.1 L- EPS için kullanılacak çözücünün belirlenmesi	55
4.1.2 L-EPS'nin HT-29 hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi için uygun doz aralıklarının belirlenmesi	55
4.1.3 MTT ve XTT analizleri	56
4.1.4 L929 Hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi	57
4.2 Koloni Oluşum Analizi	59
4.2.1 Apoptosis ilişkili gen, protein ekspresyonları ve hücre morfolojisi analizleri	60
4.2.1.1 RNA izolasyonu ve Real Time PCR.....	60
4.2.1.2 Western Blot analizi.....	63
4.2.2 Apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi	65
4.2.2.1 Hoechst 33258 ile hücre çekirdek boyaması	65
4.2.2.2 Tem analizi.....	66
4.3 İmmunostimülatör Etki Analizi.....	66
4.3.1 Makrofaj proliferasyon analizi	67
4.3.2 Fagositoz aktivitesinin belirlenmesi	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ.....	84

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5 SUŞUNDAN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN ANTİKANSER VE İMMUNOSTİMÜLATMR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

İlayda Selcen KADIOĞLU

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

ÖZET

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) farklı alanlarda kullanım potansiyelini ortaya koymuştur. LAB tarafından üretilen EPS'ler anti-tümör, antioksidan, ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkinlikler için önemli kaynaklar olarak görülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların normal hücreler de immünotoksositeye neden olduğu ve tümör gelişim mekanizmalarını etkilediği görülmüştür. Bu nedenler, düşük yan etkili anti-tümör ilaçlarının keşfi gibi birçok çalışmanın ana hedefi haline gelmiştir. Çalışmamızda, Türkiye'nin geleneksel peynirlerinden biri olan Ayvalık Cunda Sepet Peyniri'nden izole edilen *Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS-ACS5'in insan kolon kanseri (HT-29) hücre hattında antiproliferatif etkisi, sağlıklı kontrol hattı (L929) ile karşılaştırılarak zaman bağımlı olarak değerlendirildi ve antiproliferatif etki gösterdi. Bu etki, koloni oluşumu analizi ile de doğrulandı. Apoptotik değişiklikler moleküler düzeyde qPCR ve Western blot kullanılarak incelendi. Bu değişiklikler, floresan mikroskop (Hoescht 33258) ve TEM kullanılarak nükleer ve hücrel morfoloji düzeyinde yapılan gözlemlerle de doğrulandı. Ayrıca, ilgili L-EPS'nin immunostimulator aktivitesi makrofaj hücre hattında (RAW 264.7) proliferasyon, fagositoz yeteneği ve nitrik oksit (NO) üretimi parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Proliferatif aktivitedeki artış, 'fagositoz aktivitesi ve NO üretimi analizleri' sonucu kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar önemli bulunamamıştır. Bununla birlikte, L-EPS-ACS5, makrofaj hücrelerinde immünotoksik/sitotoksik aktivite göstermedi. Tüm bu hücrel ve moleküler kanıtlar, L-EPS-ACS5'in kolorektal kanserde, sentetik antikanser ajanlarına iyi bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri (LAB), Ekzopolisakkarit (EPS), Hücre Kültürü, Antikanser, Antiproliferasyon, Koloni Oluşum, İmmunostimülatör Etki, (RAW 264.7), (HT-29)

Mayıs, 2023; 84 sayfa

M.Sc. THESIS

**INVESTIGATION OF THE ANTICANCER AND IMMUNOSTIMULATORY
EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDES OBTAINED FROM
Lactacaseibacillus rhamnosus ACS5 STRAIN IN VITRO**

İlayda Selcen KADIOĞLU

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Biotechnology**

Supervisor: Assistant Prof. Tuğçe KARADUMAN

ABSTRACT

Recent studies have revealed the potential of exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria (LAB) in different fields. EPSs produced by LAB are seen as important sources for anti-tumor, antioxidant, and immuno-stimulating activities. It has been observed that drugs used in cancer treatment cause immunotoxicity in normal cell and trigger tumor development mechanisms. These observations have become the main target of many studies, such as the discovery of anti-tumor drugs with low side effects. In our study, the antiproliferative effect of L-EPS-ACS5 obtained from *Lactacaseibacillus rhamnosus* ACS5 strain isolated from Ayvalık Cunda Sepet Cheese, one of the traditional cheeses of Turkey, on human colon cancer (HT-29) cell line, was compared with healthy control line (L929). It was evaluated as time dependent and showed antiproliferative effect. This effect was also confirmed by colony formation analysis. Apoptotic changes were examined at the molecular level using qPCR and Western blot. These changes were also confirmed by observations at the nuclear and cellular morphology level using a fluorescent microscope (Hoescht 33258) and TEM. In addition, the immunostimulatory activity of the relevant L-EPS was evaluated in terms of proliferation, phagocytosis ability and nitric oxide (NO) production parameters in the macrophage cell line (RAW 264.7). As a result of phagocytic activity and NO production analyses, the increase in proliferative activity was not found to be significant between the control and treatment groups. However, L-EPS-ACS5 did not show immunotoxic/cytotoxic activity in macrophage cells. All these cellular and molecular evidences shows that L-EPS-ACS5 may be a good alternative to synthetic anti-cancer agents in anticancer agents in colorectal cancer.

Keywords: Lactic Acid Bacteria (LAB), Exopolysaccharide (EPS), Cell Culture, Anticancer, Antiproliferation, Colony Formation, Immunostimulatory Effect, (RAW 264.7), (HT-29)

March, 2023; 84 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolorektal kanserde yaşa bağlı insidans ve mortalite oranları	7
Şekil 2.2. Kolorektal kanserin üç ana moleküler yolağı	8
Şekil 2.3. Probiyotiklerin etki mekanizması	20
Şekil 3.1. Hücrelerin tripsinizasyonu aşamasında hazırlık görüntüsü.	34
Şekil 3.2. Hücrelerin analize uygunluk durumlarının mikroskopta incelenmesine ait görüntü.	35
Şekil 3.3. Hücrelerin etüv inkübasyon görüntüsü.	37
Şekil 3.4. L-EPS'nin seri dilüsyonunun şematik gösterimi.	37
Şekil 3.5. Hücrelerde MTT inkübasyonu sonucu formazan kristalinin oluşumu.	38
Şekil 3.6. RiboEx™ protokolünde faz ayrımı.	45
Şekil 3.7. RiboEx™ protokolünde RNA pelet oluşumu.	46
Şekil 3.8. cDNA örneklerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü (A, B iki farklı koşulda gerçekleştirilen reaksiyonu işaret etmektedir).	47
Şekil 3.9. TEM örnek hazırlama sürecine ilişkin laminar flow görüntüsü.	51
Şekil 4.1. L-EPS-ACS5 ile farklı konsantrasyon ve süre aralıklarında yapılan MTT analiz sonuçlarının 5-FU ile birlikte değerlendirilmesi (HT-29) (*, ** ; P<0,05).	55
Şekil 4.2. L-EPS-ACS5'ler için belirtilen konsantrasyon ve 72. ve 96.saatlerde yapılan MTT-XTT analiz sonuçlarının 5-FU (50 µg/mL) ile birlikte değerlendirilmesi (HT-29) (*, ** ; P<0,05).	56
Şekil 4.3. (a); Farklı konsantrasyon ve sürelerde L-EPS-ACS5 ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinin hücre canlılıklarının (% kontrole göre) 5-FU ile karşılaştırılması (b); Farklı konsantrasyon ve sürelerde L-EPS-ACS5 ile inkübe edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları (% kontrole göre) (*p≤0.05).	58
Şekil 4.4. (a); L-EPS-ACS5 uygulamasının 72. saat için koloni oluşum analizi 6-well plate görüntüleri. (b); L-EPS-ACS5 uygulamalarının 72. saat için koloni oluşum analizi % canlılık sonuçları (kontrole göre).	60
Şekil 4.5. L-EPS-ACS5 uygulaması sonucu apoptotik yolda yer alan genlerde mRNA düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri (*; P< 0.05, ***; P<0.001).	62
Şekil 4.6. L-EPS-ACS5 uygulaması sonucu apoptotik yolda yer alan proteinlerdeki ekspresyon değişiklikleri (*; P< 0.05, **; P< 0.01, ***; P<0.001).	64
Şekil 4.7. L-EPS ACS5'in IC ₅₀ değerinde 72 saatlik inkübasyonları sonrasında Hoechst 33258 ile boyama görüntüleri. Oklar apoptotik çekirdekleri göstermektedir (20x,40x).	65
Şekil 4.8. L-EPS ACS5'in IC ₅₀ değerlerinde 72 saatlik inkübasyonları sonrasında hazırlanan hücre kesitlerinin farklı büyütme ölçeklerindeki TEM görüntüleri a) 6000x, b) 10000x, c) 15000x, d) 4000x, e) 8000x f) 12000x.	66
Şekil 4.9. (a) Çeşitli L-EPS-ACS5 konsantrasyonları ile muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinin hücre çoğalması. (b) Çeşitli L-EPS-ACS5 konsantrasyonlarının RAW 264.7 hücrelerinin fagositoz aktivitesi üzerindeki etkisi (c) Çeşitli konsantrasyonlarda L-EPS-ACS5 ile muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin NO üretimi (P > 0.05).	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Elde edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık değerleri.....	46
Çizelge 3.2. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri	47
Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da kullanılan primer dizileri.....	48
Çizelge 3.4. Real-Time PCR protokolüne göre reaksiyon içerikleri	48
Çizelge 3.5. Real-Time PCR koşulları.....	49
Çizelge 4.1. L-EPS-ACS5 için 72. ve 96. saatlerdeki IC50 değerleri (mg/mL).....	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

ASTM	American Society for Testing and Materials
CBp	Pirolitik Karbon Siyahı
CR	Neopren Kauçuk - Chloroprene Rubber
DMA	Dinamik Mekanik Analiz
E'	Depolama Modülü
E''	Kayıp Modülü
EPDM	Ethylene Propylene Diene Monomer Kauçuk
FEE	Hızlı Ekstrüzyon Siyahı
GPF	Yumuşak Fırın Siyahı
HAF	Yüksek Aşınma Fırın Siyahı
IIR	Butil Kauçuk - Isobutylene Isoprene Rubber
ISAF	Orta Aşınma Fırın Siyahı
M_H	Maksimum Tork
M_L	Minumum Tork
NBR	Nitril Kauçuk
NR	Doğal Kauçuk - Natural Rubber
Op	Pirolitik Yağ
ÖTL	Ömrünü Tamamlamış Lastik
Phr	Part Per Hundred Rubber - Yüz Birim Kauçukta Ağırlıkça
SBR	Stiren Butadiene Kauçuk - Styrene Butadine Rubber
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi
SI	Silikon Kauçuk
TGA	Termogravimetrik Analiz
°C	Santigrat
η	Verim
ρ	Yoğunluk
μ	Dinamik Vizkozite
γ	Politropik katsayı
ω	Özgül nem
ε	Ekserji verimi
Δ	Fark

1. GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli ve dengeli miktarda alındıklarında, kullanıcı sağlığını olumlu yönde etkileyen gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır (Singh vd., 2022; Yadav vd., 2022). İnsan gastrointestinal sistemi üzerine faydalı etkileri olduğu bilinen en önemli probiyotiklerden kabul edilen laktik asit bakterileri (LAB), tüketim için uzun süreli güvenli kullanım geçmişleri nedeniyle, genellikle güvenli organizmalar (GRAS) olarak kabul edilmektedir (Ezdini vd., 2022; Saha ve Saroj, 2022), bununla birlikte bu organizmalar geniş çeşitlilikte ürettikleri ekzopolisakkaritler (EPS) ile de dikkat çekmektedirler (Oleksy ve Klewicka, 2016). EPS üreten LAB suşları, gıda özelliklerini iyileştirme yeteneklerinden dolayı yoğurt ve peynir gibi fermente ürünlerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Harris vd., 2018; Tiwari vd., 2021; Torino vd., 2015). Ayrıca, EPS'lerin kuruma, fagositoz, protozoal predasyon, faj atakları, antibiyotikler veya toksik bileşenler gibi kimyasal; ozmotik stres gibi fiziksel streslere karşı koruyucu fonksiyonlarının da olabileceği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra EPS'lerin hücre tanıma, yüzeylere yapışma gibi özelliklere sahip olduğuna ve biyofilm oluşumunda da rol aldığına işaret eden çalışmalar mevcuttur. EPS'ler tüm bu eşsiz özellikleri ile anti-kanser, anti-ülser, antioksidan, kolesterol düşürücü ve immünstimülatör aktivite çalışmalarının önemli bir kaynak molekülü olarak kullanılmaktadır (Abdalla vd., 2021; Hussain vd., 2017; Jurášková vd., 2022; Mohd Nadzir vd., 2021).

Kanser kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen, bu hücrelerin sayısındaki artışın tetiklediği anormal tipte bir doku büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Hanahan, 2022). Kolorektal kanser ise dünyada yaygın olarak görülen kanser tiplerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) istatistiklerine göre, kolorektal kanser (CRC), dünya çapında artan % 60 yeni vaka yükü ve 2030 yılına kadar yaklaşık 1,1 milyon ölümle hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık görülen üçüncü kanserdir (Arnold vd., 2017). CRC'li hastalarda (evre I-III) kanser uzak organlara yayılmamışsa cerrahi ilk küratif modalite seçeneğidir (Filip vd., 2020). Bununla birlikte, evre III hastalığı olan hastalar için tedavi genellikle adjuvan kemoterapiyi (Oki vd., 2022; Taieb ve Gallois, 2020) bazen beyin veya kemik gibi belirli metastatik bölgeler için radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde içerir (Johdi ve Sukor, 2020). Metastatik CRC'li hastalar için kemoterapi standart tedavi yöntemidir. Kemoterapi uygulamasında

kullanılan anti-kanser ajanlar güçlü bir etkinliğe sahip olmakla birlikte, mide bulantısı, kusma ve yorgunluk gibi yan etkiler hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir (Biller ve Schrag, 2021). Çünkü bu ilaçların önemli bir kısmı halen normal hücrelere de sitotoksiktir ve beraberinde iyileşme sürecini yavaşlatan ve tümör gelişim mekanizmalarını da etkileyen immüntoksisiteye neden olmaktadır (Wan vd., 2021). Bu nedenle immün sistem üzerine düşük yan etkisi olan yeni anti-kanser ilaçların keşfedilmesi ve tanımlanması birçok immünofarmakoloji çalışmasının temel amacı haline gelmiştir (Chavda vd., 2021; Kifle vd., 2021). LAB gibi güvenli, doğal kaynaklardan elde edilen EPS'lerin, sentetik anti-kanser ajanlarına göre iyi bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Angelin ve Kavitha, 2020).

LAB EPS'lerinin çeşitli biyolojik aktiviteleri bildirilmiş olmasına rağmen, bu EPS'lerin immünomodülatör aktiviteleri çok fazla dikkat çekmektedir. Son zamanlarda, EPS'lerin fonksiyonel mekanizmalarını inceleyen bir dizi çalışma, EPS'lerin immünomodülatör aktivitelerinden hareketle tümör gelişimini engelleyici ve bağışıklık destekleyici olarak kullanımlarına dair önemli bilgiler sunmuştur (Chen vd., 2022; Wang vd., 2018; Yang vd., 2013; Yang vd., 2014; You vd., 2020). Bu bilgilerin yanı sıra, vücudun doğal bağışıklık sistemi bozuklukları da organizmalarda yaşlanma ve obezite ile ilişkilendirilmiştir, bu durum EPS'lerin, ilgili durumların tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Painter vd., 2015; Soria-Valles vd., 2017). Yapılan çalışmalar, birçok LAB EPS'sinin, T/B-lenfositlerin proliferasyonunu uyarak, makrofajların fagositik aktivitesini geliştirerek ve doğal öldürücülerin (NK hücreleri) tümör öldürücü aktivitesini artırarak, antijenlere karşı spesifik hücrel ve humoral bağışıklık tepkilerini indüklemeye gibi güçlü immün sistemi uyarıcı aktivitelere sahip olduğu göstermiştir (Chen vd., 2022; Liu vd., 2017; Makino vd., 2016; Sheng vd., 2022; Wang vd., 2018). Doğuştan gelen bağışıklık (innate) ve adaptif bağışıklık arasında bir arayüz görevi gören makrofajlar, konak savunma sistemlerinde çok önemli bir rol oynar. Aktive makrofajların, ksenobiyotikleri nötralize edebildiği, istilacı patojenik mikroorganizmaları ve kanser hücrelerini fagositoz yoluyla doğrudan ve dolaylı olarak proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6 ve IL-12), anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-10) ve sitotoksik moleküllerin (nitrik oksit, NO) salgılanmasını indükleyerek öldürebildiği gösterilmiştir (Kwon vd., 2020; Wang vd., 2016).

Lactocaseibacillus rhamnosus (*L. rahmnosus*), LAB'nin en yüksek EPS üreten suşları arasında sınıflandırılmaktadır (Péant vd., 2005). Esas olarak glikoz ve galaktozdan oluşan, bununla birlikte farklı verim, kimyasal bileşimler ve yapılar da çeşitli heteropolimerler üretebilirler (Górska-Frączek vd., 2011; Konieczna vd., 2018). *L. rhamnosus* EPS'leri, probiyotik potansiyelleri ve antikanser, bağışıklık modülasyonu ve bağışıklık sisteminin uyarılması ve antioksidan özellikleri gibi çeşitli sağlık yararları nedeniyle araştırmacıları kendine çekmiştir (Chabot vd., 2001; Riaz Rajoka vd., 2018; Shao vd., 2014).

Çalışmamızda Türkiye'nin geleneksel peynirlerinden olan Ayvalık Cunda Sepet Peynirinden izole edilen *L. rahmnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS fraksiyonunun (L-EPS-ACS5) insan kolorektal kanser, HT-29 hücre hattında antikanser etkisi belirlenmiş ve bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Bunun yanı sıra ilgili L-EPS aracılı immünstimülatör aktivite, RAW 264.7 hücrelerinde, çoğalma ve fagositoz kabiliyeti, nitrik oksit üretimi parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1.Kanser, Kolorektal Kanser ve Kolorektal Kanser Etyolojisi

Kanser olarak bilinen bir dizi bozukluk, hücreler kontrolsüz ve sürekli olarak bölündüğünde ortaya çıkar. Birden fazla evrimsel olarak korunmuş hücre döngüsü kontrol mekanizması, genetik olarak özdeş iki hücrenin oluşumunu garanti etmek için hücre bölünmesini yakından düzenler. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları, hücre bölünmesi sırasında genetik hataların birikmesini ve yayılmasını durdurmak için DNA izleme sistemleri olarak işlev görür. Kontrol noktaları, hücre döngüsünün seyrini durdurabilir veya onarılamaz DNA hasarı durumunda hücre döngüsünden çıkmayı veya ölümü tetikleyebilir. Bu mekanizmanın yokluğu organizmayı kansere sürükler (Matthews vd., 2022).

Kalın bağırsak (kolon), kolon kanserinin tipik olarak kendini ilk gösterdiği yer olarak tanımlanmaktadır. Kolon, sindirim sisteminin son kısmıdır ve burada görülen kansere kolon kanseri, rektumdaki kansere rektum kanseri denir. Bu organlardan herhangi birini etkileyen kanserler kolorektal kanser (KRK) olarak adlandırılmaktadır. Sonuç olarak kolorektal kanser, yalnızca kolonu veya rektumu etkileyen ve kolonun anormal derecede yüksek hızlı glandüler epitel hücre proliferasyonu ile ortaya çıkan bir hastalıktır (Hossain vd., 2022).

KRK'nin ortaya çıkmasında genetik ve epigenetik faktörler etki göstermektedir. KRK'nin oluşumu; başlangıç, gelişme ve ilerleme aşamalarını içerir. Başlangıç, bağırsak mukozasının etkilenen epitel hücrelerini sonraki süreçte neoplastik dönüşüme yatkın hale getiren geri dönüşü olmayan genetik hasarı içerir. Gelişme aşamasında, rejenere olan vücut hücrelerinin normal siklusu olan büyüme, bölünme ve ölüm sürecinin kontrolden çıkması söz konusudur. Hücreler ölmeleri gerektiğinde bile büyümeye ve bölünmeye devam eder. Bu şekilde kolon ve rektumu kaplayan hücreler kontrolsüz çoğaldığında, kolorektal kanser gelişimi için zemin oluşmuş olur. Bu kontrolsüz çoğalan hücreler, ilerleme aşamasında kötü huylu kanser hücrelerine dönüşür, ayrıca agresif özellikler ve metastatik potansiyel kazanır. Çoğu KRK'nin karsinogenez aşamasının önemli bir parçası, polip (lümeninde büyüyen kolon mukozasında anormal büyüme olarak tanımlanır) olarak tanımlanan iyi huylu bir öncü lezyonun varlığıdır. Kalın bağırsak lümeninde tanımlanan diğer bir lezyon türü, çoğu

kanserin doğrudan öncüsü olan adenomatöz polipler ve serrated (tırtıklı) poliplerdir. KRK karsinogenezi süreci oldukça yavaştır, hafif bir iltihaplanma ile başlar, daha sonra epitelde adenomatöz poliplerin gelişimi ve son olarak adenokarsinom gelişimi oluşur. Bununla birlikte, çoğu KRK, küçük prekanseröz (adenomatöz veya tırtıklı) polipler olarak başlar. Bu polipler genellikle yavaş büyür ve büyük veya kanserli olana kadar (bu süreç 10 yıldan fazla sürebilir) semptomlara neden olmaz. Bu, kanserin gelişiminden önce bu kanser öncesi polip aşamasında tespit ve cerrahi müdahale fırsatına izin verir. Ancak polip hücreleri (dışkıda kanama ve kabızlık gibi semptomlar dışında) çoğunlukla non-semptomatik olduğu için, tanılama erken durumda gerçekleşmeyebilir (Sawicki vd., 2021).

2.2 Kolorektal Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

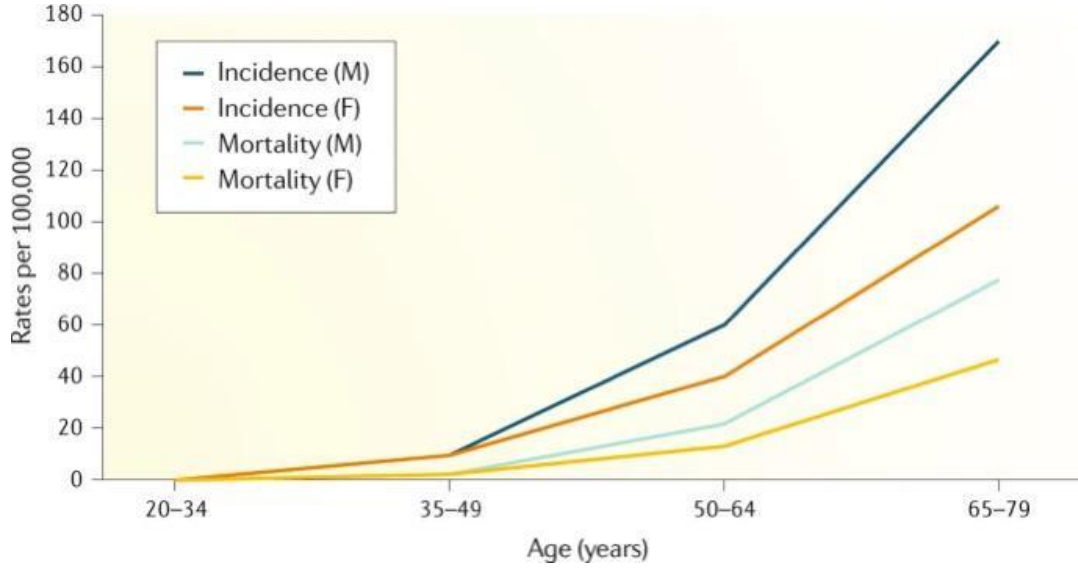
GLOBOCAN verilerine göre, 2020'de dünya üzerinde tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve 10 milyon insan kansere bağlı olarak hayatını kaybetmiştir (Hossain vd., 2022).

KRK, erkeklerde en sık görülen üçüncü, kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. 2020'de 1,9 milyondan fazla yeni vaka olduğu bildirilmiştir. Bu verilerle, KRK, kansere bağlı ölümlerin en yaygın ikinci nedenidir ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık 935.000'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Küresel olarak insidansı artan ve tüm kanser tanılarının %11'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, dünyanın çeşitli ülkeleri arasında KRK insidansı ve mortalitesinde geniş bir coğrafi varyasyon vardır. KRK insidansı ve ölüm oranındaki en önemli artışın, “batı” yaşam tarzını benimseyen orta ve yüksek insani gelişme indeksi olan ülkelerde meydana geldiği kabul edilmiştir (Sawicki vd., 2021). Tüm bu bilgilerle küresel kolon kanser yükünün 2030'a kadar %60 artarak 2.2 milyon yeni vakaya ve 1.1 milyon ölüme ulaşacağı beklenmektedir (Arnold vd., 2017). Genel olarak, sanayileşme ve ekonomik büyüme gibi gelişmelerin tümü KRK için önemli risk faktörleri olan, batılı bir beslenme düzenine, hareketsiz yaşam tarzına ve artan obeziteye yol açmaktadır. Bu nedenle, ülkelerin batılaşmasını, KRK insidans oranlarında bir artış takip etme eğilimindedir. Bu örüntü, daha yüksek bir insani gelişme indeksi, ortalama yaşam süresi, eğitim ve gelir gibi bileşik faktörlerle, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde gözlenen daha yüksek KRK insidans oranları tarafından desteklenmektedir. Yaş standardizasyonu yapılmış, en yüksek ve en düşük insidans oranları arasında ‘Macaristan’da yılda 100.000 kişide

51,2 vaka' ve 'Gambiya'da yılda 100.000 kişide 1.1 vaka' 45 kattan fazla fark bulunmaktadır. Kanseri yaşa bağlı insidans gösteren bir hastalık olduğundan, KKR gelişimi ve ölüm oranları özellikle aile öyküsü bulunan durumlarda 50 yaşından sonra hızla artar ve küresel vakaların tahmini %90'ı ve ölümler bu yaştan sonra gerçekleşir. Yaşa göre oranlar erkeklerde kadınlardan daha yüksektir ve insidans (yılda 100.000 kişi başına 23,6'ya karşı 16,3 vaka) ve ölüm (yılda 100.000 kişi başına 10,8'e karşı 7,2 ölüm) için yaklaşık sırasıyla 1,4 kat ve 1,5 kat fark verir, 50 yaşından sonra fark belirginleşir (Keum ve Giovannucci, 2019).

KKR'nın sporadik, genetik ve kolit ile ilişkili olmak üzere üç ana alt tipi bulunmaktadır (Hossain vd., 2022). Ancak KKR'nın gelişiminde birçok faktör rol oynamaktadır. Bireylerin (veya akrabalarının) kanser, kolon polip öyküsü, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, diabetes mellitus veya kolesistektomi geçirmesi durumunda KKR için yüksek risk altında olduğu belirtilmiştir. Yaşam tarzı gibi faktörler de KKR etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. Araştırmalar, aşırı kilo ve obezitenin, fiziksel hareketsizliğin, sigara içmenin, alkol tüketiminin ve uygun olmayan beslenme modellerinin (lif, meyve, sebze, kalsiyum ve diyet ürünleri düşük, kırmızı ve işlenmiş et oranı yüksek bir diyet) KKR riskini artırdığını saptamıştır. Ayrıca bağırsak mikrobiyomu, yaş, cinsiyet ve ırk ile sosyoekonomik farklılıkların da kolorektal kanser riskini etkilediği keşfedilmiştir (Sawicki vd., 2021).

Özetle, KKR için birçok değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri bulunmaktadır. Kalıtsal yapı, etnik köken, yaş ve cinsiyet değiştirilemeyen risk faktörleri arasında kabul edilmekle birlikte, beslenme, vücut ve abdominal yağ oranı, fiziksel aktivite, tütün kullanımı, kullanılan ilaçlar değiştirilebilir risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir. Değiştirilebilen risk faktörlerinin önemini gösteren çalışmalar artmakla birlikte henüz bir netlik kazanmamıştır (URL-1).



Şekil 2.1. Kolorektal kanserde yaşa bağlı insidans ve mortalite oranları (Keum ve Giovannucci, 2019).

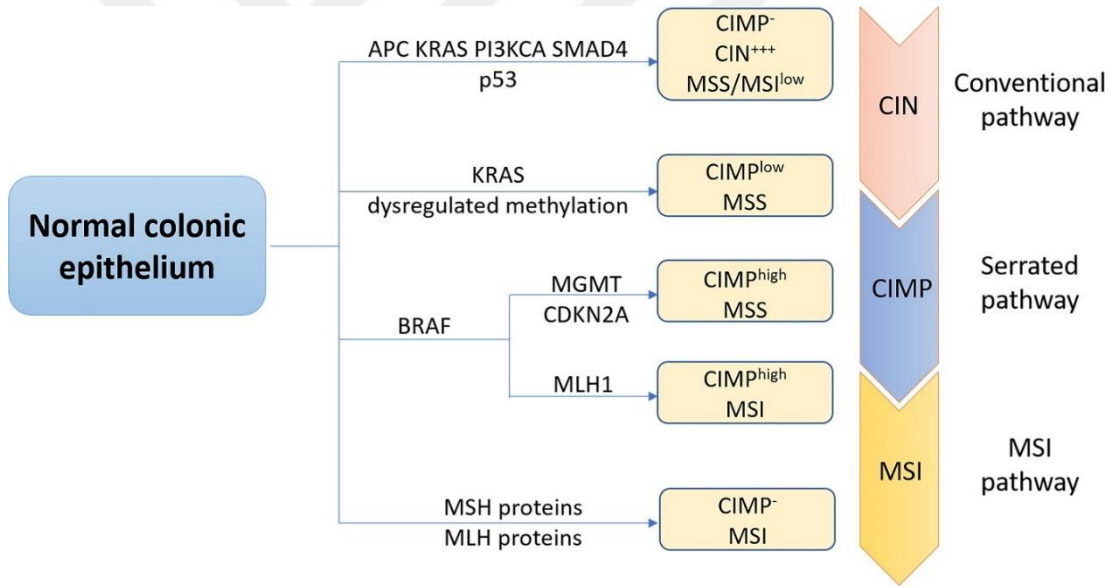
2.3 Kolorektal Kanserin Moleküler Yolakları

KRK tanısı alan kişilerin %10-20'sinin ailesinde KRK öyküsü bulunmaktadır (Dekker vd., 2019; URL-1). Kalıtsal kanserler tüm KRK'ların %5'ini oluşturmakta ve allelde oluşan nokta mutasyonları gene bağlı olarak tümör hücresi oluşumunu etkileyebilmektedir (Mármol vd., 2017). Kalıtsal KRK; ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal polipozis dışı KRK (hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) olarak iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP)'ta kolonda malign polip oluşumu söz konusudur. Kalıtsal polipozis dışı KRK ise deoksiribonükleik asit (DNA) tamir mekanizmalarındaki bozukluklarla ilintilidir (Mármol vd., 2017). Genel olarak kalıtsallık sonucu gözlemlenen KRK türleri ya tümör baskılayıcı adenomatozis polipozis koli (adenomatous polyposis coli (APC) geninde mutasyon sonucu 40 yaştan önce gözlemlenmekte ya da 40'lı yaşların ortasında DNA tamir genlerindeki mutasyon sonucu gözlemlenebilmektedir (URL-2; URL-3). alıtımın dışında tek gen mutasyonu gibi genomla ilintili değişiklikler de kolorektal kanser gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Dekker vd., 2019).

Son yıllarda KRK'nın, farklı fenotiplere yol açan farklı moleküler yollara sahip heterojen bir hastalık olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (Huang ve Yang, 2022; Worthley ve Leggett, 2010). KRK, normal mukozanın adenoma ve daha sonra karsinoma dönüşümüne yol açan bir dizi olayla gelişir. Genomik instabilite bu

dönüşüm sürecinin ayrılmaz bir parçasıdır (Al-Sohaily vd., 2012; Huang ve Yang, 2022). Bahsedildiği gibi, KRK gelişimi, ardışık mutasyonların dahil olduğu karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozu ve hayatta kalmayı düzenleyen; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Wingless-bağlantılı entegrasyon bölgesi (Wnt)/ β -katenin, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), transforming büyüme faktörü- β (TGF)- β , Nörojenik lokus notch homolog proteini (Notch) ve nükleer faktör (NF)- κ B gibi hücresel sinyal yolları, CRC başlangıcında yer alır (Huang ve Yang, 2022; Koveitypour vd., 2019).

Bugüne kadar üç farklı moleküler yol tanınmıştır. Bunlar kromozomal instabilite (CIN) yolu, mikrosatellit instabilite (MSI) yolu ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) yoludur. Bu yollar birbirini dışlamaz, bazı tümörler birden fazla yolun özelliklerini sergiler (Al-Sohaily vd., 2012; Huang ve Yang, 2022).



Şekil 2.2. Kolorektal kanserin üç ana moleküler yolağı (Huang ve Yang, 2022).

2.3.1 Kromozomal instabilite yolu

Kromozom instabilite (CIN) yolu, sporadik kolorektal tümörlerin %65 ila %70'inde gözlenir. CIN yolu tümörleri, tipik olarak on yıllar boyunca yavaş yavaş gelişir. Ana özelliği, anöploidi, delesyonlar, eklemeler, amplifikasyonlar veya heterozigotluk kaybının neden olduğu çok sayıda somatik kopya numarası değişikliğidir (Al-Sohaily vd., 2012). Bu kromozomal anormalliklere şunlar neden olur:

CIN tümörlerinin yaklaşık %80'inde kolorektal tümörigenezde en erken genetik olay olarak kabul edilen adenomatöz polipozis koli geninin (APC) mutasyonu görülür. Çoğu CIN tümörlerinde bağırsak epitel hücre proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisi olan Wnt yolunun aktivasyonuna rastlanmaktadır. CIN tümörlerinin yaklaşık %60'ında DNA onarımını ve oksidatif strese hücre yanıtlarını düzenleyen TP53 genindeki inaktive edici mutasyonlar vardır. Epidermal büyüme faktörü reseptör yolu da dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörü sinyal yollarının bir bileşeni olan KRAS'ta aktive edici mutasyonlar da tanımlanmıştır. Ayrıca hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlemeye yardımcı olan PIK3CA'daki mutasyonlar da raporlanmıştır (Worthley ve Leggett, 2010).

2.3.2 Mikrosatellit instabilite yolu

Mikrosatellit instabilite (MSI) fenotipine sahip tümörlerdeki hücreler, yanlış eşleşmiş (mismatched) DNA'yı uygun şekilde tespit edip onarmaz, bu nedenle mutasyonlarını sürdürür, çoğaltır ve ek mutasyonlar kazanırlar. Bu hipermutasyon fenotipi, sporadik kolorektal tümörlerin yaklaşık %15'inde ve en sık görülen KRK sendromu olan Lynch sendromlu hastalarda ortaya çıkan kolorektal tümörlerin neredeyse tamamında gözlenir (Al-Sohaily vd., 2012).

APC mutasyonları MSI tümörlerinin bir kısmında bulunur, bu nedenle adenom oluşumunu başlatan olay MSI ve CIN tümörleri tarafından paylaşılabilir. Bununla birlikte, MSI tümörlerinin bir alt kümesi, başlatıcı bir BRAF mutasyonu nedeniyle gelişir ve bu tür tümörler, MSI ve tırtıklı yolakların özelliklerini paylaşır. Hipermutasyon nedeniyle, yüksek MSI seviyelerine sahip tümörlerde KRK bir ila üç yıl içinde gelişir (Farooqi vd., 2019).

2.3.3 CpG adası metilatör fenotipi yolu

Epigenetik değişiklikler, o belirli genin DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonundaki veya işlevindeki değişiklikleri ifade eder. İnsanlarda epigenetik değişikliklere genellikle DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları neden olur. DNA metilasyonu genellikle 5'-CG-3' (CpG) dinükleotidinde meydana gelir. Gen promotör bölgesinin metilasyonu, gen susturma ile sonuçlanır, dolayısıyla tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı için alternatif bir mekanizma sağlar. Kolorektal

karsinogeneizde yer alan APC, MCC, MLH1, MGMT gibi genlerin, DNA hipermetilasyonu ile susturulduğu bulunmuştur; sigara ve ileri yaş gibi çevresel faktörlerin artan metilasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Al-Sohaily vd., 2012).

Görüldüğü gibi, genetik ve epigenetik değişiklikler, hücrel metabolizma, proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve apoptozda yer alan korunmuş sinyal yollarını (JAK / STAT, TGF- β / SMAD, Notch, WNT / β Katenin, SHH/GLI ve p53 gibi sinyal yolları) düzensizleştirmeye çalışır. Kolorektal karsinogenezin moleküler temelini anlamak, KRK'nin hem prognozu hem de tedavisinde önemli sonuçlara sahiptir. Tarama ve gözetim protokollerinin optimize edilmesi, hastalık aşamasının daha iyi değerlendirilmesi ve tümörlerin patolojik ve moleküler özelliklerine dayanan tedavinin bireyselleştirilmesi sonuçları iyileştirebilir (Farooqi vd., 2019).

2.4 Kolorektal Kanserde Mevcut Tedaviler

KRK, bağırsakta lokalize olduğunda yüksek oranda tedavi olabilen bir hastalıktır. Cerrahi operasyon birincil tedavi şeklidir ve hastaların yaklaşık %50' sinde iyileşme ile sonuçlanır. Ameliyat sonrası tekrar tümör oluşumu önemli bir sorundur ve genellikle kolon kanserinden ölümlerin esas nedenidir (Brown vd., 2019). KRK tedavisi, görüntüleme, cerrahi teknikler ve kemoterapideki gelişmeler de dahil olmak üzere son yıllarda hızla ilerlemiştir. Bununla birlikte, tedavi sonuçlarının tümör spesifik özelliklere göre büyük ölçüde değiştiği giderek daha net ortaya konmaktadır (Siegel vd., 2017). Önleme ve tedavi politikalarının planlanması için kanser ile ilgili çalışmaların yapılması ve mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. WHO ve IARC insanlarda kanserin sebepleri ve karsinogenez mekanizmalarının belirlendiği çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ve konu ile ilgili çalışmalar yapılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır (URL-4). Geleneksel tedavi yöntemlerinin yanında çeşitli biyolojik aktiviteleri sayesinde fonksiyonel besin bileşenleri de tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırmak ve yan etkilerinin azaltılması amacıyla yeni bir tedavi yaklaşımı olarak günümüzde yerini almaktadır (Mármol vd., 2017).

KRK'da kullanılacak tedavi yöntemleri hastalığın derecesi ile ilişkilidir ve tümör-nod-metastaz (TNM) sınıflaması baz alınarak multidisipliner bir ekiple tedaviye karar verilmektedir (Brown vd., 2019; URL-1). KRK'da moleküler bozukluklar ve hastalığın klinikopatolojik özelliklerinin bilinmesi tedavi yönetiminin daha iyi

yapılabilmesine yardımcı olmaktadır (Sakanashi vd., 2019). Endoskopik rezeksiyon, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, radyofrekans ablasyonu, kriyocerrahi kolorektal kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemlerindendir (Brown vd., 2019; Dekker vd., 2019). Bu tedavi yöntemlerinin yanında çeşitli alternatif tedavi yöntemleri (antiinflamatuvar ilaçlar, probiyotikler, metal bazlı ilaçlar (platinyum ve altın) ve fonksiyonel besinler kolorektal kanser tedavisinde kullanılan yeni tedavi yaklaşımlarındandır (Mármol vd., 2017). Tüm tedavi yöntemlerindeki öncelikli amaç tümör hücresinin apoptozunu sağlamaktır (Sakanashi vd., 2019). Ancak tedavi sonucunda kanser hücresi apoptoza gitmek yerine kendi proliferatif yeteneklerini durdurarak hücre sel senesense de gidebilmektedir (Sakanashi vd., 2019).

Genel olarak kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmeyi hedef alan ilaçları temsil eder. Her ilaç belirli bir kansere karşı etki gösterir ve belirli dozlarda ve aralıklarda verilir. Kanser hücrelerinin lenf bezlerine veya diğer organlara yayıldığı ilerlemiş kolorektal kanserler için kemoterapi uygulaması mevcuttur. Günümüz kemoterapisi, tek ajanlı tedaviyi öncelikle floropirimidin (5-FU) ve oksaliptatin (OX), irinotekan (IRI) ve kapesitabin (CAP, XELODA veya XEL) dahil olmak üzere çoklu ajan rejimlerini barındırır. FOLFOX (5-FU + OX), FOXFIRI (5-FU + IRI), XELOX veya CAPOX (CAP + OX) ve CAPIRI (CAP + OX) kombine tedavi rejimleri, birinci basamak tedavide temel yaklaşımlar olmayı sürdürmektedir (Xie vd., 2020).

KRK, karaciğer veya akciğerler gibi öteki organlara metastaz yaptığında, yayıldığında birincil kemoterapi kullanılır. Cerrahi uygulama çoğu zaman bu durumlarda kanseri bitiremediğinden, kemoterapi büyük ihtimalle tümör nodüllerini küçülterek, belirtileri azaltabilir ve hastanın yaşam süresini uzatabilir. Neo-adjuvan kemoterapi, bir takım rektum kanserlerinde, tümörün küçültülmesi ve cerrahın kolaylıkla ve düzgünce çıkarabilmesini sağlamak amacıyla ameliyat öncesi verilir. Daha sonrasında hasta çoğunlukla kemoterapi ile birlikte radyasyon tedavisi görmeye devam eder. Mümkün durumlarda, tümör ameliyatla alındıktan sonra adjuvan kemoterapi uygulanır. Ameliyat bütün kanser hücrelerini öldüremeyebilir ve kimi hücreler lenf düğümlerinde veya diğer organlarda kalabilir. Adjuvan kemoterapi, geride kalan kanser hücrelerini öldürmek için kullanılır (Xie vd., 2020).

KRK tedavisi amacıyla yeni geliştirilmiş immünoterapi bir hastanın kanser hücrelerine karşı olan tepkisini çoğaltıp arttırarak daha efektif bir savunmayla savaşmayı

sağlamaktır. İmmünoterapi iki çeşittir. Aktif immünoterapi, hastanın bağışıklık sistemini uyarmayı hedefler. Hastanın antikorları, kanser hücrelerindeki anormal bir bileşeni tespit etmesi ve sonrasında bu hücreleri spesifik olarak ortadan kaldırması amacıyla yapılır. Kolorektal kansere tedavisine yönelik aktif immünoterapi günümüzde araştırılmaktadır. Pasif immünoterapi, vücudun kendi antikorlarını kopyalamak hedeflenerek laboratuvarında yapılır. Pasif immünoterapötik tedaviler, hastaların savunma sistemini hastalıkla mücadelesi için indüklemeyiz. Tersine, bu insan yapımı antikorlar, kanser hücrelerinin vücudun doğal bağışıklık tepkisinden kaçmasından korumak için KRK hücrelerinde bulunan dedike yapıları amaçlar (Lichtenstern vd., 2020).

Sonuç olarak, KRK'li (evre I-III) hastalarda kanser uzak organlara yayılmamışsa cerrahi ilk küratif modalite seçeneğidir. Bununla birlikte, evre III hastalığı olan hastalar için tedavi genellikle adjuvan kemoterapiyi bazen beyin veya kemik gibi belirli metastatik bölgeler için radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde içerir. Metastatik KRK'lı hastalar için kemoterapi standart tedavi yöntemidir. Kemoterapi uygulamasında kullanılan anti-kanser ajanlar güçlü bir etkinliğe sahip olmakla birlikte, mide bulantısı, kusma ve yorgunluk gibi yan etkiler hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Aşağıdakilerden dolayı kolorektal kanser tedavisi için güvenli yöntemlerin araştırılması hala öncelikli bir hedeftir:

1. KRK hastalarında düşük kan hücresi sayısı gibi kemoterapi ilaçlarının istenmeyen yan etkileri,
2. Göz problemleri,
3. Saç dökülmesi,
4. Ağız yaralarının yanı sıra bu ilaçlara karşı hızlı direnç gelişimi (Xie vd., 2020).

Çünkü bu ilaçların önemli bir kısmı halen normal hücrelere de sitotoksiktir ve beraberinde iyileşme sürecini yavaşlatan ve tümör gelişim mekanizmalarını da etkileyen immünotoksisiteye neden olmaktadır. Bu nedenle immün sistem üzerine düşük yan etkisi olan yeni anti-tümör ilaçların keşfedilmesi ve tanımlanması birçok immünofarmakoloji çalışmasının temel amacı haline gelmiştir. Daha az yan etkiye sahip en önemli doğal anti-tümör ilaç kaynaklarından biri, mikroorganizmaların (LAB vb.,) ekstrakte edilen ekzopolisakkaritleridir (EPS'ler). LAB gibi güvenli, doğal

kaynaklardan elde edilen EPS'lerin, sentetik anti-kanser ajanlarına göre iyi bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Angelin ve Kavitha, 2020).

2.5 Probiyotik Bakteriler ve Kanser

Vücudun belirli bölgelerinde normal hücrelerin DNA onarım sisteminde ya da vücudun apoptoz sisteminin bozulması sonucunda ortaya çıkan bir hastalık olan kanser, insan ölümlerinin en önemli nedenlerinden birisidir. Kanserde halen en efektif ve etkili tedavi, cerrahi yaklaşımlardır; fakat bunun yanı sıra; kemoterapi, radyoterapi gibi yorucu ve yan etkiye sahip yöntemler de bulunmaktadır. Bu yöntemlerin yan etkileri nedeniyle alternatif tedavi yöntem arayışları günümüzde devam etmektedir. Bu arayışların içerisinde en umut vaad eden mekanizmalardan birisi de probiyotik mekanizmasıdır (Biloo, 2006; H.-S. Kim vd., 2006). Bu mekanizmada probiyotik bakteriler (*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Roseobacter*, *Pseudomonas* gibi) ve probiyotik mantarlar (*Aspergillus oryzae* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi) gibi organizmalar bulunmaktadır (Kuebutornye vd., 2019). Canlıların bağışıklık tepkisini artırmak ve hastalıklara olan direnci çoğaltmak için bu probiyotiklerden yararlanılmaktadır. Ek olarak, probiyotikler, bağırsak morfolojisini ve bağırsaktaki yararlı mikroorganizma popülasyonunu iyileştirip istenilen düzeylere getirerek, besin emiliminin ve diyetten faydalanmayı artırmaya destek olan sindirim enzimlerinin aktivitelerinin çoğalmasını sağlayabilen organizmalardır (El-Saadony vd., 2021; Yılmaz vd., 2022).

İnsan mukozasında ve sindirim sisteminde yer alan bu bakteriler, uygun kullanım koşullarında sindirim sistemi ve insan sağlığına faydalı rol oynamaktadırlar. İnsan bağırsaklarının doğal flora üyeleri olan bakteriler, mikroflorayı korurken zararlı mikroorganizmaların da gelişmesine engel olurlar. Probiyotik bakteriler laktik asit üretebilen bakterilerdir, bu özellikleri sayesinde koloniler oluşturarak patojen bakterilerin varlıklarını engelleyebilirler. Laktik asit bakterileri (LAB) gastrointestinal sistem içerisinde bağırsağa kadar hayatta kalabildikleri için sıklıkla kullanılmaktadırlar. LAB türleri arasında en yaygın kullanılanlar ise *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleridir (Biloo, 2006; Kim vd., 2006).

Kısaca probiyotik bakterilerin kolorektal kanser riskini azaltmada yararlı bir etkiye sahip olabileceğini gösteren kanıtlar vardır. Kolorektal kanser, dünya çapında üçüncü

en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir. Bunun yanında probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde sağlığa faydalı olabilen canlı mikroorganizmalardır. Yoğurt, kefir, lahana turşusu gibi fermente gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. Probiyotiklerin, sindirimi iyileştirmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve iltihaplanmayı azaltmak da dahil olmak üzere bir dizi sağlık yararına sahip olduğu gösterilmiştir.

Birçok çalışma, probiyotikler ve kolorektal kanser arasındaki potansiyel ilişkiyi araştırmıştır. Bazı çalışmalar, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi belirli probiyotik bakteri suşlarının kolonda anti-kanserojen etkilere sahip olabileceğini öne sürdü. Bu bakteriler, sağlıklı bir bağırsak bakteri dengesinin korunmasına ve iltihaplanmanın azaltılmasına yardımcı olabilir, bu da kanserli hücrelerin gelişimini önlemeye yardımcı olabilir.

Ek olarak, araştırmalar, probiyotik tüketmenin bağırsak sağlığını iyileştirerek ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemeye yardımcı olabilecek kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini teşvik ederek kolon kanseri riskini azaltabileceğini bulmuştur (Citronberg vd., 2013). Bununla birlikte, probiyotikler ve kolorektal kanser arasındaki ilişkinin hala devam eden bir araştırma alanı olduğunu ve kolorektal kanseri önleme ve tedavi etmede probiyotiklerin potansiyel faydalarını tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmek önemlidir. Probiyotiklerin tıbbi tedavinin yerine değil, sağlıklı bir yaşam tarzının parçası olarak kullanılması gerektiğini hatırlamak da önemlidir.

2.6 Probiyotik Bakteriler Olarak Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), hayvanlar kadar bitki materyali veya meyve suyu gibi karmaşık besin kaynağına sahip habitatlarda yaygındır. Gıdaların aromasını, kalitesini, tutarlılığını ve güvenliğini etkilerler. 1900'lerden bu yana, fermente gıda üretimi ve buna bağlı olarak laktik asit bakterilerinin başlangıç kültürlerine olan talep büyük ölçüde artmıştır. Şeker içeren gıdaların fermantasyonunda önemli bir rol oynarlar. Asit oluşumu ve inhibitör bileşenlerin üretimi nedeniyle gıdaların korunmasına katkıda bulunurlar. Öte yandan, tatsız (örn. diasetil) bileşikler üretebilir ve ekzopolisakkarit üretimi ile lifliliğe neden olabilirler (Grujović vd., 2022). LAB'lar, diğer birçok gıdanın yanı sıra yoğurt, peynir, kültürlü tereyağı, ekşi krema, sosis, salatalık turşusu,

zeytin, lahana turşusu ve çikolata üretiminde kullanılan gıda fermantasyon enzimleridir. Başlatıcı laktik asit bakterileri (sLAB) ve başlatıcı olmayan laktik asit bakterileri (nsLAB), fermantasyon süreçlerinde yer alan iki LAB kategorisidir. Yardımcı olarak kültürlerle sLAB eklenebilir. Bir başlatıcı, fermantasyonu başlatmak için kullanılan ve gıda ürününün kimyasal bileşiminde ve duyu özelliklerinde belirli değişikliklerle sonuçlanan aktif mikroorganizmaların bir kültürüdür. Bununla birlikte, nsLAB tipik olarak üretim ve işleme ortamlarından spontan/otokton bakteri olarak ortaya çıkar (König ve Fröhlich, 2017). Tipik bir laktik asit bakterisi, aerotolerant, asit toleranslı, organotrofik olan ve standart koşullar altında kültürlendiğinde önemli bir son ürün olarak laktik asit üreten tamamen fermentatif bir çubuk veya koktur. Porfirin üretemez ve sitokromlarda eksiktir. Özellikleri duruma göre değişebilir. Hemes, katalaz ve sitokromların oluşumuna ve ayrıca laktik asit konsantrasyonlarını düşüren laktik asidin müteakip metabolizasyonuna neden olabilir. *Pediococci* dışında, hücre bölünmesi tek bir düzlemde gerçekleşir. Tipik olarak, hücreler hareketli değildir. Vitaminler ve amino asitler gibi karmaşık gelişim elementleri onlar için gereklidir (Grujović vd., 2022).

Genellikle doğal fermentlerde bulunan ve gıda endüstrisinde yaygın kullanılan probiyotik LAB'lar, Gram-pozitif bir bakteri grubudurlar. LAB'lar çok eski çağlardan beri tüketildiklerinden dolayı Genel Olarak Güvenli Statüsü'nde (GRAS) yer almaktadır. LAB'lar, katalaz negatif, gram pozitif, spor oluşturmeyen, karbonhidrat fermantasyonuyla son ürününde laktik asit oluşturan, aerotolerant mikroorganizmalardır. *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Brevibacterium*, *Oenococcus*, *Weissella* ve *Streptococcus* cinsleri LAB'ların en önemli cinslerindendirler. LAB'ların antikanser, antioksidan, probiyotik, immunostimülatör ve kolesterol düşürme gibi biyolojik aktivitelerinin olması bu bakterilere olan ilgiyi artırmıştır.

Yapılan son çalışmalar laktobasillerin kansere karşı koruyucu bir etkisi olduğunu göstermiştir (Fotiadis vd., 2008; Grimoud vd., 2010; Riaz Rajoka vd., 2019). Laktobasillerden elde edilen bileşimlerin immun sistemin stimülasyonu ve apoptoz indüksiyonuyla potansiyel antikanser aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Sungur vd.,

2017). Tüm bu sebepler ile laktobasiller son yıllarda potansiyel antikanser ajanları olarak yaygınlaşmaktadırlar (Wu vd., 2021).

2.7 Probiyotik-Kanser İlişkisi

Çevre kaynaklı kanserojenler, kanserde anahtar faktörlerden biridir. Bağırsak sisteminin bakterileri, kanserojenlerin inaktivasyonu, yayılması ve ayrıca nitrozaminlerin/safra sterollerinin kansere neden olan bileşiklere dönüşmesini önlemede çok önemlidir. Diyetin bileşenleri de kanser gelişme riskinin artması veya azalmasının belirlenmesinde önemli değişkenler olarak kabul edilmektedir. Asidofil bakımından zengin fermente gıdaların tüketilmesi, bağırsak mikroflorası üzerinde olumlu bir etkiye sahip olan tümör başlatıcı ajanların ve prekarsinojenlerin gelişimine katkıda bulunan koliformlar gibi bakterileri azaltır.

Son yıllarda insanlarda geleneksel kanser tedavilerinin yan etkilerini minimuma indirebilmek için doğal tedavilere ve bu tedavilerin araştırılmasına yönelinmiştir. Bu yönelim probiyotik mekanizmasını oldukça ilgi çekici bir alan haline getirmiştir. İnsan gastrointestinal florasının bozulması sonucunda kanser gibi pek çok hastalık ortaya çıkabilmektedir. Kanser tedavisi için önemli bir ürün olan probiyotikler, intestinal mikrobiyal dengeyi sağlayan ve insan sağlığına yararlı etkileri olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır. Bağırsak florasında daha çok *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerindeki probiyotikler bulunurlar.

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamış olsa da bağırsaktaki mikroorganizmaların çeşitliliği üzerinde olumlu etkisi, bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi, artan laktoza tolerans, bağışıklık sistemini geliştirmek, anti-alerjik etkiler, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, kanserin önlenmesi gibi insan vücuduna olan yararları belirlenmiştir (Sarowska vd., 2013). Probiyotiklerin immün sistemin güçlenmesi ve çeşitli patojenlere karşı dayanıklılığının artması, hücre ölüm yolunun aktifleştirilmesi gibi mekanizmalarda aldıkları rollerle kanser hücrelerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Laktobasil araştırmaları iyi bir antikanser ajanı olmaları sebebiyle gittikçe artmaktadır.

In vitro araştırma sonuçlarına göre, probiyotik bakterilerin potansiyel mutajenik ve genotoksik etkileri önleyerek kanser riskini azalttığı bulunmuştur (Sanders vd., 2019).

Probiyotik LAB'ların başta meme ve mesane kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerindeki etkileri araştırılrsa da en çok araştırılan kanser türü kolorektal kanserdir. Probiyotik LAB'ların antikanser faydalarını in vitro ve deney hayvanlarında araştıran çalışmaların sonuçları oldukça cesaret verici olsa da, LAB'ların kolon kanserini önlediği mekanizmanın somut bir kanıtları için eldesi için günümüzde çalışmalar halen devam etmektedir (Kvakova Kamlarova vd., 2022).

Kısaca probiyotiklerin kolorektal kanser ile doğrudan bir ilişkisi olabileceğini gösteren kanıtlar vardır, ancak bu ilişkinin kesin doğası hala araştırılmaktadır. Birkaç çalışma, belirli probiyotik bakteri suşlarının kolorektal kanser riskini önleme veya azaltma potansiyelini araştırmıştır. Örneğin, bazı çalışmalar probiyotik suş *Lactobacillus acidophilus*'un kolonda anti-kanser etkileri olabileceğini öne sürdü. Bu bakteri, büyümelerini engelleyen maddeler üreterek ve bağışıklık sistemini kanser hücrelerine saldırması için uyararak kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlemeye yardımcı olabilir (De Champs vd., 2003; Milder vd., 2005).

Diğer araştırmalar, probiyotiklerin bağırsak sağlığını iyileştirebileceğini ve kolondaki iltihaplanmayı azaltabileceğini ve bunun da kanserli hücrelerin gelişimini önlemeye yardımcı olabileceğini bulmuştur. İnflamasyonun kolorektal kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir ve probiyotik kullanımı yoluyla inflamasyonu azaltmak, hastalığa yakalanma riskini azaltmanın bir yolu olabilir (Kumar vd., 2010). Bununla birlikte, probiyotiklerin kolorektal kanser riskini önleyebileceği veya azaltabileceği kesin mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Hangi spesifik probiyotik bakteri suşlarının en etkili olduğunu, nasıl çalıştıklarını ve en uygun dozaj ve kullanım süresinin ne olması gerektiğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Probiyotiklerin kolorektal kanser riskini önleme veya azaltma konusunda potansiyel faydaları olsada, tıbbi tedavinin yerine kullanılmamaları gerektiğini not etmek önemlidir.

2.8 Probiyotik-İmmünomodulatör İlişkisi

Probiyotikler miktarları doğrultusunda konak sağlığına faydalı olan yani patojenik olmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanabilirler. Probiyotikler immünolojik fonksiyonları modüle etme yeteneğine sahiptir. Bağışıklık sistemi doğal ve adaptif olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Adaptif immün yanıt mukozal tipte ve memelilerde

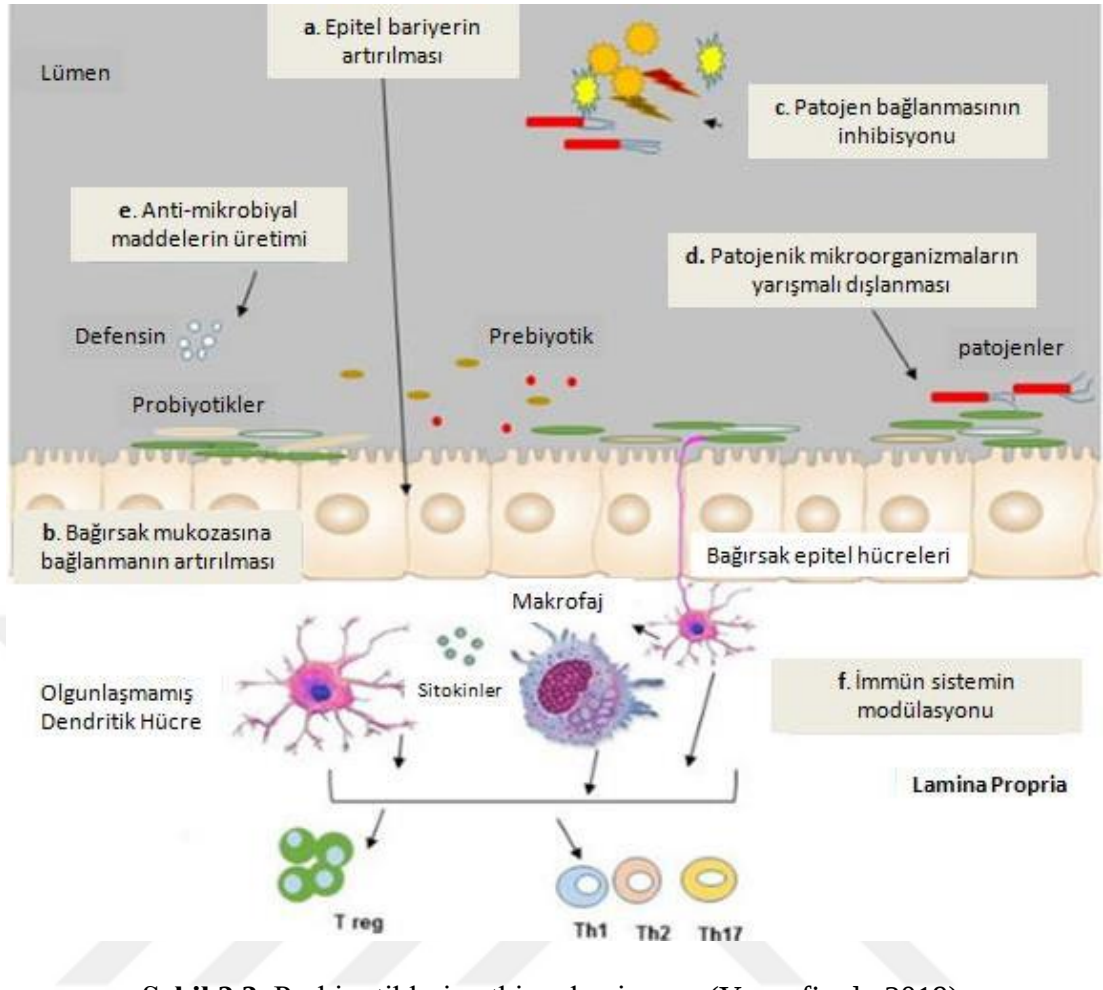
sistemik olarak yanıt verebilir. Buradaki immün yanıt, molekül ve hücreleri virüs, bakteri, parazit vb. mikrobiyal patojenlere karşı korumak için birbiriyle etkileşim halinde olur (Kemgang vd., 2014).

Probiyotikler, karaciğer hastalığının önlenmesi ve tedavisi, irritabl bağırsak sendromu, gastroenterit, kardiyovasküler hastalık ve immünomodülatör aktivite gibi bir dizi pozitif sağlık etkisine sahiptir. Bağışıklık sistemi zayıflığı, enfeksiyon gibi durumlar kanser gelişimi riskini artırır. Probiyotiklerin, bu koşullarla sonuçlanabilecek aşırı veya arızalı immün tepkilerin aksine, enflamatuvar bağırsak hastalıklarını, alerjileri ve otoimmün hastalıklardan kaçınmak için immün yanıtını kontrol etmesi bekleniyor. Probiyotiklerin ana anti-kanser ve anti-mutajenik aktivitesine, mutajenlere bağlanma, bozma ve bloke etme yetenekleri bu kontrole aracılık eder. Konağın doğuştan gelen bağışıklık düzenlemesi ve büyütme, anti-enflamatuvar kimyasalların salgılanmasıyla kontrol edilir ve teşvik edilir. Probiyotik yönetimi, kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi dahil olmak üzere geleneksel kanser tedavisi yönetiminin güvenliğini teşvik eder ve kolorektal kanserin önlenmesine ve tedavisine yardımcı olur (Wang vd., 2022). Fermantasyona uğramış gıdalar, içerdikleri probiyotik mikroorganizmalar, yüksek miktarda mineral, fitokimyasallar ve biyoaktif maddeler nedeniyle giderek daha popüler hale geliyor. *Lactococcus lactis*, kendine özgü fermantasyon sürecinin bir sonucu olarak gıda endüstrisinde, özellikle süt ürünleri üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu fonksiyonel gıdaların *L. lactis*'in üstün biyolojik aktiviteleri, enflamasyonu azaltma ve bağışıklık sistemini modüle etme kapasitelerini içerir. *L. lactis* bağırsak immünolojisini, mikrobiyotayı, amino asit profillerini ve büyüme performansını iyileştirmiştir. *L. lactis* uygulaması ayrıca enfeksiyonun eradikasyon oranını da hızlandırmıştır. Bu etkiler, hem yerel hem de sistemik bölümlerde doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinden sağlayacaktır (Saleena vd., 2023).

Probiyotiklerin bakteriyostatik ve bakterisidal aktivitesi, bağırsak duvar kolonizasyonunda rekabete, patojenlere karşı antagonistik etkiye sahip metabolitlerin üretilmesine ve antikör üretimini yoğunlaştırmak için bağışıklık sisteminin uyarılmasına dayanır. İnsan mukozasında ve özellikle sindirim sisteminde kolonize olma konusunda laktobasiller büyük yetenek gösterirler. Bir probiyotiğin, bağışıklık

sistemi bozuklukları olmayan ve düzgün işleyen bir bağışıklık sistemi olan insan vücuduna zarar veremeyeceği varsayımı probiyotik kullanımdaki temel ilkedir.

Probiyotik bakterilerin hem profilaktik özelliklerini hem de terapötik etkilerini gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma ile doğrulanmıştır. Bu mikroorganizmaların pozitif özellikleri ve immün modüle etme kabiliyetleri, ağız boşluğunda mantar kolonilerinin negatif yönde büyümesinin ortadan kaldırılmasına izin verir. Gastrointestinal sistemin birçok hastalığında ve dispeptik durumlarla ilgili bozukluklarda sinbiyotikler, prebiyotikler ve probiyotikler büyük başarı ile kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra otoimmün hastalıklar, alerji, obezite tedavisi, anoreksiye gibi hastalıklarda kullanılmaktadırlar. Tekrar eden enfeksiyonların ve kanserin önlenmesinde probiyotik kullanma girişimleri de söz konusudur. Son olarak probiyotik bakterilerin, mikrobiyotanın bir parçası olarak bağırsak homeostazına katkıda bulunduğu da gösterilmiştir (van Baarlen vd., 2013). Yaygın probiyotiklerin etki mekanizmasını özetlemek gerekirse; bağırsak mukozasında kolonize olduklarında patojen tutunmasını engellerler, bağırsak lümeninde patojenlerle rekabet ederler ve onları yok ederler, dendritik hücre fonksiyonunu, T hücresi polaritesini modüle ederler ve böylece bağışıklık sistemini düzenlerler (Yousefi vd., 2019).



Şekil 2.3. Probiyotiklerin etki mekanizması (Yousefi vd., 2019).

2.9 LAB'ların Aktif Bileşenleri Olarak Ekzopolisakkaritler

Doğada çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen çözünebilir veya çözünemeyen yüksek moleküler ağırlıklı hücre dışı polimerlere ekzopolisakkaritler (EPSs) denir. (Angelin ve Kavitha, 2020)

LAB'ların çok sayıda ve farklı çeşitlerde ve farklı yapısal özelliklerde EPS üreten mikroorganizmalar oldukları bilinmektedir. LAB'lar çok eski çağlardan beri insanlar tarafından tüketildiğinden dolayı Genel Olarak Güvenli Statüsünde (GRAS) değerlendirilmektedirler (Badel vd., 2011). Doğal yollarla üretilen EPS, fermente gıdalarda kıvam arttırıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Probiyotik özelliğe sahip EPS'ler gıda endüstrisinde jelleştirici, emülsifiye edici ve stabilizatör olarak kullanılmaktadırlar. Tüketicilerin katkısız, güvenilir gıdaya yönelimleri EPS'lerin ilgi odağı haline gelmesine ve yeni araştırmalar için merak uyandırmasına yol açmıştır.

Bir başka merak uyandıran konu ise EPS'lerin sergiledikleri biyomedikal kullanım alanları olmuştur. EPS'lerin antimikrobiyal, antitümör, antioksidan, immünomodülatör davranışları gibi tıpta uygulanabilirliği gibi avantajlarıyla araştırmacıların ilgisini çekmeyi başarmıştır.

EPS'lerin antitümöral aktivitesi yüksek ölüm oranlarını düşürerek ve yaşam kalitelerini yükselten bir tedavi ajanı olarak ilgi görmektedir. Birçok tedavi ajanı kanser hastalarının kusma, yorgunluk, mide bulantısı gibi etkilerinden dolayı yaşam kalitesini düşürürken LAB'lardan elde edilen ve doğal bir kaynak olan EPS'ler bu durumu minimuma indirerek yeni kanser ajanlarının aranmasında iyi bir alternatif olmakla beraber bu araştırmaların geliştirilmesine ışık tutmuştur.

LAB'lar tarafından üretilmiş olan EPS'ler dallanmış ve tekrar eden şeker birimlerinden veya şeker türevlerinden oluşmaktadır. EPS'lerin yararlılığı ise şekerlerin dizilimine, dallanma şekline ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Welman ve Maddox, 2003)

LAB'dan elde edilen EPS'ler, yüksek oranda çeşitlilik gösteren polimerlerdir ve farklı formlarda olabilirler ve bu kriterlere göre sınıflandırılabilirler. EPS'ler hücre yüzeyine bağlı olan kapsüller ekzopolisakkaritler (hb-EPS) ve ortama salınan serbest ekzopolisakkaritler (s-EPS) olarak iki tip polisakkarit salgılar. LAB'ların genellikle s-EPS ürettikleri bilinse de hem hb-EPS hem s-EPS üreten suşların olduğu da bilinmektedir (Yang vd., 2010). Bunların yanında EPS'ler sınıflandırılırken monomer bileşimine bağlı olarak sınıflandırılırlar. Tekrar eden monomerlerin sentez yolu ve yapısına bağlı olarak EPS'ler tek tip monosakkarit içeren homopolisakkaritler (HoPS) ve farklı tip monosakkarit içeren heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Li vd., 2015). EPS'lerin yapılarının bilinmesi onların kullanım alanlarının belirlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sebeple yapısı bilinen EPS'nin bileşiminin biyolojik aktivitesinin çözümlenmesi kullanım alanının belirlenmesinde fayda sağlayacaktır.

2.10 EPS'lerin Antikanser İlişkisi

Ekzopolisakkaritler, bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen yüksek molekül ağırlıklı özel polisakkaritlerdir (Angelin ve Kavitha, 2020). Yapılan çalışmalarda

ekzopolisakkaritlerin bazı tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı ve hücre apoptoz sürecini uyarabileceği gösterilerek ekzopolisakkaritlerin antitümoral etkileri incelenmiştir (Wu vd., 2021).

Çeşitli mekanizmalar aracılığı ile ekzopolisakkaritlerin anti-tümör etkisi görülebilmektedir. Ekzopolisakkaritlerin tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatmak, yayılmasını durdurmak kısaca tümör hücrelerine zarar vererek, normal hücreleri etkilemedikleri bilinmektedir. Bu nedenle, ekzopolisakkaritler zararsız ve doğal bir tedavi seçeneği olarak görülebilir. Ekzopolisakkaritlerin anti-tümör etkilerinin daha detaylı araştırılması ekzopolisakkaritlerin hangi tümör tiplerine etkili olduğu, hangi dozlarda en etkili olduğu ve bu polisakkaritlerin nasıl kullanılabileceği konularında daha fazla bilgiyi bizlere sunabilmesi açısından önem arz etmektedir.

Laktobasiller, kanserli hücrelerde apoptozu indükleyebildikleri, onları farklılaştırabildikleri ve genotoksik maddelere bağlanabildikleri için antikanser ajanlardır (Wu vd., 2021). LAB EPS'leri karaciğer, mide ve meme de dahil olmak üzere çeşitli tümör hücrelerinin büyümesini engelleyebildiğinden dolayı tamamlayıcı veya alternatif bir kanser tedavisi olarak kullanılabilmektedir. Bu ajanlar, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozu indüklemenin yanı sıra antimitojenik, antioksidatif, antianjiyogenez ve anti-enflamatuar özellikler dahil olmak üzere çeşitli antitümör etkilere sahiptirler (Milner vd., 2021; Nazir vd., 2018). Ek olarak EPS, tümör oluşumuna sebep olan enzim aktivitesini azaltmak, bağışıklık sisteminin yanıtını artırmak ve apoptoz yoluyla kanser hücresi yayılmasını engelleyerek hücre çoğalmasını sınırlamak gibi büyük bir etki alanına sahiptir (Liu vd., 2021). Apoptoz, dışsal ve içsel olmak üzere iki farklı sistem yoluyla moleküler düzeyde gerçekleşmektedir (Śliżewska vd., 2020). Pro- ve anti-apoptotik proteinlerin Bcl2 ailesi, içsel veya mitokondriyal yolları düzenler. Alternatif olarak sitoplazmik yol olarak isimlendirilen ekzojen apoptoz, tümör nekroz faktörü ailesinin bir üyesi olan ölüm reseptörü Fas tarafından aracılık edilir (Zhao vd., 2019). Yayınlanmış olan çok sayıda yayın, EPS'lerin, antikanser, bağışıklık uyarıcı ve antioksidan özellikler dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif çeşitli özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Khalil vd., 2022). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda EPS'lerin ve bunların türevi olan oligosakkaritlerin endüstriyel olarak farklı alanlarda kullanılabileme potansiyeli ortaya çıkmıştır. LAB'lar tarafından üretilen EPS'lerin insan sağlığına iyi geldiği ve

hastalıkları önleyici bir etkisinin olduğu yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda EPS'lerin bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterolü düşürücü ve antitümör etkisinin olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla bu durum EPS'lere olan ilgiyi arttırmıştır.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların doza bağlı olarak toksisite gösterdiği ve kusma, yorgunluk gibi yıpratıcı ve güçlü yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple kanserin tedavisinde etkili alternatif stratejiler arama ihtiyacı ve toksik olmayan ya da daha az toksik olan anti-kanser ajanların geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. LAB'lar gibi güvenilir ve doğal kaynaklardan elde edilen EPS'ler güvenlidir. Bununla beraber anti-kanser etkisi ile ilgili çalışmalar günümüzde artarak devam etmektedir. Bu sebeple, EPS'lerin sentetik anti-kanser ajanları için daha iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Apoptoz genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklidir ve hücrelerin sayısının düzenlenmesinde anahtar bir rol oynar. Birçok kanser türünün önemli bir patogenetik olayı, hücre proliferasyonunun kontrol süreçlerinin değiştirilmesine bağlı olarak apoptozu tetikleme yeteneğinin azalmasıdır. Apoptoz hücre ölümünün terapötik olarak kullanılması mümkündür. Bazı epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, spesifik LAB suşlarının veya fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin bazı kanser risklerini azalttığını ve tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir. Otofaji (programlı hücre ölümü tip II) de bir programlı hücre ölüm yoludur ve besin yoksunluğu sırasında tipik olarak gözlenen uzun ömürlü protein bozunmasının dinamik bir süreci olarak tanımlanır. Kanser hücrelerinin farklı tipleri çeşitli anti-kanser tedavileri sonrasında otofajiye geçtiğinden, otofajiye olan ilgi artmıştır. Probiyotik bakterilerden elde edilen bazı kanser önleyici bileşenler de çeşitli kanserlerin potansiyel olarak önlenilebileceği olarak önerilmiştir. Bununla birlikte, bu bileşenlerin kanser hücrelerini etkileme mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamıştır. Beclin-1 ve GRP78 gibi bazı proteinlerin otofajik hücre ölümünde rol oynadığı belirtilmiştir. Beclin-1, otofaji için gerekli olan bir proteindir ve GRP78 (BiP olarak da bilinir), endoplazmik retikulum (ER)'un moleküler şaperonudur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, otofaji'nin ER stresi sırasında hücrelerin sağkalımını destekleyen bir savunma mekanizması olarak aktive olduğunu göstermiştir. Beclin-1'in, ER stresi kaynaklı otofaji için gerekli olduğu ve GRP78'in de insan hücrelerinde ER stresi kaynaklı otofajiyi düzenlediği

bildirilmiştir. GRP78'in interferensi ile yok edilmesinin, besin yoksunluğu veya ER stresi kaynaklı otofagozom oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. (Li vd., 2008). EPS uygulamasının, Beclin-1'in ekspresyonunu artırarak ER stresini ve GRP78 ekspresyonunu indükleyerek otofaji ile ilişkili kanser hücresi ölümünü destekleyebileceği düşünülmektedir.(Lee vd., 2008). Strese bağlı proteinlerin, hasar gören proteinlerin yeniden katlanması ve mitokondriye aktarılması gibi hücre sağkalımı için önemli proseslere dahil olduğu gösterilmiştir. (Kim vd., 2010). Otofajide apoptozla ilişkili proteinlerin (Beclin-1, GRP78 ve Bcl-2 gibi) rol oynayabileceği belirtilmiştir (Shimizu vd., 2004). Bunun yanı sıra EPS'lerin, Bcl-2'yi baskılayarak Beclin-1 ve Bak'ı indükleyebileceği belirtilmiştir (Kim vd., 2010). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin, otofaji düzenlenmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Moretti vd., 2007). Beclin-1, Bcl-2 ve Bak arasındaki denge veya oranın, hb-EPS'nin anti-kanser aktivitesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. (Kim vd., 2010). Bu bulgular, EPS'nin, hücre içi temizlik mekanizmaları ve hücre ölüm süreçleri aracılığıyla anti-kanser etkisini gerçekleştirebileceğini göstermektedir.

Apoptoz, vücuttaki hücre sayısının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan, genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Hücre proliferasyonunun kontrol süreçlerindeki değişiklikler nedeniyle apoptozu tetikleme yeteneğinin azalması, birçok kanser türünde önemli bir patojenik olaydır. Apoptotik hücre ölümünün terapötik kullanımı mümkündür. Bazı epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, belirli LAB suşlarının veya fermente süt ürünlerinin bazı kanser riskini azalttığını ve tümör gelişimini engellediğini göstermiştir. Otofaji (programlanmış hücre ölümü tip II) aynı zamanda programlanmış bir hücre ölümü yoludur ve tipik olarak besin yoksunluğu sırasında gözlenen uzun ömürlü protein yıkımının dinamik bir süreci olarak tanımlanır. Çeşitli kanser önleyici tedavilerden sonra farklı kanser hücrelerinin otofajiye geçmesi otofajiye olan ilgiyi artırmıştır. Probiyotik bakterilerden elde edilen bazı kanser önleyici bileşiklerin de potansiyel olarak çeşitli kanserleri önlediği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, bu bileşiklerin kanser hücrelerini etkileme mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Beclin-1 ve GRP78 gibi bazı proteinlerin otofajik hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir. Beclin-1, otofaji için gerekli bir proteindir ve GRP78 (BiP olarak da bilinir) endoplazmik retikulumun (ER) moleküler bir şaperonudur. Son çalışmalar, otofajinin, ER stresi sırasında hücre sağkalımını destekleyen bir savunma mekanizması olarak aktive edildiğini göstermiştir (Ding vd.,

2007). Beclin-1'in ER stres kaynaklı otofaji için gerekli olduğu bildirilmiştir ve GRP78 ayrıca insan hücrelerinde ER stres kaynaklı otofajiyi de düzenler. Ek olarak, GRP78'in RNA interferansı ile tükenmesinin, besin yoksunluğu veya ER stresi ile indüklenen otofagozom oluşumunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Li vd., 2008). Bu nedenle, hücre bağımlı EPS uygulamasının, Beclin-1 ekspresyonu yoluyla otofaji ile ilişkili kanser hücresi ölümünü destekleyen ER stresini ve GRP78 ekspresyonunu indükleyebileceği düşünülmektedir. Beclin-1 ve GRP78'e ek olarak, Bcl-2 dahil olmak üzere apoptotik proteinlerin de otofajide rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Beclin1/Bcl-2 arasındaki etkileşimler hem apoptoz hem de otofaji yollarıyla ölümle sonuçlanabilir (Pattingre vd., 2005). Ek olarak Bak'ın otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir. EPS'nin Bcl-2'yi baskımlarken Beclin-1 ve Bak'ı indüklediği gösterilmiştir. Proapoptotik ve antiapoptotik (Bcl-2 gibi) proteinler arasındaki denge, otofaji regülasyonunda rol oynayabilir. Beclin-1, Bcl-2 ve Bak arasındaki denge veya oran, EPS'nin otofaji yoluyla anti-kanser etkisine katkıda bulunabilir (Kim vd., 2010; Moretti vd., 2007).

2.11 EPS'lerin İmmunomodülatör İlişkisi

LAB'lar, genellikle insan tüketimine uygun olarak kabul edilen mikroorganizmalar arasındadırlar ve EPS üretirler. Ayrıca, LAB'lar tarafından üretilen EPS'ler, antioksidan, anti-tümör, immünomodülatör ve kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle ilgi görmüştür. İnsan bağışıklık sistemi, mikrobiyal enfeksiyonlara ve tümörlere karşı direnç başlatan moleküller, dokular dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik yapıdan oluşur (Zha vd., 2018). Makrofajlar, enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattı görevi görür ve doğal ve adaptif konakçı immün yanıtlarının başlatılmasında önemli roller oynar ve insan vücudunun çeşitli yerlerine geniş çapta dağılmışlardır (Kidder ve Montgomery, 1975). LAB'lardan izole edilen EPS'lerin immünomodülatör aktiviteleri geniş çapta araştırılmaktadır ve daha önce yapılan bir çalışma, EPS'lerin tümör büyümesini önleyebileceğini göstermiştir (Kaźmierczyk-Winciorek vd., 2021). Ayrıca, EPS'ler etkili immüno-uyarıcı aktivitelere sahiptir ve örneğin makrofaj fagositozunu geliştirebilir, doğal öldürücü hücrelerin tümör öldürücü aktivitesini artırabilir ve lenfosit proliferasyonunu teşvik ederek istilacı patojenlere karşı konak bağışıklığını artırabilir (Kaźmierczyk-Winciorek vd., 2021).

Probiyotikler, vücudumuzda doğal olarak bulunan ve sağlığını destekleyen bakterilerdir. Probiyotiklerin sağladığı bazı sağlık yararları, üreten bakterileri çevreleyen zarfta ekzopolisakkarit (EPS) yapılarının varlığına bağlanmıştır (Caggianiello vd., 2016; Hidalgo-Cantabrana vd., 2014). EPS, bir balçık yapısı oluşturarak gevşek bir şekilde bağlanabilen veya bir kapsül olarak kovalent olarak bağlanabilen bir polimerik yapıdır ve tekrar eden monosakkarit birimlerinden oluşur. EPS üreten probiyotiklerin bağışıklık sistemi zayıflamış durumlar üzerindeki koruyucu etkisi, deneysel hayvan modelleri kullanılarak in vivo olarak da incelenmiştir. *F. prausnitzii* bakterisi, Firmicutes filumunun önemli üyelerinden biri olup, sağlıklı bireylerin kolonunda bol miktarda bulunur. Ancak, IBD (inflamatuvar barsak hastalığı) olan kişilerde yetersiz bir şekilde temsil edilir. Bu nedenle, *F. prausnitzii* potansiyel olarak anti-inflamatuvar özelliklere sahip yeni nesil bir probiyotik olarak önerilmiştir. Bu tür tarafından üretilen EPS matrisi (polimerik ekzopolisakkarit), DSS (2,2'-disülfonat safrası) kaynaklı bir akut ülseratif kolit oluşturulan BALB/c fare modelinde uygulandıktan sonra, immünomodülasyon özellikleri ile doğrudan ilişkili görünmektedir. Bağışıklık hücreleriyle yapılan laboratuvar çalışmaları, *F. prausnitzii* HTF-F tarafından sentezlenen EPS'nin antienflamatuvar özelliklerinin, TLR-2 (toll benzeri reseptör-2) aracılığıyla antijen sunan hücrelerde IL-12 ve IL-10 üretimini artırdığını göstermiştir (Rossi vd., 2015). Daha yakın zamanlarda, benzer in vivo çalışmalar, bu bulguları EPS üreten farklı bifidobakterilerle doğrulanmıştır.

Yukarıda kısaca özetlenen sonuçlar, Gram-pozitif probiyotikler tarafından EPS sentezinin bağışıklık modüle etme kabiliyetini göstermektedir. Bunun yanı sıra bağırsak enflamatuvar durumlarını hafifletmek için umut verici bir müdahale yolu göstermektedir. İlaveten, üretici bakterinin canlılığının yararlı bir etki göstermesi gerekli değildir. Bakteri yüzeyini kaplayan EPS tabakası, gastrointestinal sistemin zorlu koşullarına dirençlidir. Bu sebeple de kolona sağlam bir şekilde ulaşmasını sağlar (Salazar vd., 2016). Bu neticeyle örnek olarak oksijen varlığında canlılığını yitirenler gibi, işlenmesi zor bakterilerden EPS üreten suşların kullanılması, varsayılan teknolojik zorluğun üstesinden gelmek için bir çözüm olabilir.

2.12 Antikanser ve İmmunmodölatör Aktivite Değerlendirmelerinde Kullanılan Hatlar

2.12.1 HT-29

HT-29, epitelyal morfolojiye sahip bir insan kolorektal adenokarsinom hücre dizisidir. Bu hücreler, kolorektal kanser için standart tedavi seçenekleri olan kemoterapötik ilaçlar 5-florourasile duyarlıdır.

HT-29 hücreleri, kolorektal kanser için bir ksenograft tümör modelidir. Bununla birlikte bağırsak hücreleri tarafından emilim, taşıma ve salgılama araştırmaları için bir in vitro model olarak da kullanılmaktadır. İnsan kolon adenokarsinomu hücre dizisi olan HT-29, sadece insan kolon kanserlerinin biyolojisini incelemekte değil, aynı zamanda olgun bağırsak hücrelerinin özelliklerini ifade etme yeteneği nedeniyle gıda sindirimi ve biyoyararlanımı üzerine yapılan çalışmalarda da kullanılmaktadır. Bu hücre hattının, özellikle mukus tabakasının etkisi dikkate alındığında ya da Caco-2 hücreleri ile kombinasyon halinde ortak kültür olarak kullanımında, ilaçların ve gıda bileşiklerinin taşınma biçimleri de gözlemlenmektedir (Martínez-Maqueda vd., 2015). Bunun yanı sıra HT-29 hücreleri bakteriyel enfeksiyona karşı bağırsak bağışıklık tepkisini, mikroorganizmaların hayatta kalmasını ve yapışmasını veya istilasını incelemek için sıklıkla kullanılmıştır. Son olarak, bazı gıda bileşiklerinin etkisini ve müsin salgısını değerlendirmek için de HT-29 hücreler kullanılmaktadır. İlk zamanlarda HT-29 hücre dizisi insan kanser biyolojisinin farklı taraflarını incelemek için kullanılmıştır. Aslında bu hücreler enterositler veya mukus üreten hücreler gibi olgun bağırsak hücrelerinin özelliklerini ifade edebilmeleri sebebiyle dikkat çekmiştir (Fogh ve Trempe, 1975).

İnsan kolon karsinom hücreleri bazı kısıtlamalara rağmen, gıda bileşiklerinin biyoyararlanımı ve gıda sindirimi ile alakalı çeşitli yönleri incelemek için değerli hücrelerdir. HT-29 ve türevi bazı hücre hatları, özellikle diğer epitelyal hücre hattı ile ortak kültür de kullanıldıklarında, gıda bileşeni absorpsiyonunu incelemek için ilgi çekici olabilirler. In vitro modeller, in vivo elde edilen kantitatif sonuçlarla karşılaştırılarak sorgulanabilir, ancak bu modeller ayrıca gıda bileşiğinin absorpsiyon sırasında maruz kalabileceği modifikasyonların belirlenmesine de izin verir. Bu sonuçlar, daha ileri in vivo çalışmaların yapılmasına yardımcı olur. Örneğin, HT29

hücre hattı, mukus salgılayan fenotipiyle bağırsakta mukus salgılama özelliklerini etkileyebilecek gıda bileşiklerini veya bakterileri taramak için değerli bir model olarak kullanılabilir. Ayrıca, bu modeller, mikropların konakçıya yapıştığı, istila ettiği ve konakçıya sinyal verdiği mekanizmalar hakkında da bilgi sağlar ve memeli hücre tepkisi üzerine de sonuçlar verir (Martínez-Maqueda vd., 2015). Böylece, *in vitro* ve *ex vivo* stratejileri, *in vivo* stratejilerle tamamlayıcı bir araç olarak, gıda sindirimini ve gıda bileşenlerinin bağırsak üzerindeki etkisini incelemek için kullanılabilir.

2.12.2 RAW 264.7

RAW 264.7 hücreleri, bilimsel araştırmalarda, özellikle bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir hücre dizisidir. Bir BALB/c faresinin dalağından türetilirler ve makrofaj hücre tipine aittirler (Choi vd., 2022). Makrofajlar, vücudun bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynayan bir tür bağışıklık hücresidir. Fakat RAW 264.7 hücre hattı, uzun sürelerdir çalışılmasına rağmen halen stabilitesi tam sağlanmamıştır. RAW 264.7 hücrelerinin bir fareden türetilmiştir ve insan hücreleriyle tam olarak aynı şekilde davranmayabilir. Bununla birlikte, bağışıklık sistemini incelemek için hala değerli bir araçtır ve bağışıklık sistemi işlevini anlamamıza önemli ölçüde katkıda bulunmuşlardır. RAW 264.7'nin farklılaşma yeteneğini hangi pasajda kaybettiği bilinmemektedir. Vücuttaki çeşitli dokularda bulunurlar ve patojenleri ve diğer yabancı maddeleri fagosit etme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, bağışıklık yanıtını koordine etmeye yardımcı olan sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli bağışıklık araçlarını üretebilirler (Putman ve Contreras, 2022). RAW 264.7 hücreleri, iltihaplanma, kanser ve bulaşıcı hastalıklar dahil olmak üzere bağışıklık sistemi işlevinin çeşitli yönlerini incelemek için yaygın olarak kullanılır. Laboratuvarlarda kolayca büyütülebildikleri ve nispeten dayanıklı hücreler oldukları için tercih edilebilirler. Ek olarak, bakteriler, virüsler ve diğer patojenler gibi çok çeşitli uyaranlara yanıt verebilirler, bu da onları bağışıklık tepkisini incelemek için değerli bir araç haline getirir (Wang vd., 2023). RAW 264.7 hücrelerini kullanmanın ana avantajlarından biri, laboratuvarlarda manipüle edilebilmeleridir. Araştırmacılar, hücreleri çeşitli uyaranlarla tedavi edebilir ve tepkilerini gözlemleyerek, bağışıklık yanıtının altında yatan mekanizmaları incelemelerine olanak tanır. Bu, çeşitli biyolojik süreçlerde bağışıklık sisteminin rolünün daha iyi anlaşılmasına ve bir dizi hastalık için yeni tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Sonuç olarak, RAW 264.7 hücreleri,

bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ve değerli bir araçtır ve araştırmacıların bağışıklık sistemini ve çeşitli biyolojik süreçlerdeki rolünü incelemelerine olanak tanır. Bağışıklık sisteminin önemini anlamamıza önemli ölçüde katkıda bulundular ve yeni tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlamışlardır.



3. MATERYAL VE METOD

L-EPS'lerin, antikanser ve immunostimülatör aktivite gibi terapötik fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılması, biyomedikal alana yeni beklentiler getirmektedir. Bu çalışmada L-EPS-ACS5'in antikanser ve immunostimülatör etkileri araştırılmıştır.

3.1 Antikanser Aktivite Çalışmaları

Çalışmada L-EPS-ACS5'in antikanser aktivitesi, hücre canlılığı ve koloni oluşumu üzerine inhibisyon düzeyleri, 5-florourasil (5-FU) (Merck, Gillingham, UK) pozitif kontrol olarak kullanılarak HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) üzerinde belirlenmiştir. L-EPS-ACS5'in indüksiyonu sonucunda apoptozis varlığının mekanizmasını araştırmak üzere apoptozis belirteci olan gen ekspresyonu ve protein düzeyindeki değişimler ile ilgili değerlendirmeler yine ilgili L-EPS ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda çekirdek ve hücre düzeyinde apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi için L-EPS-ACS5 uygulaması yapılan hücre çekirdekleri Hoechst 33258 (Merck, Gillingham, UK) ile işaretlenmiş, ek olarak hücre morfolojileri TEM (JEOL JEM 1220) ile analiz edilmiştir.

3.1.1 Hücre kültürü

HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı ticari olarak temin edilmiştir. Hücreler yüksek glikoz içeren (4,5 g/L), %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS) (Biological Industries, Cromwell, USA) ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin (Biological Industries, Cromwell, USA) ile desteklenmiş DMEM (Biological Industries, Cromwell, USA) ekilmiş ve 37°C ve %5 CO₂'li ortamda kültüre edilerek, her 2-3 günde bir %80 konfluentliğe ulaştıktan sonra tripsin (0.25%)/EDTA (0.05%) (Biological Industries, Cromwell, USA) ile toplanarak pasajlanmıştır (Di vd., 2017).

3.1.1.1 HT-29 hücrelerinin çözülmesi

1. -196°C'de sıvı azotta saklanan hücreler, 37°C'deki su banyosuna alınarak ve yaklaşık 1-2 dakika içerisinde çözülmesi beklenmiştir.

2. Tüp içerisindeki hücreler, içerisinde hücreler için uygun 3-4 mL besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüpüne (santrifüj tüpüne) aktarılmış, pipetaj yapılarak hücre ve besiyerinin iyice karışması sağlanmıştır.
3. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda tüpün içindeki besiyerinden oluşan süpernatant pipetle çekilerek dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
5. Hücre pelleti üzerine 1 mL hücre için uygun besiyeri eklenerek hafifçe pipetaj yapılmıştır.
6. Hücre süspansiyonunun tamamı alınarak, içerisinde 4 mL besiyeri bulunan bir adet 25 cm²'lik kültür kaplarına (flask) ekilmiştir. Kültür kaplarının üzerine hücrenin ve besiyerinin adı, hücrenin açılma tarihi ve dondurulduğu tarihteki pasaj sayısı yazılarak %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir.
7. Bir gün sonra mikroskop altında hücre canlılığı ve morfolojisi incelenerek besiyeri değişimi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.2 HT-29 hücrelerinin pasajlanması

1. Hücrelerin bulundukları kültür kaplarının yüzeyini kaplama (konfluent olma) durumları mikroskop altında incelenerek belirlenmiştir.
2. Konfluent olan hücreleri yüzeyden kaldırmak için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır.
3. Hücreler 1X tripsin/EDTA (yaklaşık 1-2 mL) ile 1 kez yıkanmıştır.
4. 1X tripsin/EDTA ortamdan uzaklaştırılmıştır.
5. Hücrelerin yüzeyden kalkması için 1,5 mL 1X Tripsin-EDTA eklenmiştir.
6. Tripsin-EDTA'nın kültür kabının üzerine iyice yayılması sağlanmış ve ardından kültür kabı 37°C'de 5-6 dakika inkübe edilmiştir.

7. İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir (İnkübasyon aşamasının süresi önemlidir; inkübasyon süresinin kısa olması hücrelerin kalkması için yeterli olmaz iken; bu süre uzadığında ise Tripsin-EDTA hücrelere zarar vermektedir). Bu sırada yeni kültür kapları (hücre yoğunluğuna bağlı olarak 5-6 tane kültür kabı) alınarak, üzerine pasaj numarası (1 artırılarak), işlem tarihi, yapan kişi, hücre özellikleri yazılmış ve hücre için kullanılan besiyerinden 4 mL her bir kültür kabına ayrı ayrı koyulmuştur.

8. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı anlaşıldıktan sonra Tripsin-EDTA'nın etkisini nötralize etmek için ortama yukarıda belirtilen uygun besiyerinden 25 cm² kültür kabı için 4,5 mL eklenmiştir.

9. Hücreler pipetleme işlemi ile homojen hale getirilmiştir.

10. 1 mL besiyerindeki hücre miktarı Thoma lamı kullanılarak hesaplanmıştır.

11. 1 mL hücre, hazırlanan yeni kültür kaplarına ekilmiştir.

12. Yeni kültür kabı %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörde 2-3 gün süresince bekletilerek hücreler çoğaltılmıştır.

3.1.1.3 HT-29 hücrelerinin dondurulması

1. Hücreler tripsinize edilmiştir (pasajlama prosedüründe olduğu gibi).

2. Hücreler, 5 mL DMEM ile kültür kabından yıkama yapar gibi 15 mL'lik falkon tüp içerisine toplanmıştır.

- Dondurma besiyeri:

- 9,5 mL DMEM

- 0,5 mL DMSO

3. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 mL dondurma besiyeri eklenmiştir.

5. Nazikçe birkaç kez pipetaj yapıldıktan sonra sıvı kriyotüpe aktarılmıştır.
6. Kriyotüp üzerine hücrenin ismi, pasaj numarası ve tarih yazılmıştır.
7. Kriyotüpler daha sonra -80°C'ye kaldırılarak, çalışmalarda kullanıma üzere saklanmıştır.

3.2 Antiproliferasyon Analizi

Laktobasil kaynaklı L-EPS-ACS5'in HT-29 hücre çoğalması üzerindeki etkisi, MTT analizi ile değerlendirilmiştir. İlgili L-EPS besiyerinde çözündürülmüş ve analizlerden önce 0.22 µm'lik bir şırınga filtresi (Merck, Gillingham, UK) ile filtrelenmiştir. HT-29 hücreleri, 2x10⁴ hücre/well yoğunluğunda 96 well plate (Sarstedt, Leicester, UK) 'e ekilmiş ve plate'ler %5 CO₂ atmosferinde 37 ° C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, hücreler '5-FU' pozitif kontrolü (50 µg/mL) ile birlikte belirlenen doz aralığında (10 µg/mL-2,5 mg/mL) L-EPS uygulaması ile ortam değişikliği yapılmadan inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) için daha önce belirtilen koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Antiproliferatif etkiyi karşılaştırmak için kontrol hücreleri işlem görmeden aynı sürelerde muhafaza edilmiştir. Kuyucuklardaki örnekler inkübasyon süresinden sonra çıkarılmış, tüm uygulama ve kontrol kuyucuklarına MTT solüsyonu (Merck, Gillingham, UK) (0.5 mg mL⁻¹) ilave edilmiş ve plakalar 37 ° C'de 3 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı kuyucuklardan uzaklaştırılarak, formazan kristallerini çözmek için 100 µl DMSO (Merck, Gillingham, UK) çözeltisi ilave edilmiştir. Rengin stabilizasyonu için 5 dakika bekletilmiş, absorbanslar ChroMate®ELISA (Awareness Technology, Inc) okuyucu kullanılarak 492 nm'de ölçülmüş ve absorbans hücre sayısı ile korele edilmiştir. Anti-proliferatif etki, L-EPS-ACS5 uygulaması yapılan ve uygulama yapılmayan kontroller arasındaki canlılık karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Kontrol hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılık yüzdesi (%) aşağıdaki formülasyonla hesaplanmıştır.

$$\text{"\% Canlılık"} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$$

IC₅₀ değerleri Graphpad Prism Version 8 (San Diego, CA, USA) belirlenmiş olup, bu IC₅₀ değerini de kapsayan doz konsantrasyon aralığında sağlıklı kontrol hücrelerine

(L929) (Şap Enstistüsü, Ankara, Türkiye) L-EPS uygulaması yapılarak sitotoksitite değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı protokol aşağıda verilmiştir.

Öncelikle, L-EPS'lerin hangi çözücünde çözülerek hücrelere uygulanacağını ve hücrelerin ekim yoğunluğunu belirlemek için ön MTT deneyi yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemeyecek çözücü ve kuyulara ekilecek optimal hücre sayısı belirlenmiştir.

3.2.1 L- EPS için kullanılacak çözücünün belirlenmesi

1. HT-29 hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılarak konfluent durumda T-25 flastaktaki HT-29 hücreleri daha önce belirtilen şekilde tripsinize edilmiştir.



Şekil 3.1. Hücrelerin tripsinizasyonu aşamasında hazırlık görüntüsü.

2. 50 μ L tripan blue ile 50 μ L hücre thoma lamında sayım yapmak için karıştırılmıştır.
3. Thoma lamının üst ve alt kısmının her ikisine de ayrı ayrı 10 μ L karışımdan eklenmiştir.
4. Mikroskopta sayım yapılmıştır.
5. Sayımı yapılan hücrelerin yoğunlukları 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 10×10^4 olacak şekilde besiyeri ile dilue edilmiş ve ekim hacmi 100 ve 200 μ L olarak belirlenmiştir. Ekilen

her bir hücre yoğunluğu ve L-EPS için normal besiyeri, filtre besiyeri, otoklavlanmış besiyeri, PBS, fosfat tamponu uygulaması için uygulama gruplarına bölünmüştür.

6. Ekilen hücreler %5 CO₂ 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

7. İnkübasyondan sonra hücrelerin analize uygunluk durumu mikroskopta incelenmiştir.



Şekil 3.2. Hücrelerin analize uygunluk durumlarının mikroskopta incelenmesine ait görüntü.

8. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır.

9. Beşinci aşamada belirtildiği şekilde uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama grubu için kontrol kuyusu muhafaza edilmiş ve 24 saat için hücre canlılığı, MTT testi ile değerlendirilmiştir.

MTT solüsyon hazırlığı: MTT final konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde steril 1X PBS içerisinde ışık almayacak şekilde 50 mL falkon içerisinde aliminyum folyo ile kapatılarak çözülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm filtreden geçirilmiş ve alikvatlanarak -20°C’de saklanmıştır (Kullanılacak olanlar +4°C’de muhafaza edilmiştir).

10. 24 saatin sonunda her kuyucuğa final konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde MTT çözeltisi eklenerek 3 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

11. İnkübasyondan sonra (3 saat) mikroskopta formazan kristalinin oluşumu kontrol edilerek kuyulardaki ortamlar uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için her kuyuya çalışma konsantrasyonuna uygun şekilde analitik DMSO eklenmiştir.

12. DMSO ilave edildikten sonra oluşan renk 492 nm'lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş, “% Canlılık = (Örnek absorbansı / Kontrol absorbansı) x 100” formülü ile yüzde canlılık hesaplanmıştır.

3.2.2 L-EPS'nin HT-29 hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi için uygun doz aralıklarının belirlenmesi

L-EPS-ACS5'nin HT-29 kanser hücrelerinde doz ve süre bağımlı etkisinin belirlenmesi için geniş zaman (24, 48, 72 ve 96 saatler) ve konsantrasyon aralığında (10 µg/mL -2,5 mg) MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

1. HT-29 hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılmıştır. Konfluent durumda T25 flaskadaki HT29 hücrelerinin daha önce belirtilen şekilde tripsinizasyonu yapılmıştır.

2. 50 µL tripan blue ile 50 µL hücre thoma lamında sayım yapılmak için karıştırılmıştır.

3. Thoma lamının üst ve alt kısmının her ikisine de ayrı ayrı 10 µL karışımdan eklenmiştir.

4. Mikroskopta hücrelerin sayımı yapılmıştır.

5. 24, 48, 72 ve 96 saat ölçümlerini yapmak için L-EPS-ACS5 için 4 tane 96 well plate'e kuyu başına 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 µL, 8 tekrar olarak ekim yapılmış ve 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

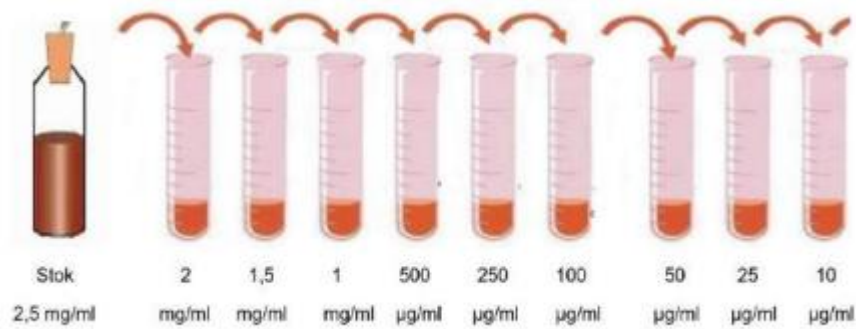


Şekil 3.3. Hücrelerin etüv inkübasyon görüntüsü.

6. 24 saat sonra hücrelerin analize uygunluk durumu mikroskopta incelenmiştir.

7. L-EPS (L-EPS-ACS5) en yüksek konsantrasyon 2,5 mg/mL olacak şekilde besiyerinde çözülmüştür ve 22 µm por büyüklüğündeki milipor filtre ile filtrelenmiştir (Başlangıç konsantrasyonu literatür verileri (Di vd., 2017; Wu vd., 2021) ve besiyerinde çözünen maksimum L-EPS miktarına göre belirlenmiştir).

8. 2,5 mg/mL stok L-EPS (L-EPS-ACS5) çözeltileri final konsantrasyonları 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 10 µg/mL olacak şekilde filtrelenmiş besiyeri ile seri şekilde dilue edilmiştir.

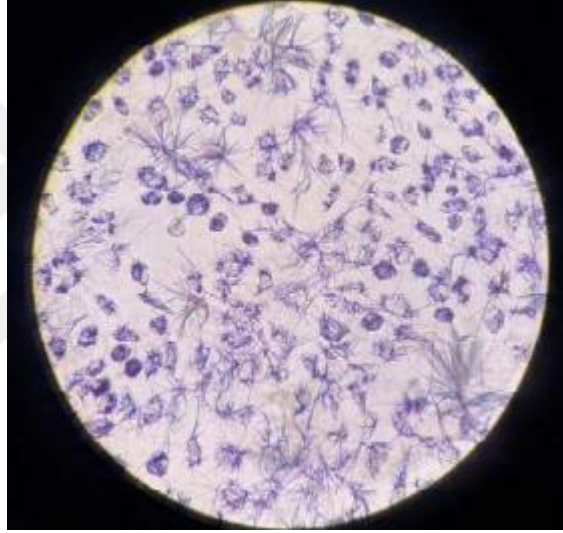


Şekil 3.4. L-EPS'nin seri dilusyonunun şematik gösterimi.

9. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda L-EPS'ler hücrelere 100 μ L olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol kuyularının üzerindeki besiyeri de filtre besiyeri ile değiştirilerek tazelenmiştir.

10. L-EPS eklendikten 24 saat sonra L-EPS-ACS5'in 24. Saat ölçümleri için belirlenen 96 well platelere kuyu başına 11 μ L MTT (5 mg/mL) solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

11. İnkübasyon süresinin sonunda mikroskopta formazan kristalinin oluşumu kontrol edildikten sonra kuyulardaki ortamlar uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 100 μ L analitik DMSO eklenmiştir.



Şekil 3.5. Hücrelerde MTT inkübasyonu sonucu formazan kristalinin oluşumu.

12. DMSO ilave edildikten sonra oluşan renk 492 nm'lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

13. Deneyler 8 tekrarlı olarak yapılmıştır. L-EPS'nin uygulanmadığı kuyular kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve % canlılık kontrol grubu ile kıyaslanarak daha önceki belirtilen şekilde hesaplanmıştır.

14. 24 saat inkübasyon süresi uygulanan deney grubu için yapılan işlemler 48, 72 ve 96 saat inkübasyon uygulanan deney gruplarında da tekrarlanmıştır.

İlk MTT analiz sonuçları; L-EPS'nin HT-29 kolon kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisinin olduğunu göstermiştir. Veriler kontrol grubu (yalnızca besiyeri içeren) hücrelerindeki canlılık %100 kabul edilerek sunulmuştur. Gerçekleştirilen MTT analizinin amacı, L-EPS'nin anti-proliferatif etkisinin değerlendirilmesinin yanı sıra; doz ve süre bazında etki farklılıklarının olup olmadığını belirlemektir. Yüzde canlılık verilerine, GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak tek yönlü (One way) ANOVA ve Tukey testi uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda L-EPS grupları arasında farkın bulunduğu gözlenmiştir ($P<0,05$), diğer sürelerde ise anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($P>0,05$). Bu sonuçlara göre, EPS uygulama doz ve sürelerinin L-EPS-ACS5 için aynı şekilde uygulanması öngörülmüş, deney tekrarı belirtilen doz ve sürelerde gerçekleştirilmiştir.

L-EPS'ye ait IC50 değerlerinin kesin olarak belirlenmesi için gerçekleştirilecek MTT ve XTT analizleri, ilgili konsantrasyonlar (2,5 mg/mL, 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 500 µg/mL) ve süreler için (72. Ve 96.saatler) eş zamanlı olarak yapılmıştır. Ayrıca inhibitör etkinin değerlendirilmesi için 5-FU (50 µg/mL) pozitif kontrol grubu, bu analize de uygulanmıştır. Deney verileri birlikte değerlendirilmiştir.

3.2.3 MTT ve XTT analizleri

1. HT-29 hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılmıştır. Konfluent durumda olan T-25 flaskta HT-29 hücreleri daha önce belirtilen şekilde tripsinize edilmiştir.
2. Thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır.
3. 72 ile 96 saat inkübasyon sürelerindeki uygulamaların XTT ve MTT ölçümlerini yapmak için L-EPS-ACS5 için 4 adet, 96 well platelere kuyu başına 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 µL 6 tekrarlı olarak ekilmiş ve plateler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda (24 saat) hücrelerin konfluent olma durumu mikroskopta incelenmiştir.
5. HT-29 kanser hücreleri üzerinde L-EPS-ACS5'in kontrol hücrelerine kıyasla farklı yüzdelerde anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenen 2,5 mg/mL, 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonları için uygulama yapılmıştır.

6. İnkübasyon süresi sonunda (24 saat) hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak belirtilen dilüsyon konsantrasyonlarında L-EPS'ler hücrelere 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol kuyularının üzerindeki besiyeri de filtre besiyeri ile değiştirilerek tazelenmiştir.

MTT analizi için;

- L-EPS eklendikten 72 saat sonra L-EPS-ACS5'nin 72. saat ölçümleri için belirlenen 96 well platelere kuyu başına 11 µL MTT (5 mg/mL) solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresinin sonunda (3 saat) mikroskopta formazan kristalinin oluşumu kontrol edildikten sonra kuyulardaki ortamlar uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 100 µL analitik DMSO eklenmiştir.
- DMSO ilave edildikten sonra oluşan renk 492 nm'lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.
- Deneyler 6 tekrarlı olarak yapılmıştır. L-EPS'nin uygulanmadığı kuyular kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve % canlılık kontrol grubu ile kıyaslanarak daha önceki belirtilen şekilde hesaplanmıştır.

XTT analizi için;

XTT Cell Viability Assay Kit (Bioitum) kullanılmış olup analiz üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Ön optimizasyon çalışmaları ile başlangıç hücre sayısı ve XTT solüsyonu uygulama süresi belirlenerek analizlere başlanılmıştır. Bu amaçla,

- Kit içeriğinde yer alan 10 mL XTT solüsyonuna 50 µL aktive edici solüsyon eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- Hücrelere L-EPS uygulaması yapıldıktan 72 saat sonra L-EPS-ACS5'nin 72. saat ölçümleri için belirlenen 96 well platelerinin üzerine kuyu başına 33,5 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon süresi sonunda plate 492 nm ve 630 nm’lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.
- Deneyler 6 tekrarlı olarak yapılmıştır. L-EPS’lerin uygulanmadığı kuyular kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve % canlılık kontrol grubu ile kıyaslanarak daha önceki belirtilen şekilde hesaplanmıştır.

MTT analizinin amacı hücrelerin canlılıklarını, mitokondrial dehidrogenaz enziminin aktivitesi ile orantılı olarak ölçmektir. Canlı hücrelerde devam eden mitokondrial aktivite sayesinde formazan kristalleri meydana gelmektedir. Bu formazan kristalleri DMSO gibi çözücülerde çözüldüğünde hücre canlılığıyla orantılı yoğunlukta mor renk oluşmaktadır. MTT analizi sonuçları mikropilaka okuyucuda (ChroMate®ELISA) 492 nm’de alınmıştır. XTT analizi, hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik test, sarı bir tetrazolyum tuzunun (sodyum 3-[1- (fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat veya XTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından portakal rengi formazan boyasına indirgenmesine dayanmaktadır. XTT analizi sonuçları mikropilaka okuyucuda (ChroMate®ELISA) 492 nm/630 nm’de alınmıştır.

L-EPS’lerin HT-29 kanser hücre hattındaki anti-proliferatif etkisinin varlığına ek olarak, belirlenen dozların sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik olup olmadığının değerlendirilmesi, önemli bir ölçüttür. Bu nedenle kanser hücrelerinde (inhibisyon gözlenen doz aralığı dahil) genel doz aralığı için (2,5 mg/mL-10 µg/mL) L929 hücreleri ile sitotoksitenin (biyoyumluluk) analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 L929 Hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi

L929 fare fibroblast hücre hattı, ticari olarak temin edilmiştir. Hücreler yüksek glikoz içeren (4,5 g/L), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS), penisilin/streptomisin ve L-glutamin (2 mM) ile desteklenmiş Dulbecco’s modified Eagle’s Medium (Cegrogen) besiyerinde geliştirilmiştir. L929 hücreleri %5 CO₂’li ortamda 37°C’de kültüre edilmiş ve besiyerleri ekimin 1. gününün sonunda, her 48 saatte bir değiştirilmiştir. Hücreler %80-90 konfluentliğe ulaştıktan sonra %0,05 tripsin/EDTA ile toplanmıştır.

1. L929 fare fibroblast hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılmıştır. Konfluent duruma geldiğinde T-25 flastaki L929 hücreleri daha önce belirtilen şekilde tripsinize edilmiştir.
2. Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır.
3. 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sürelerindeki uygulamaların MTT ölçümleri yapmak için EPS-ACS5 için 4 adet, 96 well platelere kuyu başına 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ L 6 tekrarlı olarak ekilmiş ve plateler 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda (24 saat) hücrelerin analize uygunluk durumu mikroskopta incelenmiştir.
5. HT-29 kanser hücreleri üzerinde uygulaması yapılan L-EPS konsantrasyon aralığı sağlıklı L929 fare fibroblast hücre hattına da uygulanmıştır.
6. İnkübasyon süresi sonunda (24 saat) hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak belirtilen dilüsyon konsantrasyonlarında L-EPS hücrelere 100 μ L olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol kuyularının üzerindeki besiyeri de filtre besiyeri ile değiştirilerek tazelenmiştir.
7. L-EPS eklendikten 24 saat sonra L-EPS-ACS5’in 24. saat ölçümleri için belirlenen 96 well platelere kuyu başına 11 μ L MTT (5 mg/mL) solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon süresinin sonunda (3 saat) mikroskopta formazan kristalinin oluşumu kontrol edildikten sonra kuyulardaki ortamlar uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 100 μ L analitik DMSO eklenmiştir.
9. DMSO ilave edildikten sonra oluşan renk 492 nm’lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.
10. Deneyler 4 tekrarlı olarak yapılmıştır. L-EPS’nin uygulanmadığı kuyular kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve % canlılık kontrol grubu ile kıyaslanarak daha önceki belirtilen şekilde hesaplanmıştır.

11. Aynı işlemler 48, 72 ve 96 saatler için de tekrarlanmıştır.

Çalışma kapsamında; L-EPS'nin (L-EPS-ACS5) antitümöral aktivitelerinin değerlendirilmesi, bu bağlamda da L-EPS'lerin hücre canlılığı ve koloni oluşumu üzerine efektif inhibisyon düzeylerinin belirlenmiş olması, bunun yanı sıra L-EPS-indükte apoptozis varlığının mekanizmasını araştırmak üzere apoptozis belirteci olan gen ekspresyonlarındaki ve protein düzeylerindeki değişimleri Real Time PCR, Western blot analizi ile, hücrelerdeki morfolojik düzeydeki değişimleri ise TEM analizi ile anlamlılığının tespiti amaçlanmıştır.

3.3 Koloni Oluşum Analizi

Bu analiz kapsamında IC₅₀ değerlerinde yapılacak olan L-EPS-ACS5 uygulamasının HT-29 hücrelerinin koloni oluşturmaları üzerine inhibisyon düzeylerinin belirlenmesi '5-FU' pozitif kontrolü ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Koloni oluşumu deneyi için, hücreler 6-well platelere, well başına 2000-3000 hücre yoğunluğunda ekilmiştir ve 24 saat sonra hücreler L-EPS için belirlenen IC₅₀ değerinde L-EPS içeren besiyeri ile 72 ve 96 saat inkübe edilmişlerdir. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda ortam kontrol ve uygulama gruplarında normal besiyeri ile değiştirilmiş ve hücreler 7-10 gün boyunca üretilmişlerdir (Her üç günde bir besiyeri değişimi yapılmış, hücreler kontrol edilmiştir). Süreç sonunda hayatta kalan koloniler %4 paraformaldehit (PFA) ile sabitlenmiştir. Ardından 20 dakika boyunca %1 kristal viyole ile işaretlenmiştir. İşaretlemeden sonra koloniler PBS ile yıkanmış ve welllerin fotoğrafları çekilmiştir (Zhang vd., 2019). Süreci takiben koloniler %15 asetik asit ile çözülmüş, 540 nm'de optik yoğunlukta bir mikroparka okuyucuda (ChroMate®ELISA) ölçülmüştür (Zhang vd., 2019).

Klonojenik deney veya koloni oluşturma deneyi, tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğine dayanan bir in vitro hücre hayatta kalma deneyidir. Koloni en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanmaktadır.

Koloni oluşum analizi esas olarak popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bölünme geçirme kabiliyeti açısından değerlendirmektedir, bu nedenle antitümöral etkinin belirlenmesi sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için de kullanılabilir

3.3.1 Apoptozis ilişkili gen, protein ekspresyonları ve hücre morfolojisi analizleri

Bu basamakta yer alan analizler kapsamında IC₅₀ değerlerinde yapılan L-EPS-ACS5 uygulamasının apoptotik yolda yer alan genlerin RNA ve protein düzeyindeki ifadelerine olan etkisinin yanı sıra, bir diğer apoptozis belirteci olan çekirdek ve hücre morfolojisindeki değişimlerin tespiti çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1 RNA izolasyonu ve Real Time PCR

RNA izolasyonu

IC₅₀ değerleri saptanan L-EPS'nin HT-29 hücrelerinde apoptotik yolda yer alan hedef genlerin ekspresyonları üzerinde meydana getireceği olası değişikliklerinin saptanması amacıyla gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Bu amaçla hücreler IC₅₀ değeri saptanan doz ve sürelerde L-EPS ile inkübe edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için izlenilen Trizol temelli (RiboExTM RNA İzolasyon Kiti) izolasyon protokolü aşağıda verilmiştir.

1. Kontrol ve L-EPS uygulama gruplarındaki hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılarak her 10 cm² kültür kabı alanı için 1 mL RiboExTM eklenmiştir. Çalışmamızda işlemler 6-well plate üzerinden 300.000/well başlangıç hücre sayısı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre lizatına birkaç kez pipetaj yapılmıştır.
2. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
3. 1 mL RiboExTM başına 0,2 mL kloroform eklenmiştir. 15 saniye kuvvetlice çalkalanarak, 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 x'de santrifüjlenmiştir, ardından sulu faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.



Şekil 3.6. RiboEx™ protokolünde faz ayrımı.

(Bu aşamada karışım bir alt katmana, bir ara faza ve renksiz bir üst sulu katmana ayrılmıştır. Üst sulu katman, homojenizasyon için kullanılan RiboEx™ hacminin yaklaşık %50'sidir).

5. İlk homojenizasyon için kullanılan 1 mL RiboEx™ başına 0,5 mL izopropil alkol eklenmiştir ve çözelti 3-5 kez ters çevrilerek hafifçe karıştırılmıştır.

6. Örnekleri oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

7. 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenmiş ve süpernatantı atılmıştır.

(Bu aşamada çökeltilmiş RNA, tüpün yanında ve altında jel benzeri veya beyaz bir pelet oluşturur. Verimi artırmak için numune gece boyunca -20°C'de bekletilmiştir).

8. RNA peletini yıkamak için 1 mL RiboEx™ başına 1 mL %75 etanol eklenmiştir.

9. Örnekler 5 dakika boyunca 7.500 x g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice atılmış ve RNA peleti 5 dakika boyunca laminar flowda kapağı açık biçimde kurutulmuştur.

(RNA peleti bu noktada çok gevşektir ve peleti kaçırmamak için dikkatli davranılmalıdır. Çözünürlüğünü büyük ölçüde azaltacağından RNA peleti tamamen kurutulmamalı, ancak sonraki işlemler için de etanol kalıntısı bırakılmamaya özen gösterilmelidir).



Şekil 3.7. RiboEx™ protokolünde RNA pelet oluşumu.

10. 56°C’de 10 ~ 15 dakika inkübe edilerek RNA’yı 50 µL DEPC (Dietil pirokarbonat) ile muamele edilmiş suda çözündürülmüştür. Total RNA’nın kantitatif olarak değerlendirilmesi için Jenway (Genova Nano) cihazı kullanılmıştır. Total RNA’nın 260/280 nm’de absorbands değerlerine bakılarak total RNA’nın miktarı ve saflığı saptanmıştır. Kantitasyonu yapılan total RNA’lar cDNA sentezi yapılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır. Elde edilen RNA’ların miktar ve saflık parametreleri Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Elde edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık değerleri.

Örnek tipi	Miktar (ng/ µL)	A260/A280 (Absorbans)	A260/A230 (Absorbans)
Kontrol	704,185	1.93	2.16
ACS5 RNA	258,18	1.97	2.20

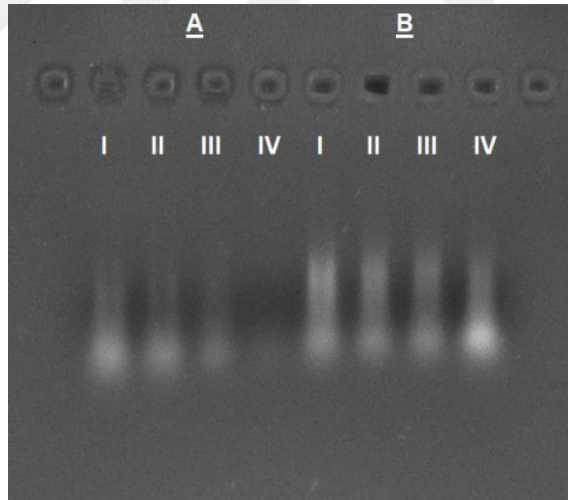
cDNA sentezi

Kontrol ve L-EPS uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen total RNA’lardan ekspresyon analizi yapmak için cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için GeneAll HyperScriptFirst Strand Synthesis Kit (Katalog: 601-005) kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak her bir gruba ait örneklerin 1 µg RNA’sından cDNA elde edilmiştir (A). cDNA sentezi için izlenilen protokol aşağıda verilmiştir. cDNA örnekleri gen ekspresyon analizine kadar -20°C’de saklanmıştır. cDNA örneklerinin % 1’lik agaroz jel görüntüsü Şekil 3.8.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.

	A	B
dNTP	1 µL	1,5 µL
Oligo dT	0,5 µL	1 µL
Random hexamer	0,5 µL	1 µL
Total RNA (1 µg)	--- (örneğe göre değişmektedir)	--- (örneğe göre değişmektedir)
dH ₂ O	15 µL'ye tamamlanmıştır.	20 µL'ye tamamlanmıştır.

Her bir örnek için 0.2 mL steril PCR tüplerinin içerisine belirtilen reaksiyon karışımları hazırlanarak, 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiş, ardından en az 1 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından reaksiyon karışımları üzerine 2 µl 10x revers transkriptaz (RTaz) buffer, 2 µl DTT, 1 µl ters transkriptaz enzimi ve 1 µl Rnaz eklenerek 3-4 sn mikrosantrifüj edilmiştir. PCR tüpleri PCR cihazına alınarak, sıcaklık protokolü; 55°C'de 60 dakika ve 85°C 5 dakika şeklinde uygulanmıştır. cDNA örnekleri gen ekspresyon analizine kadar -20°C'de saklanmıştır. Çalışmalara B grubu örnekleri ile devam edilmiştir.



Şekil 3.8. cDNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü (A, B iki farklı koşulda gerçekleştirilen reaksiyonu işaret etmektedir).

Real-Time PCR

Elde edilen cDNA'lardan araştırılması planlanan genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla Real-Time PCR (Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır. Reaksiyonlar LongGene Q2000A Real-Time PCR ve A.B.T.TM 2X qPCR

SYBR-Green MasterMix kullanılarak, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Survivin genleri için gerçekleştirilerek koşullar optimize edilmiştir. Tüm reaksiyonlar üç tekrarlı yapılmıştır. Hedef transkriptleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile normalleştirmek için, iç kontrol olarak β -aktin geni kullanılmıştır (Riaz Rajoka, Mehwish, vd., 2019). Çalışılan GAPDH primerleri ile sonuç alınamaması sebebiyle β -aktin internal kontrolüne geçilmiştir.

Ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.3.'te, reaksiyon karışımları Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Reaksiyon döngüleri ise Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Real-Time PCR'da kullanılan primer dizileri.

Gen	Dizi (5'-3')	Amplikon boyutu	Referans Çalışma
Bax F	TTCTGACGGCAACTTCAACT	117	(Tukenmez, Aktas, Aslim, ve Yavuz, 2019)
Bax R	CAGCCCATGATGGTTCTGAT		
Bcl-2 F	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	125	(Eroğlu vd., 2018)
Bcl-2 R	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA		
Kaspaz-3 F	GCGAATCAATGGACTCTGGA	148	(Tukenmez vd., 2019)
Kaspaz-3 R	TTTGCTGCATCGACATCTGTA		
Kaspaz-9 F	CGACCTGACTGCCAAGAAA	153	(Eroğlu vd., 2018)
Kaspaz-9 R	CATCCATCTGTGCCGTAGAC		
Survivin F	CCACCGCATCTCTACATTCA	116	(Tukenmez vd., 2019)
Survivin R	CCAAGTCTGGCTCGTTCTC		
Beta-aktin F	TCCCTGGAGAAGAGCTACG	131	(Shirafkan vd., 2019)
Beta-aktin R	GTAGTTTCGTGGATGCCACA		

Çizelge 3.4. Real-Time PCR protokolüne göre reaksiyon içerikleri.

A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix	10 μ L
Forward primer	1 μ L
Reverse primer	1 μ L
cDNA kalıbı	2 μ L
dH2O	20 μ L'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR koşulları.

PCR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	60	45 saniye	
Erime Eğrisi	65-95	2-5 saniye/basamak	1

3.3.1.2 Western Blot analizi

L-EPS-ACS5 uygulaması yapılan ve yapılmayan hücrelerden 72. saat için toplanan total protein örnekleri (Tukenmez vd., 2019), protokolüne göre Western blot analizine alınmıştır. Kısaca, HT-29 hücreleri 1×10^6 hücre yoğunluğunda T25 (Sarstedt, Leicester, UK) flasklarına ekilmiştir. 24 saat sonra kontrol grubunun besiyeri normal besiyeri ile değiştirilmiş, uygulama grupları IC_{50} konsantrasyonunda L-EPS-ACS5 içeren besiyerleri ile değiştirilerek her iki grup 72 saat inkübe edilmiştir. Total protein izolasyonu ProtinEx (GeneAll, Seoul, Korea) solusyonu protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 5 dakika buz üzerinde solusyon ile muamele edildikten sonra toplanarak, hücre debrisinin uzaklaştırılması için 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılarak kullanıma kadar 4°C’de saklanmıştır. Protein ölçümü Qubit® Protein Assay Kits (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) ile gerçekleştirilmiştir. Protein lizatları %4-12’lik Bis-Tris gradient jeli (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Paisley, UK) jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kiti ile (Invitrogen, Paisley, UK) membrana aktarılmıştır. Protein bandlarının moleküler ağırlıkları ChemiDoc-It UVP cihazı (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) ile görüntülenmesinin ardından, protein markerı (Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir (Riaz Rajoka, Mehwish, vd., 2019). İlgili genlerin ekspresyon paternleri protein spesifik antikolar (Affinity Biotech) ve kontrol olarak kullanılan β -aktin (Affinity Biotech) ile Image J ile yapılan normalizasyonla belirlenmiştir.

3.3.2 Apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi

3.3.2.1 Hoescht 33258 ile hücre çekirdek boyaması

Hücre çekirdeğinde apoptotik değişimlerin belirlenebilmesi için, kontrol ve L-EPS-ACS5 uygulama gruplarına ait hücre çekirdekleri, Hoescht 33258 (Merck, Gillingham, UK) ile işaretlenmiştir. Analiz Qu vd. 2019 protokolüne benzer şekilde gerçekleştirilmiş, kısaca 24-well'e (Sarstedt, Leicester, UK) yerleştirilen coverslipler (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) üzerine ekim yapılmış, 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak kontrol grubunun besiyeri tazelenmiş, uygulama gruplarına IC₅₀ konsantrasyonunda L-EPS-ACS5 eklenmiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 1x PBS yıkaması ve ardından %4 (v/v) paraformaldehit (Merck, Gillingham, UK) ile 15 dakika fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler 10 dakika 1 µg konsantrasyonda Hoechst 33258 ile inkübe edilmiştir. Fazla boyanın uzaklaştırılması için tekrar 1x PBS yıkaması yapılarak coverslipler (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) lam üzerine kapatılarak, Zeiss Axioscope (LSM Pascal, Carl Zeiss, Germany) flouresan mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir.

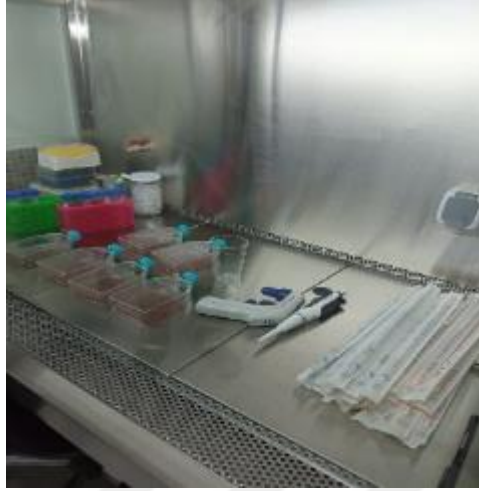
3.3.3.2 TEM analizi

L-EPS-ACS5 ile inkübe edilmiş HT-29 kolon kanseri hücrelerinin görüntüleri, transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilmiştir. Hücreler, yukarıdaki analizlerde belirtilen doz ve sürede ilgili L-EPS-ACS5 uygulaması yapıldıktan sonra toplanarak 4°C'de 2 saat boyunca sabitlenmiştir. Hücreler daha sonra oda sıcaklığında 1 saat post-fiksasyona uğratılmış ve 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından dereceli bir metanol serisi kullanılarak dehidre edilmiş ve sonra bir epoksi reçinesine gömülmüştür. Ultrathin bölümleri, bir ultra-mikrotom kullanılarak kesilmiş ve kurşun sitrat ile birlikte uranil asetatla işaretlenmiştir, işaretlenmiş bölümler daha sonra 100 kV'lık bir hızlanma gerilimi ile TEM (JEOL 1220 JEM) kullanılarak görüntülenmiştir (Di vd., 2017).

EPS uygulamalarının HT-29 kanser hücre hattında apoptoz belirteci olan hücresel değişimlerini indükleyip indüklemediğine yönelik olarak gerçekleştirilen analizlerde, L-EPS ile inkübe edilmiş HT-29 kolon kanseri hücrelerinin TEM görüntüleri, ESOĞÜ ARUM'dan hizmet alımı gerçekleştirilerek elde edilmiştir.

Uygulanan protokol aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

1. Analiz sürecinde hücre kayıpları göz önüne alınarak çalışma T75 flasklarında gerçekleştirilmiş, flask başına 2×10^6 hücre ekilmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. TEM örnek hazırlama sürecine ilişkin laminar flow görüntüsü.

2. 24 saat sonra kontrol grubunun besiyeri tazelenerek, uygulama gruplarına L-EPS'ler için belirlenen IC 50 değerlerinde L-EPS içeren besiyerleri ile uygulama yapılmıştır.

3. İnkübasyon süresi sonunda (72 saat) hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak falkon tüplere aktarılmış PBS (1,5 mL) ile 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak tekrar PBS eklenmiştir ve 2 kez 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Ardından pelet üzerine 0.1 M PBS içerisinde %2.5 Gluteraldehit (2 mL) ilave edilmiş ve hücreler 1 gece boyunca 4°C'de fiksasyona bırakılmıştır.

6. Birincil fiksasyon sonrası hücreler 2 kez PBS yıkaması yapılarak santrifüj edilmiştir (1000 rpm; 5 dakika).

7. Son aşamada 3.kez PBS eklenerek 4°C'de tutularak post fiksasyona hazırlanmışlardır.

8. Hücreler daha sonra oda sıcaklığında 1 saat süresince %1 osmiyum tetroksit (OSO₄) ile post-fiksasyona uğratılmış ve PBS ile yıkanmıştır.

9. Hücreler dereceli bir metanol serisi kullanılarak dehidre edilerek bir epoksi reçinesine gömülmüştür.

10. Ultra-thin bölümleri, ultra-mikrotom kullanılarak kesilerek ve kurşun sitrat ile birlikte uranil asetatla işaretlenmiştir, işaretlenmiş bölümler daha sonra 100 kV'lık bir hızlanma gerilimi ile TEM kullanılarak hizmet alımı ile görüntülenmiştir (Di vd., 2017) .

3.4 İmmunostimülatör Etki Analizleri

Makrofajlar konakçı immün savunma sisteminde çeşitli enfeksiyonlara ve kansere karşı önemli rol oynamaktadır (Wang vd., 2018). RAW 264.7 hücreleri normal makrofaj fonksiyonlarını yansıtabilen bir makrofaj hücre hattı olarak, L-EPS'lerin immunostimülatör etki araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda bu hücrelerin, L-EPS-ACS5 aracılı çoğalma ve fagositoz kabiliyeti, nitrik oksit üretimi değerlendirilmiştir.

3.4.1 Hücre kültürü

RAW 264.7 hücreleri HT-29 için belirtilen bileşimde DMEM (Biological Industries, Cromwell, USA) besiyeri ile 37°C %5 CO₂ koşullarında yetiştirilmiştir. Hücreler, konfluentlikleri %70'e ulaştığında 37°C'de 5 dakika boyunca tripsin (0.25%)/EDTA (0.05%) (Biological Industries, Cromwell, USA) uygulamasını takiben scraper (GeneDirex, Inc) kullanılarak toplanmış, her 2 ila 3 günde bir 1:4 seyreltilerek pasajlanmıştır (Xiu vd., 2018).

Dondurulmuş hücrelerin açılması

- -80°C'den alınan hücreler, +4°C'de çözündürülür.
- Tüp içerisindeki hücreler 15 mL'lik falkon tüpe alınmış ve üzerine 5 mL complete besiyeri eklenmiştir. Bu aşamada nazik olmak ve hızlı davranmak önemlidir.
- 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Besiyeri dikkatli şekilde uzaklaştırılmış ve üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir.

- Falkon tüpün dibine hafifçe vurulmuştur. Böylece hücreler homojenize olarak birbirinden ayrılmıştır.
- 1 mL hücre süspansiyonu bir adet 25 cm² 'lik hücre kültürü kaplarına ekilmiştir (Kültür kapları içerisine 5 mL besiyeri konularak hazırlanmıştır).

Hücrelerin pasajlanması

- 25 cm² 'lik hücre kültürü kaplarında bulunan konfluent hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler 3 ml taze besiyeri ile kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak homojenize edilerek toplanmıştır.
- 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Ardından çalışmaya uygun dilüsyonlarda pasajlanmıştır.

Hücrelerin dondurulması

- Hücreler pasaj için uygun prosedür izlenerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Hücre peleti dondurma besiyerinde süspanse edilip 1.8 mL'lik kriyotüplere 1 mL olarak paylaştırılmıştır.

– Dondurma besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir.

- 5 mL DMSO
- 35 mL RPMI
- 10 mL FBS karıştırılarak hazırlanmış ve filtrasyon ile steril edilmiştir.

3.4.2 Makrofaj proliferasyon analizi

RAW 264.7 hücreleri 96 well plate'e (Sarstedt, Leicester, UK) well başına 1.10^4 hücre konsantrasyonunda ekilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler, L-EPS-ACS5'in belirlenen konsantrasyon aralığı (75, 150, 300 ve 600 µg/mL) ile 24 saat süre

inkübe edilmiş ve klasik MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbanslar, uygulama yapılmayan kontrol kuyucuklarına göre değerlendirilerek proliferatif etki belirlenmiştir (Xiu vd., 2018).

3.4.3 Fagositoz aktivitesinin belirlenmesi

RAW 264.7 hücreleri, 96 well plate'e (Sarstedt, Leicester, UK) well başına hücre konsantrasyonunda ekilmiş ve gece boyu inkübasyonun ardından hücreler L-EPS-ACS5'in belirlenen konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra analizler EZcount™ Neutral Red Cell Assay (HiMedia Laboratories, Maharashtra, India) kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Absorbans 490 nm'de mikropate okuyucu ile ölçülmüştür (Xiu vd., 2018). Absorbanslar, uygulama yapılmayan kontrol kuyucuklarına göre değerlendirilerek fagositik aktivite belirlenmiştir.

3.4.4 Nitrik oksit (NO) üretimi

96 well plate'e (Sarstedt, Leicester, UK) well başına 1×10^4 hücre konsantrasyonunda ekilen RAW 264.7 hücreleri, gece boyu inkübasyonun ardından belirlenen konsantrasyonlarda L-EPS-ACS ile 24 saatlik süre boyunca işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra koşullandırılmış ortam, üreticinin protokolüne göre Promega Griess Reaktif Sistemi (Wisconsin, USA) kullanılarak toplanmış ve analiz edilmiştir (Xiu vd., 2018). Sonuçlar uygulama yapılmayan kontrol kuyucuklarına göre değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

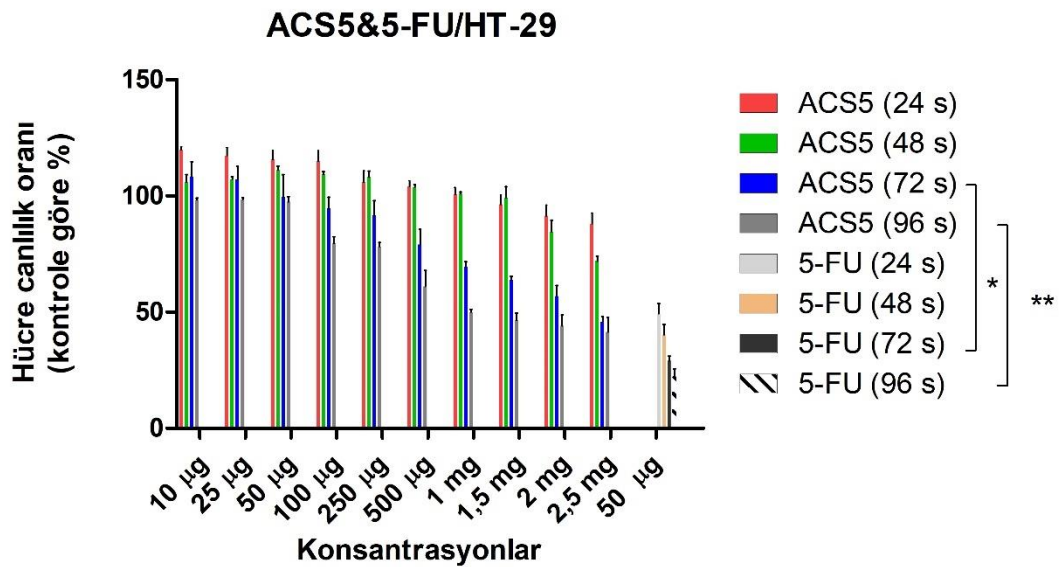
4.1 Antiproliferasyon Analizi

4.1.1 L- EPS için kullanılacak çözücünün belirlenmesi

Kontrol ve uygulama gruplarından 24 saat süre sonunda alınan sonuçlara göre; normal besiyeri kuyucuğu için canlılık oranı %100 olarak belirlenmiştir. Filtre besiyeri, otoklavlanmış besiyeri, PBS ve fosfat tamponu ile inkübe edilen hücrelerde 24 saat sonrasında canlılık sırasıyla $99,83 \pm 0,56$, $46 \pm 0,89$, $35 \pm 1,13$ ve $28 \pm 1,67$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonuçlarına göre L-EPS'nin çözücüsü filtre besiyeri olarak belirlenmiştir. Hücre morfolojisi ve 24 saatlik süre sonunda MTT analizi ile belirlenen optik yoğunluğa göre kuyucuklara 2×10^4 hücre olarak şekilde başlangıç ekimi yapılacağına karar verilmiştir.

4.1.2 L-EPS'nin HT-29 hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi için uygun doz aralıklarının belirlenmesi

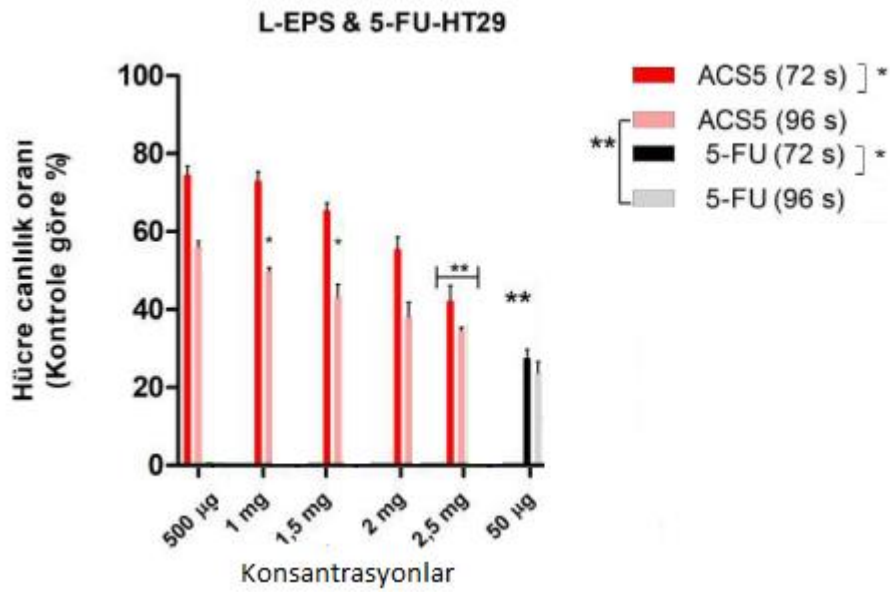
Analiz sonuçları değerlendirildiğinde yapılan hesaplamalara ek olarak 5-FU uygulaması için kontrol grubuna göre inhibisyon hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. L-EPS-ACS5 ile farklı konsantrasyon ve süre aralıklarında yapılan MTT analiz sonuçlarının 5-FU ile birlikte değerlendirilmesi (HT-29) (*, ** ; $P < 0,05$).

Bu sonuçlara göre L-EPS-ACS5 için 72. ve 96. saatlerde 5-FU'nun IC50 değeri olan 50 µg/mL konsantrasyonuna anlamlı düzeyde yakın anti-proliferatif etki gözlenmiştir ($P<0,05$). Verilerin süre ve doz bakımından 5-FU ile karşılaştırılması için, iki yönlü (Two way) ANOVA ve Bonferroni testi gerçekleştirilmiştir. L-EPS-ACS5 için 72.saatte 2,5 mg/mL, 96. saatte ise 2,5, 2, 1,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda görülen anti-proliferatif etkinin pozitif kontrole karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

4.1.3 MTT ve XTT analizleri



Şekil 4.2. L-EPS-ACS5'ler için belirtilen konsantrasyon ve 72. ve 96.saatlerde yapılan MTT-XTT analiz sonuçlarının 5-FU (50 µg/mL) ile birlikte değerlendirilmesi (HT-29) (*, ** ; $P<0,05$).

Verilere tek yönlü (One way) ANOVA ve Tukey testi uygulanmış, gerçekleştirilen analizlerde L-EPS-ACS5 için 72. ve 96. saatlerde 5-FU'nun IC50 değeri olan 50 µg/mL konsantrasyonuna anlamlı düzeyde yakın anti- proliferatif etki gözlenmiştir ($P<0,05$). Verilerin süre ve doz bakımından 5-FU ile karşılaştırılması için ise, iki yönlü (Two way) ANOVA ve Bonferroni testi gerçekleştirilmiştir. 2,5 mg/mL uygulama konsantrasyonu için tüm L-EPS'lerde 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinde, 5-FU ile karşılaştırma yapıldığında hücre canlılığının anlamlı düzeyde inhibe olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). 2 mg/mL uygulama konsantrasyonunda, L-EPS-ACS5 için 96. saatteki inhibisyon, pozitif kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). 1,5 mg/mL

konsantrasyonu için anlamlılık yalnızca 96 saatlik inkübasyon süresi için geçerlidir. Ayrıca, 96 saatlik inkübasyonda, L-EPS-ACS5 1 mg/mL uygulama konsantrasyonu için canlılık düzeylerindeki inhibisyonun 5-FU uygulamasına anlamlı düzeyde yakın olduğu bulunmuştur ($P<0,05$).

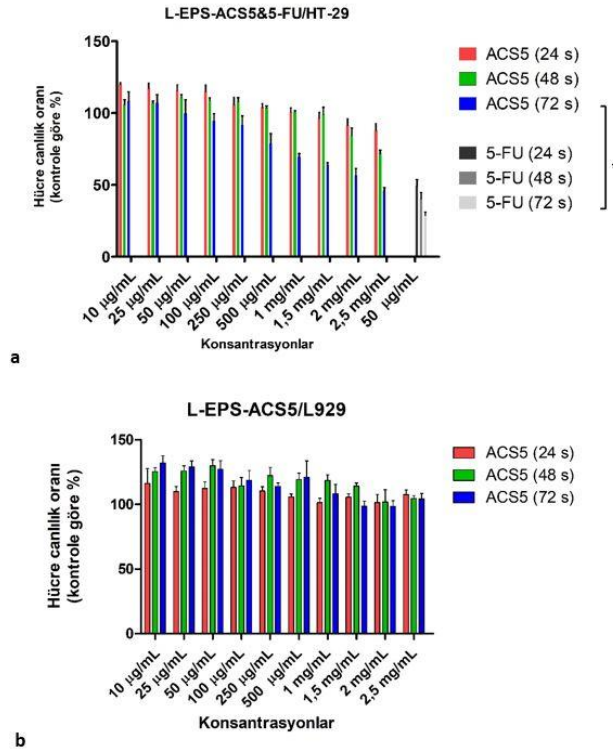
Elde edilen tekrarlı MTT ve XTT sonuçlarına göre Graphpad programı ile doz yanıt eğrisi çizilerek IC50 değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. L-EPS-ACS5 için 72. ve 96. saatlerdeki IC50 değerleri (mg/mL).

L-EPS Tipi	72. saat (IC50)	96. saat (IC50)
L-EPS-ACS5	2,35±0,173	0,864±0,071

4.1.4 L929 Hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi

L-EPS-ACS5 için “10 µg/mL-2,5 mg/mL” konsantrasyon aralığında 24,48 ve 72. saatlerde MTT analizi yapılmıştır. Bu analizde kontrol grubu olarak üzerinde yalnızca filtre DMEM besiyeri bulunan hücreler seçilmiştir. Hücre canlılık sonuçları (MTT sonuçları), “10 µg/mL-2,5 mg/mL” konsantrasyon aralığında L-EPS (L-EPS-ACS5) 24, 48 ve 72. saatlerde L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği kontrol gruplarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin tümünün ~%70 sınır değerinin üzerinde olması ile ortaya konmuştur. Inkübasyon sürelerine bağlı olarak EPS grupları arasında hücrel toksisite açısından farklılık olup olmadığı GraphPadPrism 5.0 programı kullanılarak tek yönlü (One way) ANOVA ve Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Tüm inkübasyon sürelerinde L-EPS’ler arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Uygulama dozları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). İlgili analizlere ait sonuçlar Şekil 4.3.’de verilmiştir.



Şekil 4.3. (a); Farklı konsantrasyon ve sürelerde L-EPS-ACS5 ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinin hücre canlılıklarının (% kontrole göre) 5-FU ile karşılaştırılması (b); Farklı konsantrasyon ve sürelerde L-EPS-ACS5 ile inkübe edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları (% kontrole göre) (* $P \leq 0.05$).

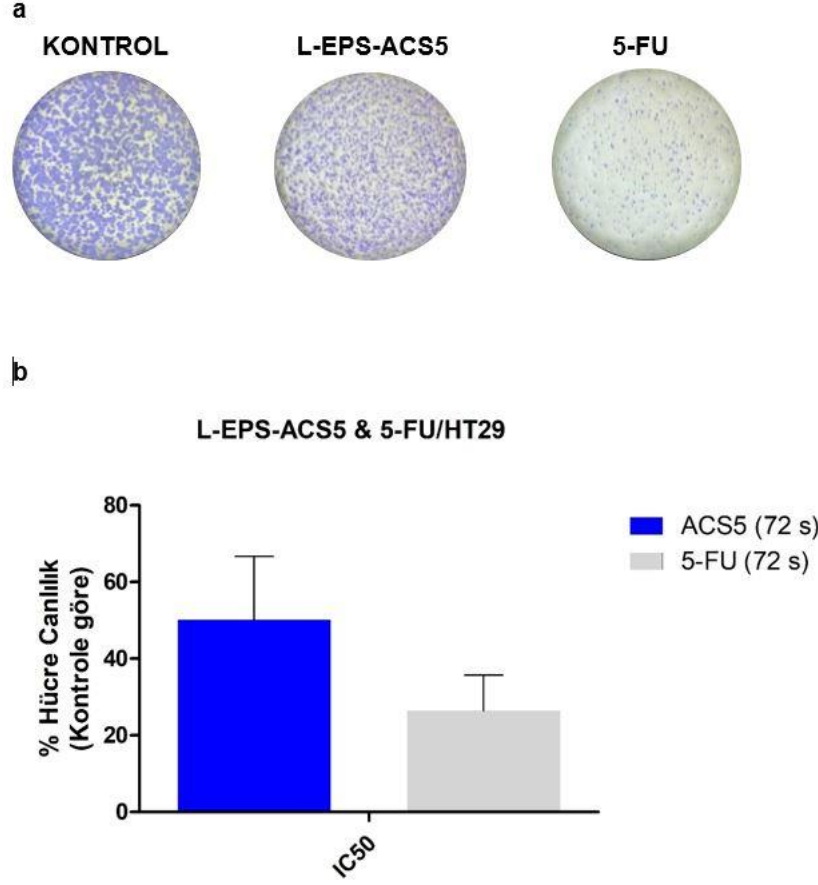
Laktik asit bakterilerinden ekstrakte edilen EPS'lerin çeşitli tümör hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak anti-proliferatif etki gösterdiği bilinmektedir. En çok çalışılan tümör hücre hattı bağırsaktır, bunu karaciğer ve meme hatları izlemektedir. Bununla birlikte meme, mide, serviks, pankreas ve gırtlak kanser hatlarında da çalışmalar bulunmaktadır. Farklı LAB'lar tarafından üretilen EPS'lerin tümör hücrelerinde %50 proliferasyon inhibisyonuna neden olan konsantrasyonun (IC₅₀), geniş aralık gösterdiği bildirilmiştir. Farklı kanser hücre hatlarında uygulaması yapılan çoğu EPS için IC₅₀ değerinin yaklaşık 1 mg/mL olduğu belirtilmiştir. EPS'nin tümöre karşı en yüksek IC₅₀'si *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496'dan ekstrakte edilen EPS ile larinks karsinomu (HEP2) hücre hattında belirlenen 34,7 mg/mL'dir (Haroun vd., 2013). *Lactobacillus casei* SB27'den saflaştırılmış yüksek moleküler ağırlıklı LW1 ekzopolisakkarit fraksiyonunun HT-29 hücrelerinde 0,01–0,05 mg/mL ile en düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Di vd., 2017). Bununla birlikte bağırsak kökenli hücre hatlarında daha tutarlı inhibisyon sonuçları elde edilmiştir, bu durum EPS'lerin

kolorektal kanser tedavisinin kullanımı için uygun olabileceğini göstermektedir (Ayyash vd., 2020; Wei vd., 2019). EPS'lerin kanser tedavisinin kullanımı, insan bağırsağında yaygın olarak bulunan probiyotik LAB'ların EPS'lerinin bağırsak kanser yüzey reseptörlerine bağlanma olasılığı daha yüksek olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte çoğu EPS'nin normal hücrelere, tümör hücrelerinden daha az (Choi vd., 2006; Mojibi, 2018; Wei vd., 2019) (Haroun vd., 2013) ya da hiç toksisite göstermediği (Das ve Goyal, 2014; Liu vd., 2011) bildirilmiştir.

Bu amaçla gerçekleştirilen MTT analizi ile IC₅₀ değerleri (mg/mL); 72. saat için L-EPS-ACS5 için 2,35±0,173 olarak bulunmuştur. 96. saatte L-EPS için belirlenen değer 0,864±0,071 şeklindedir. Bu IC₅₀ değeri literatürde HT-29 hücre hattı üzerine belirtilen değerlerle uyumluluk göstermektedir. Bu nedenle çalışılan L-EPS'nin antikanser potansiyelleri olduğu açıkça ortaya konmuştur. Çalışmamız kapsamında 2,5 mg/mL konsantrasyonundaki maksimum dozda (96 saat) HT-29 kanser hücrelerinde canlılık oranı %30 düzeyinde iken, aynı doz için L929 hücrelerinde canlılık oranı %80'in üzerindedir. 72. saat için L-EPS uygulanan HT-29 hücrelerinde canlılık %50 dolayında iken, sağlıklı fibroblast hücrelerinde canlılık %85'in üstündedir. Bu nedenle çalışmada yer alan L-EPS-ACS5 için selektif inhibisyon söz konusudur.

4.2 Koloni Oluşum Analizi

Verilere tek yönlü (One way) ANOVA ve post-hoc Tukey testi uygulanmış; uygulanan L-EPS'nin HT-29 hücrelerinin koloni oluşumunu IC 50 uygulamasına karşılık şekilde kontrol grubuna göre inhibe ettiği belirlenmiştir. Ancak inhibisyon düzeyleri arasında L-EPS ve 5-florourasil (5-FU) uygulamaları bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0.05).



Şekil 4.4. (a); L-EPS-ACS5 uygulamasının 72. saat için koloni oluşum analizi 6-well plate görüntüleri. (b); L-EPS-ACS5 uygulamalarının 72. saat için koloni oluşum analizi % canlılık sonuçları (kontrolle göre).

4.2.1 Apoptozis ilişkili gen, protein ekspresyonları ve hücre morfolojisi analizleri

4.2.1.1 RNA izolasyonu ve Real Time PCR

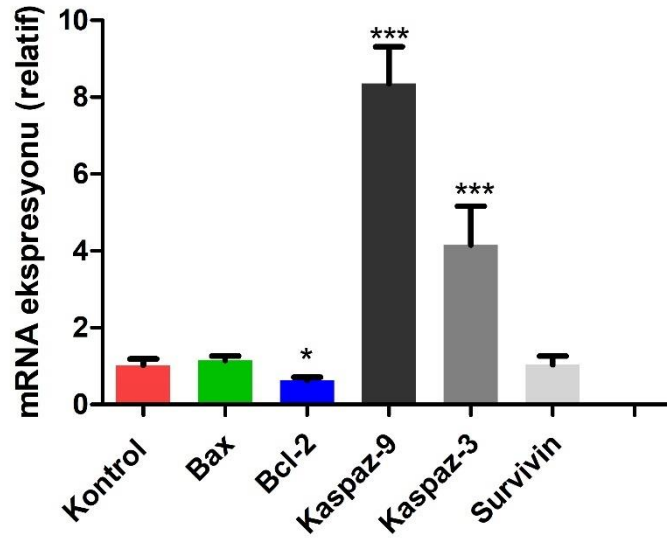
L-EPS-ACS5 ile muamele edildikten sonra tümör hücrelerinin, vakuolasyon, sitoplazma yoğunlaşması, nükleus parçalanması ve kromatin yoğunlaşması gibi karakteristik apoptotik morfolojiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca çekirdeği çevreleyen apoptotik cisimler ve şişmiş mitokondri de gözlemlenebilmektedir (Di vd., 2017; Wei vd., 2019; Wu vd., 2016).

L-EPS kaynaklı apoptozun altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak için, Lactobacillus kökenli L-EPS ile uygulama yapılan HT-29 hücrelerinde apoptoz belirteci olan genlerin ekspresyonundaki değişim araştırılmıştır. Bu amaçla apoptotik yol ile ilişkili Bax, Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Survivin genlerinin hem nispi gen

ekspresyonunu hem de protein ekspresyonu ilgili L-EPS'lerin 72 saatlik uygulamaları için değerlendirilmiştir. Bcl-2, hücre ölümünü ve hücre hayatta kalmasını düzenleyen büyük bir protein ailesidir. Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondri aracılı apoptotik yolda önemli bir rol oynar ve mitokondriyal dış zar yapısının bütünlüğünü kontrol eder (Adams ve Cory, 2018). Bu çalışmada, anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2, pro-apoptotik bir protein olan Bax olmak üzere Bcl-2 familyasından iki protein incelenmiştir. Bu sayede L-EPS'nin etkisi hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik düzeyde Bcl-2 ailesi proteinlerinin analizi ile gerçekleştirilmiştir. Apoptoz herhangi bir ajan tarafından indüklendiğinde, Bax proteinleri sitoplazmadan mitokondriyal dış zara ulaşır. Aynı zamanda, Bcl-2 gibi anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal membrana transferleri önlemek için Bax'a bağlanır. Bu nedenle apoptoza uğrayan bir hücrede Bax geninde artış ve Bcl-2 geninde azalma olması beklenir. Bax/Bcl-2 oranı, bu nedenle, apoptotik sistemde hücrelerin kaderini belirlemek için kullanılabilir (Tukenmez vd., 2019).

Bu çalışmada L-EPS-ACS5 uygulama gruplarında Bcl-2 gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalma gözlenirken, Bax gen ekspresyonundaki artış kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. Hücre ölümünde rol alan moleküllerin çoğu kaspazlar tarafından kontrol edilir. Apoptotik kaspazlar iki kategoride gruplandırılabilir; (1) apoptozu başlatan kaspazlar, bunlar Kaspaz 2, 8, 9 ve 10'dur; (2) efektör Kaspazlar 3, 6 ve 7 (Wu vd., 2014). Çalışmamızda L-EPS'lerin HT-29 hücrelerinde kaspaz genlerini kodlayan genlerdeki etkisi başlatıcı Kaspaz 9 ve efektör Kaspaz 3 için değerlendirilmiştir.

Kaspaz 3 ve 9 ekspresyonunda L-EPS-ACS5 uygulanan gruplarda önemli derecelerde artış gözlenmiştir. Survivin, apoptoz inhibitör ailesinin bir üyesidir ve Kaspaz 3 ve 9'u inhibe eder (Tukenmez vd., 2019). Bu çalışmada L-EPS için Survivin gen ekspresyonundaki azalma kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. L-EPS-ACS5 uygulaması sonucu apoptotik yolda yer alan genlerde mRNA düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri (*; $P < 0.05$, ***; $P < 0.001$).

Apoptozun merkez mekanizmasında sistein aspartile özgü proteazlar bulunur. Dışsal veya ölüm reseptörü yolu (ekstrinsik) ve içsel veya mitokondriyal yol (intrinsik yol), kaspazları aktive eden ve apoptoza yol açan iki yoldur. Ekstrinsik yolda, FAS dahil hücre ölüm sinyalleri (ölüm ligandı) ligand (FASL), tümör nekroz faktörü (TNF) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL), FAS ve TNF reseptörleri gibi ölüm reseptörleri ile birleşir (TNFRS/DRS). Daha sonra FAS ile ilişkili ölüm alanını içeren adaptör proteinler (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) alınır. Bu yol aracılığıyla kaspaz-8 ve ardından kaspaz-3 aktive edilir (Pfeffer ve Singh, 2018). (Zhou vd., 2017) *L. plantarum* NCU116 (EPS116) izolatının, FAS ve onun ligandı FASL'nin transkripsiyon ve translasyonunu TLR2/MyD88/TRAF6/MKK7/JNK/c-Jun yolağı aracılığı ile spesifik olarak aktive ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmada *Tnfr1*, *Tnfr2*, *Dr3* ve *Dr5* dahil olmak üzere değerlendirilen tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörlerinin gen ekspresyonunda önemli bir değişiklik bulunamamıştır. EPS116 uygulaması yapılan CT26 hücre hattında (fare epitelyal kolorektal hücre hattı) *Apaf1*, sitokrom c (*Cyts*), *Bcl-2* ve *Bax* ekspresyon seviyelerinde belirgin bir fark gözlenmemiştir ve bu dört molekül, intrinsik yolda işlev gören anahtar elementlerdir.

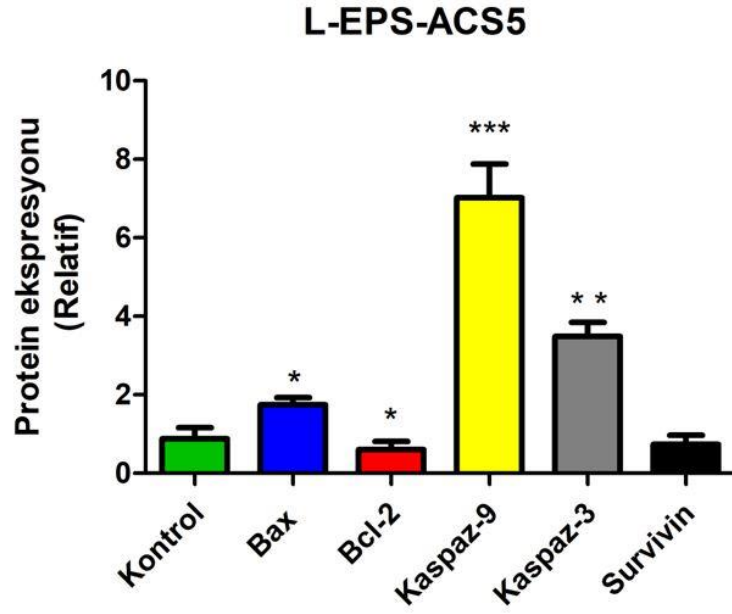
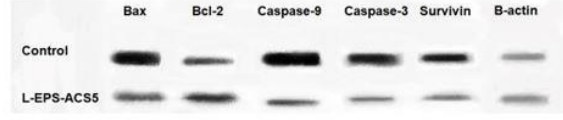
Bununla birlikte mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi için ekstrinsik yolda yer alan tüm reseptör, ligand ve adaptör genler, *Parp1* ve *Rock 1* gibi kaspaz-3'ün alt

yolağında yer alan gen ekspresyonlarının yanı sıra, alternatif ölüm yolları (otofaji ilişkili genler) ve DNA tamir mekanizmasında yer alan genlerin Lactobasillus L-EPS'lerinin anti-tümöral etkilerinde instrinsik yolağı kullanabileceğine yönelik önemli kanıtlar mevcuttur. B-cell lenfoma 2 (BCL2) protein ailesi instrinsik apoptotik yolağı başlatır. Bu protein ailesi üç gruba ayrılmaktadır: (1) BCL2, BCL2L1, BCL2L2 gibi anti-apoptotik proteinler, (2) BAD, BIM, BID, BECLIN1 gibi pro-apoptotik proteinler, (3) BAX ve BAK benzeri pro-apoptotik proteinler (Shamas-Din vd., 2011). İlk iki grup, son grupta yer alan proteinlerin ifadesini antagonistik olarak düzenler. BAX/BAK aktivasyonu mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna neden olur. CYCS gibi intermembran proteinleri salınarak apoptozom oluşumuna neden olur. Apoptozom içinde Kaspaz-9, Kaspaz-3'ü aktive ederek süreci ilerletir (Pfeffer ve Singh, 2018). L-EPS uygulaması yapılan tümör hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 down regülasyonunun yanı sıra (Kim vd., 2010; Tukenmez vd., 2019), BAX up-regülasyonu görülmüştür (Di vd., 2017; Kim vd., 2010; Sungur vd., 2017). Bunun yanı sıra survivin üretiminin inhibisyonuna neden olan L-EPS'ler raporlanmıştır (Tukenmez vd., 2019). Bununla birlikte, çalışmamıza benzer şekilde (Kim vd., 2010) çalışmasında da L-EPS uygulamaları, Bax gen ifadesi düzeyini değiştirmemiştir. L-EPS uygulama gruplarında instrinsik yolağın nihai aktivasyon proteinlerini kodlayan Kaspaz-9 (Tukenmez vd., 2019; Wu vd., 2016) ve Kaspaz-3 (Di vd., 2017; Tukenmez vd., 2019; Wu vd., 2016; Zhou vd., 2017) genlerinin up-regülasyonunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada ACS5 L-EPS'si için instrinsik yolağın başlatıcısı ve aynı zamanda anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'yi kodlayan gen ekspresyonundaki düşüş anlamlı bulunmuştur. L-EPS uygulama grubunun Bax geni ifadesindeki artış ve Survivin genindeki azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değildir. Bununla birlikte Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 gen ekspresyonlarındaki artış anlamlıdır. Tüm bu sonuçlar, L-EPS-ACS5'in instrinsik yolla apoptozu indüklediğine işaret etmektedir.

4.2.1.2 Western Blot analizi

Çalışmamızda L-EPS-ACS5 için instrinsik yolağın başlatıcısı ve aynı zamanda anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'deki düşüş ve pro-apoptotik protein olan Bax'daki artış anlamlı bulunmuştur (*; $P < 0.05$). Survivin proteinindeki azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değildir. Bununla birlikte Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 protein

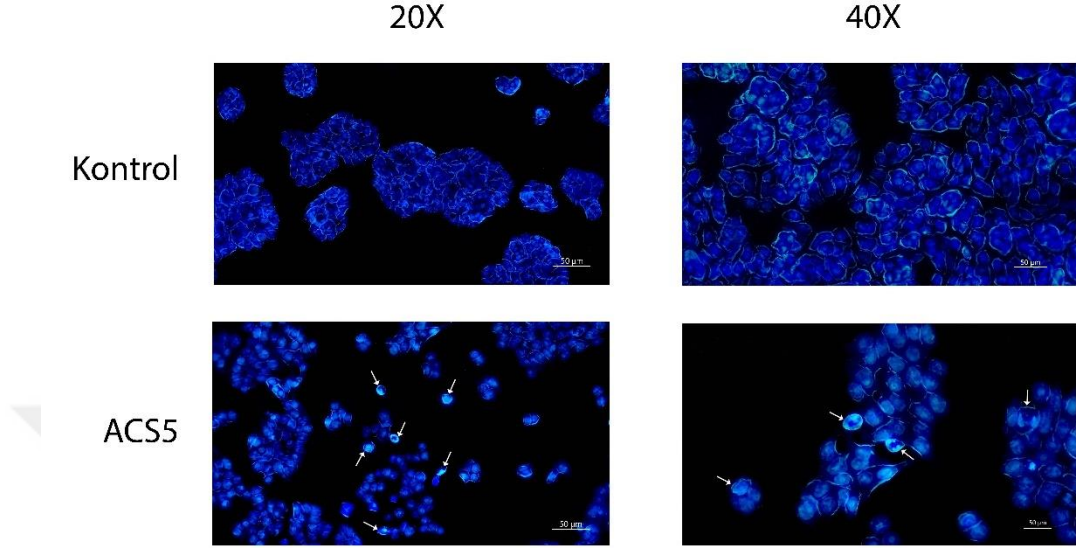
düzeylerindeki artış anlamlıdır (sırasıyla; ***, $P<0.001$, **, $P<0.01$). Tüm bu sonuçlar, L-EPS-ACS5'in instrinsik yolla apoptozu indüklediğini protein düzeyinde de kanıtlamaktadır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. L-EPS-ACS5 uygulaması sonucu apoptotik yolda yer alan proteinlerdeki ekspresyon değişiklikleri (*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, ***; $P<0.001$).

4.2.2 Apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi

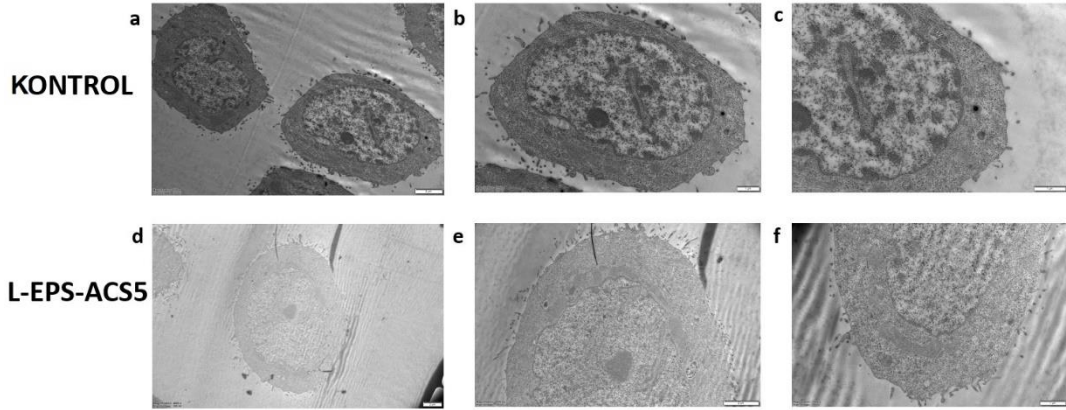
4.2.2.1 Hoechst 33258 ile hücre çekirdek boyaması



Şekil 4.7. L-EPS ACS5'in IC₅₀ değerinde 72 saatlik inkübasyonları sonrasında Hoechst 33258 ile boyama görüntüleri. Oklar apoptotik çekirdekleri göstermektedir (20x,40x).

Şekil 4.7.'de L-EPS ile işlem görmemiş hücrelerin (Kontrol) çekirdeği yoğunlaşma olmaksızın dairesel veya eliptik görüntü vermiştir. Bunun aksine, L-EPS uygulama gruplarında çekirdekte apoptotik cisimler olarak bilinen belirgin şekilde yoğun noktalar, kromatin yoğunlaşması, nükleer büzülme, DNA fragmentasyonu gibi farklı derecelerde literatürle uyumlu morfolojik değişiklikler bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar literatüre uyumluluk göstermiştir (Di vd., 2017; Martelli vd., 2001).

4.2.2.2 Tem analizi



Şekil 4.8. L-EPS ACS5'in IC₅₀ değerlerinde 72 saatlik inkübasyonları sonrasında hazırlanan hücre kesitlerinin farklı büyütme ölçeklerindeki TEM görüntüleri a) 6000x, b) 10000x, c) 15000x, d) 4000x, e) 8000x, f) 12000x.

HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik morfolojik değişiklikleri araştırmak için TEM kullanılarak görüntüler elde edildi (Şekil 4.8.). Kontrol grubu hücrelerin morfolojisi normal şekilde görülmektedir, kromatin düzgün bir şekilde dağılmıştır, rastgele dağılmış organeller ve büyük tek bir çekirdek bulunmaktadır. Aksine L-EPS uygulama gruplarında şiddetli vakuolizasyon, sitoplazma yoğunlaşması, membranla kaynaşmış ve genişlemiş bir endoplazmik retikulum görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatürde yer alan EPS uygulaması (Di vd., 2017) ve diğer potansiyel ilaç ve ilaç kombinasyonu uygulaması yapılan HT-29 hücrelerinden alınan apoptotik morfolojik görüntülerle uyumlu bulunmuştur (Yang vd., 2016; Zhang, 2006).

4.3 İmmunostimülatör Etki Analizi

Makrofajlar, çeşitli enfeksiyonlara ve kansere karşı konakçı bağışıklık savunma sisteminde önemli roller oynarlar (Wang vd., 2018; Xu vd., 2019). Raw264.7 makrofaj hattı olarak normal makrofaj fonksiyonlarını yansıtabilen bir hat olarak L-EPS'nin immün araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada makrofajların doğuştan gelen bağışıklıkta kritik bir rol oynadığı, sitokinler ve NO üreterek yabancı maddelere saldırdığı, yok ettiği ve yuttuğu hipotezinden hareketle (Jing Li vd., 2015; Mantovani vd., 2022) makrofaj proliferasyonu, fagositik aktivite, NO üretimi incelenerek L-EPS-ACS'in RAW264.7 hücreleri üzerindeki immüno-uyarıcı etkilerini araştırılmıştır.

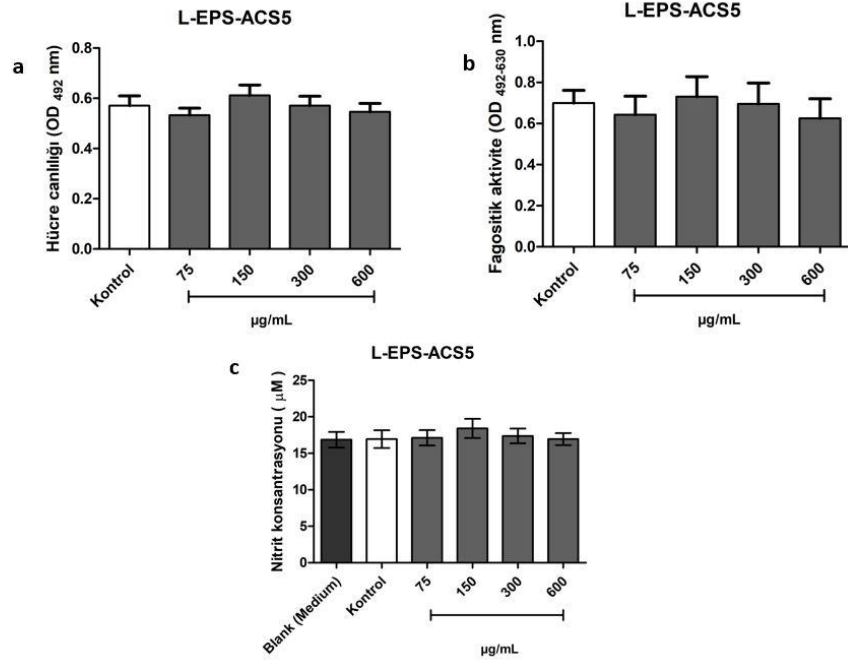
4.3.1 Makrofaj proliferasyon analizi

Bu kapsamda gerçekleştirilen makrofaj proliferasyon analizinde çalışılan dozlar için proliferatif aktivitedeki artış anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte ilgili dozlar immunotoksik/sitotoksik aktivite göstermemiştir (%canlılık>70).

4.3.2 Fagositoz aktivitesinin belirlenmesi

Bu sonuçlara paralel olarak ‘fagositik aktivite ve NO üretim analizleri’ sonucunda kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$) (Şekil 4.9.).

Düşük şeker içeriğine sahip L-EPS’lerin göreceli düşük makrofaj proliferasyon aktivitesine sahip olduğu ve fagositozun patojenlere maruz kalan makrofajlar için primer gerekli mekanizma olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Liu vd., 2016; Xu vd., 2019). Yine çalışmalar L-EPS’lerin fizikokimyasal karakterizasyonunun ^{31}P NMR düşük fosforilasyon sinyalizasyonu alınmasında kısmi fosforilasyonun proinflatuar aktivitesine katkıda bulunabileceği- makrofaj aktivasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Ek olarak, L-EPS’lerin immunmodülatör etkisinin (Matsuzaki vd., 2017), saflaştırılan L-EPS’lerin daha düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Xu vd., 2019). Bu nedenle L-EPS-ACS’in immunmodulator aktivitesinin, ilgili L-EPS’nin fraksiyonlarına ayırımı sonrası yeniden değerlendirilebileceği öngörülmüştür.



Şekil 4.9. (a) Çeşitli L-EPS-ACS5 konsantrasyonları ile muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinin hücre çoğalması. (b) Çeşitli L-EPS-ACS5 konsantrasyonlarının RAW 264.7 hücrelerinin fagositoz aktivitesi üzerindeki etkisi (c) Çeşitli konsantrasyonlarda L-EPS-ACS5 ile muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin NO üretimi ($P>0.05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

LAB'lar, genellikle insan tüketimine uygun olarak kabul edilen mikroorganizmalar arasındadırlar ve EPS üretirler. Ayrıca, LAB'lar tarafından üretilen EPS'ler, antioksidan, anti-tümör, immünomodülatör ve kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle ilgi görmüştür (Zha vd., 2018). LAB'lardan izole edilen EPS'lerin immünomodülatör aktiviteleri geniş çapta araştırılmaktadır ve daha önce yapılan bir çalışma, EPS'lerin tümör büyümesini önleyebileceğini göstermiştir (Kazmierczyk-Winciorek vd., 2021). Ayrıca, EPS'lerin farklı mekanizmalarla immüno-uyarıcı aktiviteler gösterdiği bilinmektedir; örneğin makrofaj fagositozunu geliştirebilir, doğal öldürücü hücrelerin tümör öldürücü aktivitesini artırabilir ve lenfosit proliferasyonunu teşvik ederek istilacı patojenlere karşı konak bağışıklığını artırabilir (Kazmierczyk-Winciorek vd., 2021). Ayrıca L-EPS'lerin fizikokimyasal karakterizasyonunun da immünomodülatör aktiviteyi etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Jing Li vd., 2015; Matsuzaki vd., 2017; Xu vd., 2019). Bu nedenle ilgili L-EPS'lerin immünomodülatör aktivitesinin, L-EPS'lerin fraksiyonlarına ayrımı sonrası yeniden değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

Ekzopolisakkaritlerin tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatmak, yayılmasını durdurarak, kısaca selektif olarak tümör hücrelerine zarar vererek, normal hücreleri etkilemedikleri bilinmektedir. Bu nedenle, ekzopolisakkaritler zararsız ve doğal bir tedavi seçeneği olarak görülebilir. Ekzopolisakkaritlerin anti-tümör etkilerinin daha detaylı araştırılması ekzopolisakkaritlerin hangi tümör tiplerine etkili olduğu, hangi dozlarda en etkili olduğu ve bu polisakkaritlerin nasıl kullanılabileceği konularında daha fazla bilgiyi bizlere sunabilmesi açısından önem arz etmektedir.

LAB'ların ürettiği ve çoğunun, çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip yüzey karbonhidrat polimerleri olan ekzopolisakkaritler, kansere karşı potansiyel olarak tamamlayıcı ve alternatif ilaçlar olarak görülmektedir. EPS'lerin, bağırsak, karaciğer, meme gibi çeşitli kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiler gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca apoptozu teşvik etme, hücre döngüsü durmasını indüklemeye ve ayrıca anti-mutajenik, anti-oksidatif, anti-anjyogenez ve anti-inflamatuar etkiler dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla tümörlerin gelişimini modüle ettiği vurgulanmıştır (Milner vd., 2021; Mohd Nadzir vd., 2021). Halihazırda kullanılan

anti-kanser ilaçlar güçlü bir etkinliğe sahip olmakla birlikte, ilgili ilaçların immunotoksik olduğu bilinmektedir, bu nedenle immün sistem üzerine düşük yan etkisi olan yeni anti-kanser ilaçların keşfedilmesi ve tanımlanması, çalışmalar için önemli bir motivasyondur. LAB gibi güvenli, doğal kaynaklardan elde edilen EPS'lerin, sentetik anti-kanser ajanlarına göre iyi bir alternatif olabileceği belirtilmiştir. L-EPS-ACS5'in HT-29 ve RAW 264.7 hücre hatları ile gerçekleştirilen analizleri ile elde edilen hücresel ve moleküler kanıtlar, kolorektal kanserde (apoptotik yolu teşvik ile) antikanser etkiye sahip, immünotoksik olmayan özellikleri ile bu EPS'lerin sentetik anti-kanser ajanlarına göre iyi bir alternatif olabileceğini göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P. ve Holley, R., 2021. Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity, *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395.
- Adams, J. M. ve Cory, S., 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets, *Cell Death and Differentiation*, 25, 27-36.
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M. ve Warusavitarne, J., 2012. Molecular pathways in colorectal cancer: Pathways of colorectal carcinogenesis, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27, 1423-1431.
- Angelin, J. ve Kavitha, M., 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F., 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut*, 66, 683-691.
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., Esposito, G., Hunashal, Y., Obaid, R. S. ve Hamed, F., (2020). Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 938-946.
- Badel, S., Bernardi, T. ve Michaud, P., 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, 29, 54-66.
- Biller, L. H. ve Schrag, D., 2021. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review, *JAMA*, 325, 669.
- Biloo, A., 2006. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea, *World Journal of Gastroenterology*, 12, 4557.
- Brown, K. G. M., Solomon, M. J., Mahon, K. ve O'Shannassy, S., 2019. Management of colorectal cancer, *BMJ*, 366, 14561.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. ve Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 3877-3886.
- Chabot, S., Yu, H.-L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M.-R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M. ve Oth, D., 2001. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes, *Le Lait*, 81, 683-697.

- Chavda, V. P., Ertas, Y. N., Walhekar, V., Modh, D., Doshi, A., Shah, N., Anand, K. ve Chhabria, M., 2021. Advanced computational methodologies used in the discovery of new natural anticancer compounds, *Frontiers in Pharmacology*, 12, 702611.
- Chen, L., Gu, Q. ve Zhou, T., 2022. Statistical optimization of novel medium to maximize the yield of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM216 and its immunomodulatory activity, *Frontiers in Nutrition*, 9, 924495.
- Choi, S. I., La, I. J., Han, X., Men, X., Lee, S. J., Oh, G., Kwon, H. Y., Kim, Y. D., Seong, G. S., Kim, S. H. ve Lee, O. H., 2022. Immunomodulatory effect of polysaccharide from fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni) on RAW 264.7 Macrophage and Balb/c Mice, *Foods*, 11, 1925.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. ve Kim, S. H., 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro, *Letters in Applied Microbiology*, 42, 452-458.
- Citronberg, J., Bostick, R., Ahearn, T., Turgeon, D. K., Ruffin, M. T., Djuric, Z., Sen, A., Brenner, D. E. ve Zick, S. M., 2013. Effects of Ginger supplementation on cell-cycle biomarkers in the normal-appearing colonic mucosa of patients at increased risk for colorectal cancer: results from a pilot, randomized, and controlled trial, *Cancer Prevention Research*, 6, 271-281.
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C. ve Forestier, C., 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1270-1273.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. ve Wallace, M. B., 2019. Colorectal cancer, *The Lancet*, 394, 1467-1480.
- Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R. ve Zhang, Y., 2017. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk, *Carbohydrate Polymers*, 171, 307-315.
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Hou, Y. F., Melan, M. A., Chen, X., Stolz, D. B., Shao, Z. M. ve Yin, X. M., 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 4702-4710.
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K. ve Abdel-Latif, H. M. R., 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview, *Fish ve Shellfish Immunology*, 117, 36-52.
- Eroğlu C, Avcı E, Seçme M, Dodurga Y, Vural H, Kurar E., 2018. The combination effect of ferulic acid and gemcitabine on expression of genes related apoptosis and metastasis in PC-3 prostate cancer cells. *European Journal of Biology*, 77(1), 32-37.

- Ezdini, K., Ben Salah-Abbès, J., Belgacem, H., Ojokoh, B., Chaieb, K. ve Abbès, S., 2022. The ameliorative effect of *Lactobacillus paracasei* BEJ01 against FB1 induced spermatogenesis disturbance, testicular oxidative stress and histopathological damage, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1-10.
- Farooqi, A. A., de la Roche, M., Djamgoz, M. B. A. ve Siddik, Z. H., 2019. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights, *Seminars in Cancer Biology*, 58, 65-79.
- Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., Vodickova, L., Kubecek, O., John, S., Cecka, F., Krupova, M., Manethova, M. Cervena, K. ve Vodicka, P., 2020. Distant metastasis in colorectal cancer patients—Do we have new predicting clinicopathological and molecular biomarkers? A comprehensive review, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5255.
- Fogh, J. ve Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines. pp. 115-159. İn: Fogh J. (Editör), *Human Tumor Cells in Vitro*, Springer US, Boston, MA.
- Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., Spyropoulos, B. G. ve Zografos, E. D., 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer, *World Journal of Gastroenterology*, 14, 6453.
- Górska-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. ve Gamian, A., 2011. Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B, *Carbohydrate Research*, 346, 2926-2932.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V. ve Roques, C., 2010. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics, *Anaerobe*, 16, 493-500.
- Grujović, M. Ž., Mladenović, K. G., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O. D. ve Kocić-Tanackov, S. D., 2022. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21, 1537-1567.
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of cancer: New dimensions, *Cancer Discovery*, 12, 31-46.
- Haroun, B. M., El-Menoufy, H. A., Amin, H. A., ve El-Waseif, A. A. (2013). Biosynthesis and morphology of an exopolysaccharide from a probiotic *lactobacillus plantarum* under different growth condition. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2), 1256-1265.
- Harris, H. M. B., Ale, E. C., Reinheimer, J. A., Binetti, A. G. ve O'Toole, P. W., 2018. Draft genome sequence of *lactobacillus fermentum* Lf2, an exopolysaccharide-producing strain isolated from argentine cheese. *Microbiology Resource Announcements*, 7, e01072-18.

- Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A. ve Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in bifidobacterium spp, *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 9-18.
- Hossain, Md. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W. ve Hadi, M. A., 2022. Colorectal cancer: A review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, 14, 1732.
- Huang, Z. ve Yang, M., 2022. Molecular network of colorectal cancer and current therapeutic options, *Frontiers in Oncology*, 12, 852927.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R. ve Zuber, M., 2017. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.
- Johdi, N. A. ve Sukor, N. F., 2020. Colorectal cancer immunotherapy: Options and strategies, *Frontiers in Immunology*, 11, 1624.
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C. ve Silva, C. C. G., 2022. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties, *Foods*, 11, 156.
- Kaźmierczyk-Winciorek, M., Nędzi-Góra, M. ve Słotwińska, S. M., 2021. The immunomodulating role of probiotics in the prevention and treatment of oral diseases, *Central European Journal of Immunology*, 46, 99-104.
- Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P. ve Kapila, R., 2014. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system, *Journal of Applied Microbiology*, 117, 303-319.
- Keum, N. ve Giovannucci, E., 2019. Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies, *Nature Reviews Gastroenterology ve Hepatology*, 16, 713-732.
- Khalil, M. A., Sonbol, F. I., Al-Madboly, L. A., Aboshady, T. A., Alqurashi, A. S. ve Ali, S. S., 2022. Exploring the therapeutic potentials of exopolysaccharides derived from lactic acid bacteria and bifidobacteria: antioxidant, antitumor, and periodontal regeneration, *Frontiers in Microbiology*, 13, 803688.
- Kidder, G. W. ve Montgomery, C. W., 1975. Oxygenation of frog gastric mucosa in vitro, *The American Journal of Physiology*, 229, 1510-1513.
- Kifle, Z. D., Tadele, M., Alemu, E., Gedamu, T. ve Ayele, A. G., 2021. A recent development of new therapeutic agents and novel drug targets for cancer treatment, *SAGE Open Medicine*, 9, 205031212110670.

- Kim, H.-S., Park, H., Cho, I.-Y., Paik, H.-D. ve Park, E., 2006. Dietary supplementation of probiotic bacillus polyfermenticus, bispan strain, modulates natural killer cell and t cell subset populations and immunoglobulin g levels in human subjects. *Journal of Medicinal Food*, 9, 321-327.
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S. ve Kim, S. H., 2010. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells: Antitumour activity of cb-EPS via autophagy, *Letters in Applied Microbiology*, no-no.
- Konieczna, C., Słodziński, M. ve Schmidt, M. T., 2018. Exopolysaccharides produced by lactobacillus rhamnosus KL 53A and lactobacillus casei fyos affect their adhesion to enterocytes, *Polish Journal of Microbiology*, 67, 273-281.
- Koveitpour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M. H. ve Ghaedi, K., 2019. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell ve Bioscience*, 9, 97.
- König, H. ve Fröhlich, J., 2017. Lactic acid bacteria, pp. 3-41. İn: König H., Uden G. ve Fröhlich J. (Editör), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer International Publishing, Cham.
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D. ve Lu, Y., 2019. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture, *Fish ve Shellfish Immunology*, 87, 820-828.
- Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., Kumar, P., Poddar, D., Aggarwar, P. K., Henry, C. J. K., Jain, S. ve Yadav, H., 2010. Cancer-preventing attributes of probiotics: An update, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61, 473-496.
- Kvakova, M., Kamlarova, A., Stofilova, J., Benetinova, V. ve Bertkova, I., 2022. Probiotics and postbiotics in colorectal cancer: Prevention and complementary therapy, *World Journal of Gastroenterology*, 28, 3370-3382.
- Kwon, M., Lee, J., Park, S., Kwon, O.-H., Seo, J. ve Roh, S., 2020. Exopolysaccharide isolated from lactobacillus plantarum L-14 has anti-inflammatory effects via the toll-like receptor 4 pathway in LPS-Induced RAW 264.7 cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9283.
- Lee, Y. H., Chung, M. C. M., Lin, Q. ve Boelsterli, U. A., 2008. Troglitazone-induced hepatic mitochondrial proteome expression dynamics in heterozygous Sod2+/- mice: Two-stage oxidative injury, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 43-51.
- Li, J, Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D. R. ve Lee, A. S., 2008. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells, *Cell Death ve Differentiation*, 15, 1460-1471.

- Li, Jing, Qian, W., Xu, Y., Chen, G., Wang, G., Nie, S., Shen, B., Zhao, Z., Liu, C. ve Chen, K., 2015. Activation of RAW 264.7 cells by a polysaccharide isolated from Antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp. S-5, *Carbohydrate Polymers*, 130, 97-103.
- Li, W., Xia, X., Tang, W., Ji, J., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhou, J., Zhang, Q. ve Dong, M., 2015. Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3454-3463.
- Lichtenstern, C. R., Ngu, R. K., Shalapour, S. ve Karin, M., 2020. Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer, *Cells*, 9, 618.
- Liu, C., Zheng, J., Ou, X. ve Han, Y., 2021. Anti-cancer substances and safety of lactic acid bacteria in clinical treatment, *Frontiers in Microbiology*, 12, 722052.
- Liu, W., Wang, H., Yu, J., Liu, Y., Lu, W., Chai, Y., Liu, C., Pan, C., Yao, W. ve Gao, X., 2016. Structure, chain conformation, and immunomodulatory activity of the polysaccharide purified from *Bacillus Calmette Guerin* formulation, *Carbohydrate Polymers*, 150, 149-158.
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H. ve Tao, X., 2017. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04, *Journal of Dairy Science*, 100, 6895-6905.
- Makino, S., Sato, A., Goto, A., Nakamura, M., Ogawa, M., Chiba, Y., Hemmi, J., Kano, H., Takeda, K., Okumura, K. ve Asami, Y., 2016. Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* OLL1073R-1, *Journal of Dairy Science*, 99, 915-923.
- Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F. ve Garlanda, C., 2022. Macrophages as tools and targets in cancer therapy, *Nature Reviews Drug Discovery*, 21, 799-820.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. ve Rodríguez Yoldi, M., 2017. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 197.
- Martelli, A. M., Zwyer, M., Ochs, R. L., Tazzari, P. L., Tabellini, G., Narducci, P. ve Bortul, R., 2001. Nuclear apoptotic changes: An overview, *Journal of Cellular Biochemistry*, 82, 634-646.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B. ve Recio, I., 2015. HT29 cell line. pp. 113-124. In: Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D. ve Wichers H. (Editör), *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer International Publishing, Cham.

- Matsuzaki, C., Takagaki, C., Tomabechi, Y., Forsberg, L. S., Heiss, C., Azadi, P., Matsumoto, K., Katoh, T., Hosomi, K., Kunisawa, J., Yamamoto, K. ve Hisa, K., 2017. Structural characterization of the immunostimulatory exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048, *Carbohydrate Research*, 448, 95-102.
- Matthews, H. K., Bertoli, C. ve de Bruin, R. A. M., 2022. Cell cycle control in cancer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 74-88.
- Milder, I. E. J., Feskens, E. J. M., Arts, I. C. W., Bueno de Mesquita, H. B., Hollman, P. C. H. ve Kromhout, D., 2005. Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinorensinol in Dutch men and women, *The Journal of Nutrition*, 135, 1202-1207.
- Milner, E., Stevens, B., An, M., Lam, V., Ainsworth, M., Dihle, P., Stearns, J., Dombrowski, A., Rego, D. ve Segars, K., 2021. Utilizing probiotics for the prevention and treatment of gastrointestinal diseases, *Frontiers in Microbiology*, 12, 689958.
- Mohd Nadzir, M., Nurhayati, R. W., Idris, F. N. ve Nguyen, M. H., 2021. Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review, *Polymers*, 13, 530.
- Mojibi, P., 2018. Cell-bound Exopolysaccharide Extract from Indigenous Probiotic Bacteria Induce Apoptosis in HT-29 cell-line, *Iranian Journal of Pathology*, 14, 41-51.
- Moretti, L., Attia, A., Kim, K. W. ve Lu, B., 2007. Crosstalk between bak/bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy, *Autophagy*, 3, 142-144.
- Nazir, Y., Hussain, S. A., Abdul Hamid, A. ve Song, Y., 2018. Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and HIV diseases, *BioMed Research International*, 2018, 1-17.
- Oki, E., Ando, K., Taniguchi, H., Yoshino, T. ve Mori, M., 2022. Sustainable clinical development of adjuvant chemotherapy for colon cancer, *Annals of Gastroenterological Surgery*, 6, 37-45.
- Oleksy, M. ve Klewicka, E., 2016. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13.
- Painter, S. D., Ovsyannikova, I. G. ve Poland, G. A., 2015. The weight of obesity on the human immune response to vaccination, *Vaccine*, 33, 4422-4429.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. ve Levine, B., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy, *Cell*, 122, 927-939.

- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. ve Roy, D., 2005. Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*, *Microbiology*, 151, 1839-1851.
- Pfeffer, C. ve Singh, A., 2018. Apoptosis: A target for anticancer therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 448.
- Putman, A. K. ve Contreras, G. A., 2022. 15-F2t-Isoprostane favors an anti-inflammatory phenotype in RAW 264.7 macrophages during endotoxin challenge, *Antioxidants*, 11, 586.
- Qu, D., Zhang, X., Sang, C., Zhou, Y., Ma, J. ve Hui, L., 2019. Lappaconitine sulfate induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells and down-regulates PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway, *Medicinal Chemistry Research*, 28, 907-916.
- Riaz Rajoka, M. S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J. ve Hussain, N., 2018. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT*, 89, 638-647.
- Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Fang, H., Padhiar, A. A., Zeng, X., Khurshid, M., He, Z. ve Zhao, L., 2019. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains, *Journal of Functional Foods*, 63, 103588.
- Riaz Rajoka, M. S., Zhao, H., Mehwish, H. M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., Shao, D., Jin, M., Li, Q., Zhao, L. ve Shi, J., 2019. Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *Food Research International*, 123, 286-297.
- Rossi, O., Khan, M. T., Schwarzer, M., Hudcovic, T., Srutkova, D., Duncan, S. H., Duncan, S. H., Stolte, E. H., Kozakova, H., Flint, H. J., Samsom, J. N., Harmsen, H. J. M. ve Wells, J. M., 2015. Faecalibacterium prausnitzii strain HTF-F and its extracellular polymeric matrix attenuate clinical parameters in DSS-Induced colitis, *PLOS ONE*, 10, e0123013.
- Saha, U. B. ve Saroj, S. D., 2022. Lactic acid bacteria: Prominent player in the fight against human pathogens, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 20, 1435-1453.
- Sakanashi, F., Shintani, M., Tsuneyoshi, M., Ohsaki, H. ve Kamoshida, S., 2019. Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status, *Pathology - Research and Practice*, 215, 152425.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G. ve Ruas-Madiedo, P., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1440-1453.

- Saleena, L. A. K., Teo, M. Y. M., How, Y. H., In, L. L. A. ve Pui, L. P., 2023. Immunomodulatory action of *Lactococcus lactis*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 135, 1-9.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. ve Rastall, R. A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16, 605-616.
- Sarowska, J., Choroszy-Król, I., Regulska-Ilow, B., Frej-Mądrzak, M. ve Jama-Kmiecik, A., 2013. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases, *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 22, 759-766.
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T. ve Przybyłowicz, K. E., 2021. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis, *Cancers*, 13, 2025.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B. ve Andrews, D. W., 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813, 508-520.
- Shao, L., Wu, Z., Zhang, H., Chen, W., Ai, L. ve Guo, B., 2014. Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5, *Carbohydrate Polymers*, 107, 51-56.
- Sheng, S., Fu, Y., Pan, N., Zhang, H., Xiu, L., Liang, Y., Liu, Y., Liu, B., Ma, C., Du, R. ve Wang, X., 2022. Novel exopolysaccharide derived from probiotic *Lactobacillus pantheris* TCP102 strain with immune-enhancing and anticancer activities, *Frontiers in Microbiology*, 13, 1015270.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. ve Tsujimoto, Y., 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nature Cell Biology*, 6, 1221-1228.
- Shirafkan, N., Shomali, N., Kazemi, T., Shanehbandi, D., Ghasabi, M., Baghbani, E., Ganji, M., Khaze, V., Mansoori, B. ve Baradaran, B., 2019. MicroRNA-193a-5p inhibits migration of human HT-29 colon cancer cells via suppression of metastasis pathway, *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 8775-8783.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A. ve Jemal, A., 2017. Colorectal cancer statistics, 2017: Colorectal cancer statistics, 2017, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 177-193.
- Singh, R. P., Shadan, A. ve Ma, Y., 2022. Biotechnological applications of probiotics: A multifarious weapon to disease and metabolic abnormality, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14, 1184-1210.

- Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P. ve Śliżewska, W., 2020. The role of probiotics in cancer prevention, *Cancers*, 13, 20.
- Soria-Valles, C., López-Soto, A., Osorio, F. G. ve López-Otín, C., 2017. Immune and inflammatory responses to DNA damage in cancer and aging, *Mechanisms of Ageing and Development*, 165, 10-16.
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C. ve Aktas, B., 2017. Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa), *Anaerobe*, 47, 137-144.
- Taieb, J. ve Gallois, C., 2020. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer, *Cancers*, 12, 2679.
- Tiwari, S., Kavitake, D., Devi, P. B. ve Halady Shetty, P., 2021. Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt, *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1585-1595.
- Torino, M. I., Font de Valdez, G. ve Mozzi, F., 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages, *Frontiers in Microbiology*, 6, 834.
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B. ve Yavuz, S., 2019. The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro, *Scientific Reports*, 9, 8268.
- van Baarlen, P., Kleerebezem, M. ve Wells, J. M., 2013. Omics approaches to study host–microbiota interactions, *Current Opinion in Microbiology*, 16, 270-277.
- Wan, Y., Wang, J., Xu, J., Tang, F., Chen, L., Tan, Y., Rao, C. L., Ao, H. ve Peng, C., 2021. *Panax ginseng* and its ginsenosides: Potential candidates for the prevention and treatment of chemotherapy-induced side effects, *Journal of Ginseng Research*, 45, 617-630.
- Wang, G., Zhu, L., Yu, B., Chen, K., Liu, B., Liu, J., Qin, G., Liu, C., Liu, H. ve Chen, K., 2016. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation, *Carbohydrate Polymers*, 149, 112-120.
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., Min, W. ve Yang, Z., 2018. Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu, *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 985-993.
- Wang, Y., Zeng, M., Xia, L., Valerie Olovo, C., Su, Z. ve Zhang, Y., 2023. Bacterial strategies for immune systems—Role of the type VI secretion system, *International Immunopharmacology*, 114, 109550.

- Wang, Z., Li, L., Wang, S., Wei, J., Qu, L., Pan, L. ve Xu, K., 2022. The role of the gut microbiota and probiotics associated with microbial metabolisms in cancer prevention and therapy, *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1025860.
- Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L. ve Li, Q., 2019. Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With in vitro Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11, *Frontiers in Microbiology*, 10, 2898.
- Welman, A. D. ve Maddox, I. S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges, *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274.
- Worthley, D. L. ve Leggett, B. A., 2010. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities, *The Clinical Biochemist. Reviews*, 31, 31-38.
- Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J. ve Hong, Y., 2014. Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis, *International Journal of Biological Sciences*, 10, 1072-1083.
- Wu, J., Zhang, Y., Ye, L. ve Wang, C., 2021. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review, *Carbohydrate Polymers*, 253, 117308.
- Wu, Z., Wang, G., Pan, D., Guo, Y., Zeng, X., Sun, Y. ve Cao, J., 2016. Inflammation-related pro-apoptotic activity of exopolysaccharides isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Beneficial Microbes*, 7, 761-768.
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X. ve Fang, J.-Y., 2020. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, 22.
- Xiu, L., Zhang, H., Hu, Z., Liang, Y., Guo, S., Yang, M., Du, R. ve Wang, X., 2018. Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant in vitro and in vivo, *Food and Agricultural Immunology*, 29, 1086-1105.
- Xu, Y., Cui, Y., Wang, X., Yue, F., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Yi, Y. ve Lü, X., 2019. Purification, characterization and bioactivity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* KX041, *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 480-492.
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K. ve Tiwari, S. K., 2022. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 505-521.
- Yang, B., Xiao, B. ve Sun, T., 2013. Antitumor and immunomodulatory activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 287-290.

- Yang, J., Li, X., Xue, Y., Wang, N. ve Liu, W., 2014. Anti-hepatoma activity and mechanism of corn silk polysaccharides in H22 tumor-bearing mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 276-280.
- Yang, L., Liu, Y., Wang, M., Qian, Y., Dong, X., Gu, H., Wang, H., Guo, S. ve Hisamitsu, T., 2016. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis, *Molecular Medicine Reports*, 14, 4559-4566.
- Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y. ve Zhang, J., 2010. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 53-57.
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M. A. O., Ringø, E., Ahmadifar, E. ve Abdel-Latif, H. M. R., 2022. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review, *Aquaculture*, 547, 737514.
- You, X., Li, Z., Ma, K., Zhang, C., Chen, X., Wang, G., Yang, L., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q. ve Li, W., 2020. Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5, *Carbohydrate Polymers*, 235, 115977.
- Yousefi, B., Eslami, M., Ghasemian, A., Kokhaei, P., Salek Farrokhi, A. ve Darabi, N., 2019. Probiotics importance and their immunomodulatory properties, *Journal of Cellular Physiology*, 234, 8008-8018.
- Zha, Z., Wang, S.-Y., Chu, W., Lv, Y., Kan, H., Chen, Q., Zhong, L., Yue, L., Xiao, J., Wang, Y. ve Yin, H., 2018. Isolation, purification, structural characterization and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Lepidium meyenii*, *Phytochemistry*, 147, 184-193.
- Zhang, J., Liu, L., Ren, Y. ve Chen, F., 2019. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 761-767.
- Zhang, X. F., 2006. Apoptosis of human colon carcinoma HT-29 cells induced by ceramide, *World Journal of Gastroenterology*, 12, 3581.
- Zhao, H., Xu, X., Lei, S., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Zhang, Y., Liu, L., Lei, S., Sun, H. ve Huang, Q., 2019. Iturin A-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* trigger apoptosis, paraptosis, and autophagy in Caco-2 cells, *Journal of Cellular Physiology*, 234, 6414-6427.
- Zhou, X., Hong, T., Yu, Q., Nie, S., Gong, D., Xiong, T. ve Xie, M., 2017. Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 induce c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells, *Scientific Reports*, 7, 14247.

URL-1 <<https://www.iarc.who.int/>> Eriřim Tarihi: 26.02.2023.

URL-2 <<https://www.airc.it/>> Eriřim Tarihi: 26.02.2023.

URL-3 <<https://www.wcrf.org/>> Eriřim Tarihi: 26.02.2023.

URL-4 <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Eriřim tarihi:
11.12.2022.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : İlayda Selcen KADIOĞLU

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, 2016-2021

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, 2021-2023

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Genoks Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi / Yaz Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. KADIOĞLU İLAYDA SELCEN, KARADUMAN TUGCE, (2022) Investigation of the anticancer and immunostimulatory effects of exopolysaccharides obtained from Lacticaseibacillus rhamnosus ACS5 strain in vitro, 10. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi (UBCAK) 28-30 Kasım 2022, Online, Sözlü Bildiri.