



***Lactobacillus rhamnosus* G28.2'DEN ELDE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTİN ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN
İN VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI
Yüksek Lisans Tezi**

**Gizem TANLAK SARI
Eskişehir 2019**

***Lactobacillus rhamnosus* G28.2'DEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN
ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Gizem TANLAK SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1509F629 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gizem Tanlak Sarı'nın "*Lactobacillus rhamnosus* G28.2'den Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin Anti Kanser Etkilerinin *İn Vitro* Yöntemlerle Araştırılması "

başlıklı tezi 26/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoteknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. A.Tansu KOPARAL

Üye : Doç. Dr. Emel ERGENE

Üye : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Prof. Dr. Murat TANIŞLI
Enstitü Müdürü

ÖZET

Lactobacillus rhamnosus G28.2'DEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN
ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gizem TANLAK SARI

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

İkinci Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Günümüzde kolorektal kanserden ölenlerin sayısı gittikçe artmaktadır. Tümörlerin gelişimi ve yayılımında anjiojenez rol oynamaktadır. Yeni damar oluşumunun engellenmesi tümör büyümesini engelleyeceği için kanserle savaşta önemli bir stratejidir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerin antioksidan, bağışıklığı düzenleyici, anti biyofilm ve anti-tümör etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Kanserde anjiojenez meydana gelir. Anjiojenez tümör büyümesi ve metastaz için çok önemlidir. Kanserli hücreler vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) salgılayarak kendilerine yakın damarlarda bulunan endotel hücrelerin çoğalmasını indükler sonrasında bu hücreler yeni kan damarları oluşturarak tümörün etrafını sararlar. Bu tez çalışmasında ağızdan izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* G28.2'den elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS) insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) ve göbek kordonu veni endotel hücrelerinin (HUVEC) çoğalmaları üzerindeki etkileri MTT testi ile araştırılmıştır. HUVEC'nin anti anjiojenik etkisi tüp formasyon testi ile belirlenmiştir. Tez çalışması sonucunda Caco-2 ve HUVEC hücreleri üzerinde laktik asit bakteri EPS'nin 3000-4000-5000 ve 6000 µg/ml'lik konsantrasyonlarının hücre çoğalmasında düşüşe neden olduğu ve HUVEC hücreleri üzerinde 3000-4000-5000 ve 6000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anjiojenez oluşumunu engellediği saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda EPS'nin biyo-ilaç olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, ekzopolisakkarit, Caco-2, anjiojenez, HUVEC

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-CANCER EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDE OBTAINED FROM *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 IN VITRO METHODS

Gizem TANLAK SARI

Department of Biotechnology

Advanced Technologies Program

Anadolu University, Graduate School of Science, August 2019

Supervisor Prof. Ayşe Tansu KOPARAL

Co-Supervisor Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Nowadays, the number of people who die from colorectal cancer is increasing. Angiogenesis plays a role in the development and spread of tumors. Inhibition of new vessel formation is an important strategy in the fight against cancer as it will inhibit tumor growth. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria are known to have antioxidant, immunomodulatory, anti-biofilm and anti-tumor effects. Angiogenesis occurs in cancer. Angiogenesis is very important for tumor growth and metastasis. Cancer cells secrete vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), inducing the proliferation of endothelial cells in their own and nearby vessels, which then form new blood vessels and surround the tumor. In this thesis, the effects of exopolysaccharide obtained from orally isolated *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation MTT test was investigated. Anti-angiogenic effect of HUVEC, which is a healthy cell line, was determined by tube formation test. As a result of this study, LAB-EPS showed cytotoxic properties of Caco-2 and HUVEC cells by affecting cell proliferation concentrations of 3000-4000-5000 and 6000 µg / ml angiogenesis formation. Based on these findings, it is thought that LAB-EPS may be a biopharmaceutical.

Key words: Lactic acid bacteria, exopolysaccharides, Caco-2, angiogenesis, HUVEC.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni her zaman anlayışlı bir şekilde karşılayan,
destekleyici ve sevgi dolu danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a,

Çalışmama katkılarını sunan ve asla güler yüzünü esirgemeyen ikinci danışmanım
Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sevgili
arkadaşlarıma,

İş hayatında olmamdan dolayı geç saatlere kadar süren laboratuvar çalışmalarında
bana destek olan sevgili eşime ve

Bu süreçte hayata pozitif bakmamı sağlayarak, başarılı olmam için her zaman
arkamda olan canım anneme teşekkürlerimi içtenlikle sunarım.

Gizem TANLAK SARI

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Gizem TANLAK SARI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	2
1.1.2. Kolon kanseri.....	3
1.2. Anjiojenez.....	4
1.3. Laktik Asit Bakterileri.....	5
1.4. Ekzopolisakkaritler.....	8
1.4.1. Ekzopolisakkaritlerin anjiojenez üzerine etkisi.....	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	12
2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	12
2.3. Kullanılan Aletler.....	12
2.4. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması.....	12
2.5. Kullanılan Hücre Hatları.....	12
2.5.1. Caco-2 hücre kültürü.....	12
2.5.2. HUVEC hücre kültürü.....	13
2.6. Kullanılan Test Maddelerinin Hazırlanması.....	13
2.6.1. Ekzopolisakkaritin izolasyonu.....	13
2.7. Yöntem.....	14
2.7.1. Hücrelerin Testler için Hazırlanması.....	14
2.7.1.1. <i>İn vitro</i> sitotoksosite testi (MTT).....	14

2.7.1.2. <i>MTT ölçümü</i>	15
2.7.1.3. <i>Tüp formasyon testi</i>	15
3. BULGULAR.....	17
3.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkaritin Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Etkileri.....	17
3.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkaritin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Etkileri.....	18
3.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkaritin HUVEC Hücrelerinin Anjiyenez Üzerine Etkisi.....	19
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	21
KAYNAKLAR	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2'den elde edilen EPS'nin, Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	16
Şekil 3.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2'den elde edilen EPS'nin, HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	17
Şekil 3.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> G28.2'den elde edilen EPS'nin, anjiojenez üzerindeki etkisinin tüp formasyon testi ile değerlendirilmesi.....	19



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EPS	: Ekzopolisakkarit
r-EPS	: Releasing Exopolysaccharide (Çevredeki Ortama Salgılanan Ekzopolisakkarit)
b-EPS	: Binding Exopolysaccharide (Hücreye Bağlı Ekzopolisakkarit)
Caco-2	: Cancer Coli-2 (İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Hücreleri)
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri)
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü)
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FBS	: Fetal Bovine Serumu
µg	: Mikro-gram
kDa	: Kilo-dalton

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser ölüm nedenlerinin en önemli sebeplerinden biridir. Kanser normal bir hücrenin kontrolsüzce bölünmesiyle oluşur. Kansere neden olan faktörler arasında sağlıklı beslenme, stres, tütün ve alkol kullanımı, radyasyon, hormonlar, bağışıklık sistemi, kalıtsal ve metabolik mutasyonlar vardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı verilerine göre dünyada kanserden ölenlerin arasında kolorektal kanser ikinci sırada gelmektedir (WHO, 2018; Tukenmez vd., 2019). Kolorektal kanser, kolonu ve rektumu kaplayan hücreler anormal hale geldiğinde ve kontrolden çıktığında meydana gelir. Ne yazık ki, bazı kolorektal kanserler herhangi bir belirti veya belirti olmadan da mevcut olabilir. Kolorektal kanser tedavisinde en iyi yaklaşım, metastazlara karşı korunma ve mücadeledir. Bu tür kanserin yayılması ciddi bir problem olmaya devam etmekte, sonunda metastatik yayılma nedeniyle ölümle sonuçlanmaktadır (Azcarate-Peril vd., 2011; Imani Fooladi vd., 2017; Nourozui vd., 2018). Neoanjiojenez, kanser ilerlemesi ve metastaz oluşumunda kanserin en önemli faktörlerinden biridir. Oksijen ve besinlerde artan gereksinimlere sahip hızla büyüyen tümör kütlesi, çeşitli anjiojenik faktörler üreterek vasküler büyümeyi uyarır (Weis ve Cheresch, 2011). Tümörün yeni vaskülerize bölgelerinin büyümesiyle, kanser hücreleri kan akışından yeterince oksijen almak için durur ve hipoksik bölgeler oluşturur. Hipoksi, yeni kan damarlarının oluşumunu gerektiren daha fazla tümör büyümesine yol açan anjiojenezi uyarır. Böylece anjiojenik tetikleyici açık kalır ve tümörün kanlanması ve heterojenitesini artırarak yeni damarlar oluşturmaya devam eder (Plank ve Sleeman, 2003; Orlova vd., 2019). Son yıllarda araştırmacılar mikrobiyal metabolitlerin, probiyotiklerin ve toksinlerin kanser tedavisinde uygulanmasına odaklanmıştır. Probiyotik, modern çağın bir ifadesidir, “yaşam” anlamına gelir ve insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri olan bakteriyel birleşimi adlandırmak için kullanılır (Bagchi, 2014). Probiyotikler, bağırsakların mikrobiyal bileşimini değiştirmek için kullanılabilecek stratejik mikroorganizmalardan biridir. Probiyotikler *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Escherichia* ve *Saccharomyces* gibi çeşitli cinslerden oluşur ancak *Lactobacillus* probiyotik olarak kullanılan en yaygın cinstir (Sungur vd., 2017). Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünleri içerisinde en önemli fonksiyonel bileşiklerinden biri olarak temsil edilen ekzopolisakkaritlerdir. Ekzopolisakkaritler (EPS) genellikle polisakkaritlerin tüm formu ile ilişkili mikrobiyal hücre duvarının dış tarafında bulunur.

Laktik asit bakteri EPS'lerinin antioksidan, bağışıklık düzenleyici, anti-inflamatuar, anti-biyofilm ve anti-tümör etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle EPS'nin anti-tümör aktivitesi son zamanlarda kanser tedavisinde potansiyel uygulamalar amacıyla ilgi kaynağı olmuştur. Geleneksel anti-tümör ilaçlar mevcut durumda yüksek seviye aktiviteye sahip klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Yang vd., 2013). Ancak, sitotoksosite ve sinir sistemine zarar vermesi gibi yan etkileri bu ajanların kullanımında endişe kaynağı olmuştur. Laktik asit bakterilerinden üretilen EPS'ler düşük toksisite ve minimal yan etkiyle doğal kaynaklardan elde edilen ürünü temsil etmektedir. Böylece var olan anti-tümör ajanlar için etkili bir alternatif olarak sunulabilir (Di vd., 2018).

Bu tez çalışmasında ağızdan izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 suşundan elde edilen ekzopolisakkaritin insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (Caco-2) hücrelerinde ve sağlıklı göbek kordonu veni endotel hücrelerinde (HUVEC) hücre çoğalmaları üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca HUVEC hücrelerinde tüp formasyon deneyi yapılarak anjiojenez üzerine etkisi incelenmiştir. Laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkaritlerini içeren probiyotik ürünlerin günlük kullanımının kanserle savaşta etkili bir faktör olacağı düşünülmektedir.

1.1. Kanser

Kanser, dünyada ölüme neden olan ve kontrolsüzce anaplastik hücrelerin çoğalmasından dolayı doku ve organlarda metastaza sebep olan çeşitli hastalıklardır. Kanser normal bir hücrenin kromozomal DNA'sının mutasyonu sonucu oluşur. Kanser oluşumuna iç ve dış faktörler etki eder. İç faktörler hormonlar, bağışıklık sistemi, kalıtsal mutasyonlar ve metabolik mutasyonlardır. Dış faktörler ise tütün, alkol, kimyasal bulaşıcı ajanlar ve radyasyondur. Kanser tanınmış özelliği metastaz ve istila etme yeteneğidir. Normal hücrenin transformasyonundan sonra genetik mutasyonlu malignan hücre; kanser hücresi olarak hızlı bir şekilde sayısını artırır, dokunun etrafını sararak istila eder ve gruptan koparak kan içinde ya da lenfatik sistemle vücuda göç eder. Kanser sebepli ölümlerin %90'ı metastazdan kaynaklanır (Zong vd., 2012). Kolorektal kanser hastalık ve ölüme neden olan önemli bir kanser türüdür (Keskin vd., 2015). Dünyada kanserden ölenlerin arasında kolorektal kanser ikinci sırada gelir (Tukenmez vd., 2019). Anjiojenez, kolorektal kanser hücrelerinin metastazında ve çoğalmasında esas olarak rol oynar. Anjiojenez çeşitli büyüme faktörleri ve tümörden salgılanan fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel

büyüme faktörü (VEGF) gibi sitokinler ile sürdürülür (Rajitha ve Nagaraju, 2017). Kanser tedavilerinde kullanılan radyoterapi ve daha sık kullanılan kemoterapi kolorektal kanserin tedavisinde de destekleyicidir. Kolon kanser tedavisinde yapılan gelişme düşük seviyeli iyonize radyasyon tedavisinin ilerlemesinden elde edilen sonuçtur. Ayrıca zengin probiyotik ve prebiyotik içeren besin takviyeleri kolorektal kansere karşı kemoterapötik ve önleyici ajan olarak hizmet sunmaktadır. Besin takviyeleri güçlü antioksidan, anti-kanser ve anti-mutajenik özelliklere sahiptir.

1.1.2. Kolon Kanseri

Günümüzde kalın bağırsak kanseri dünyada en yaygın kanser ölümleri arasında olup büyük endişe oluşturmıştır. Kalın bağırsak (kolon) kanseri vakalarının artış sebebi değişen çevre koşulları ve genetik faktörlerdir. Çevre koşulları arasında beslenme alışkanlıkları, fazla et ve doymuş yağ tüketimi, kronik alkol problemi, tütün ve türevleri tüketimi ve obezite yer almaktadır (Raman vd., 2013). Kanser tedavilerinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri kullanılmaktadır (Lai vd., 2015). Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapi yöntemi sitotoksik ve immunotoksik etki göstermektedir. Yeni anti-kanser ilaçların keşfi ile kemoterapilerin bu etkilerinden uzaklaşmıştır. Yeni anti-kanser keşifleri laktik asit bakterilerinin kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını durdurucu etkisi olduğunu göstermiştir (Ghany vd., 2015) .

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan 5-fluorourasil ve oksaliptatin ajanları en etkilileridir. Bununla birlikte yorgunluk ve istifra gibi görülen, istenmeyen yan etkiler hastaların yaşam kalitelerini düşürmektedir. Kolon kanseri kemoterapisinde ilaçlara karşı doğal ve kazanılmış dirençler uygulamada zorluklar meydana getirmiştir. Bir büyük engel kanserin yeniden nüksetmesi ve uzak metastazlar yapmasıdır. Böylece kolon kanserini önlemede ve tedavi etmede yeni alternatif stratejilerin araştırılması oldukça önemlidir. Kanser neden olabilecek etmenlerin başında beslenme faktörleri gelir. Bireylerin yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları kolon kanserinin gelişimine etki eder (Chan ve Giovannucci, 2010).

Kolorektal kanser, genetik bakış açısından en iyi anlaşılmış tümörlerden biridir. Yine de gelişmiş ülkelerde kanser bağlantılı ölümlerin başta gelen sebepleri arasında yerini almaktadır. Metastaz kolon kanserli hastalar arasında ölüm nedenlerinin ilkidir. Kolon kanseri sebebi diyet alışkanlıkları, aile geçmişi, alkol, sabit alışkanlıklar, ülseratif

kolit ve kanser hücrelerinin çeşitli türleriyle ilişkili olup, şu anki terapiler tarafından tamamıyla yok edilemediği rapor edilmiştir. Kolon kanseri her zaman inflamasyonun yanında temel biyolojik yollarla hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve tehlikesiz varlığını sürdürme ve malignant kolon dokusu düzenleyen böylece anti- inflamatuvar terapileri önlemede ve erken evre kolon tümörlerinin tedavisinde dikkat çekicidir. Kötü huylu kolon tümörünün klinik tedavilerinde insanlar ve hayvanlara karşı fluorourasil gibi klasik kemoterapik dozajlar kullanımının ciddi toksisite ve yan etkileri olduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2017).

1.2. Anjiojenez

Anjiojenez insan vücudunda yeni kan damarları oluşumunda önemli bir fizyolojik süreçtir. Hem tümör oluşumu hem de yara tedavisinde gelişim ve doku büyümesinde önemli bir rol oynar (Kontos ve Annex, 1999). Kan damarları sadece oksijen ve besini insan vücuduna taşımayıp, aynı zamanda diğer hastalık koşulları ve tümörleri besler. Anjiojenez kanser gelişimi ve ilerlemesinde anahtar süreçtir. Malignant hücreler, onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu nedeniyle hızlı bir şekilde bölünen hücreler ve kontrolsüzce gelişen hücrelerdir. Tümör oluşurken ve oluşuktan sonra büyüklüğü 1-2 mm³'e ulaşır ve oksijen ve besin sağlayamadığından dolayı daha fazla gelişemez. Tümör hücreleri çeşitli büyüme faktörlerinden temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ya da vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sekresyonu ile anjiojenezi teşvik eder (Collins vd., 2005). Anjiojenez insan kanser hücrelerinin kontrolünde anti-anjiojenez üzerinden terapötik hedef olarak görev yapar. Ayrıca anjiojenezin desteği ile kardiyovasküler hastalıkların kontrolünü sağlar. Patolojik anjiojenezde ileri araştırmalar regülatör molekülleri anlamada daha iyi bir katkı sağlayabilir ve potansiyel antikanser tedavilerinin keşfi için yardımcı olabilir. Mevcut durumda, klinik denemelerde akciğer, meme ve kolorektal kanser gibi çeşitli insan kanserlerini tedavi etmek için bir çok ajan veya antikor kullanımı vardır (Sun vd., 2017). Anjiojenez tüm omurgalılarda sağlık açısından gereklidir ama yeni kan damarlarının fazla büyümesi tümör oluşumunu kolaylaştırmada, inflamasyonu arttırmada ve körlüğe neden olmada rol oynar. Patolojik anjiojenez çoğu inflamatuvar, bağışıklık, malignant ve iskemik rahatsızlıklarda görülür ve yeni moleküler terapilere rağmen çok büyük sağlık sıkıntısı geriye kalır (Puro vd., 2016). Anjiyogenez yara iyileşmesi, kollateral dolaşımın gelişmesi, korpus luteumdaki

kimyasal dokular, endometriyum, plasenta oluşumu ve saç uzaması gibi dokuların onarımı ve gelişimi için esastır (Prado vd., 2016).

Kan damarlarının oluşumu vaskülojenez ve anjiojenez olmak üzere iki ilke tarafından gerçekleşir. Her ikisi de kan damar ağlarının genişlemesinde benzer rolleri almalarına rağmen farklı amaç ve mekanizmaları gerçekleştirirler. Vaskülojenez büyük bir çoğunlukla erken embriyogenez sırasında yerini alsa da, anjiojenez gelişen dokularda biyokimyasal işaretler tarafından tetiklenirler. İkisi de birlikte damar ağı oluşumunu başarırlar. Fizyolojik anjiojenez normal doku gelişimi, yeniden biçimleme ve rejenerasyon için esastır. Genel olarak anjiojenez süreci bir dizi basamak içerir. Endotel hücreleri uyarma, kapiler bazal lamina çevresinin bozulması, endotel hücrelerinin göçü, kapiler filiz oluşumu ve damar maturasyonunu içerir. Anjiojenez sadece yararlı doku gelişimine ve rejenerasyona neden olmaz aynı zamanda malignant hastalıkları da içerir. Örneğin anormal damar gelişimi ve yeniden biçimleme diabetik komplikasyonları, artriti, endometriyozu, sedef hastalığını, kanseri, inflamatuvar rahatsızlıklarını, göz hastalıklarını ve hipertansiyonu tetikler (Shi vd., 2017). Anjiojenez endotel hücre çoğalmasını, göçü ve farklılaşmasını içerir ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok proanjiojenik faktörler tarafından uyarılmaktadır (Hoeben vd., 2004). Buna ek olarak anjiojenez kollajen ve fibronektin gibi integrin ve hücre yüzey proteinleri arasındaki etkileşim aracılığıyla ekstraselüler matriks bileşenleri tarafından uyarılabilir (Iivanainen ve ark., 2003).

1.3. Laktik Asit Bakterileri

Probiyotik, bağırsak sistemi mikroflorasının dengesini ayarlayan yararlı organizmalara denir. İlk olarak 1965 yılında kullanılmış bir terimdir. Yunanca’da “yaşam için” anlamına gelmektedir (Lilly ve Stillwell, 1965). Probiyotiklerin büyük bir çoğunluğu laktik asit bakterileridir.

Laktik asit bakterileri gram pozitif, çubuk ya da kok şeklinde, spor oluşturmayan, asit toleranslı, düşük guanin- sitozin içeren, anaerob ya da mikroaerofilik özelliklere sahiptir. Laktik asit bakterileri probiyotikler olarak bilinen konağına sağlık açısından fayda sağlayan yaşayan mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterileri doğada geniş alana yayılmıştır, endüstriyel açıdan önemlilerdir. Endüstriyel gıda

fermantasyonunda kullanılırlar. Son dönemlerde bazı laktik asit bakteri suşlarının önemli başka biyolojik fonksiyonları olduğu saptanmıştır (Nakagawa ve Miyazaki, 2017). Merak uyandırıcı bir şekilde endüstriyel mikrobiyoloji 1890’larda başlamış ve ilk starter kültür ürünü olarak peynir ve ekşi süt üretilmiştir ardından laktik asit bakterileri önem kazanmıştır (Sauer vd., 2017). Fermentasyon ürünü olarak laktik asit oluştururlar (Patel vd., 2012). Laktik asit üretimi ve primer metabolit olarak da şeker metabolizmaları ile ekolojik çeşitliliğe sahiptirler (Li vd., 2014). Laktik asit bakterileri gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde kullanılmalarının yanı sıra salgıladıkları metabolit ürünü olan ekzopolisakkaritler ile son zamanlarda araştırma konusu olmuşlardır. Polisakkaritler; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilen önemli bileşiklerdir. Ekzopolisakkaritler (EPS), laktik asit bakterilerinden elde edilen ekstrasellüler biyopolimerlerdir. EPS’ler biyolojik dengeleyici, kıvam arttırıcı ve emülgatör olarak süt endüstrisinde kullanılır (Abraham vd., 2009; Behare vd., 2009). Ruas-Madiedo ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada EPS’nin hücre tanımasını, adhezyonunu ve biyofilm oluşturarak farklı ekosistemlerin kolonizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS’nin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri vardır. Anti-tümör, bağışıklığı düzenleyici, antikanser, gastrointestinal rahatsızlık iltihaplanmasını geliştirici, kan basıncı ve kolesterolün her ikisini de düşürücü etkiye sahip olması insan sağlığında önemli rol oynamaktadır (Li vd., 2015). Polisakkaritlerin antikanser etkiye sahip olduğunu ilk kez 1946 yılında Nauts ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Sayısız çalışmada polisakkaritlerin tümör gelişimini inhibe ettiği ileri sürülmüştür. Polisakkaritin antikanser özellikleri üç yaklaşımda gösterilmiştir; direkt sitotoksiste, bağışıklık arttırma, konvensiyonel antikanser ilaçlar ile tedavide sinerjik etki. Direkt sitotoksiste polisakkaritlerin kanser indüksiyonu ile karışması, büyümesi, hücresel apoptozu indükleyerek ilerlemesi ve hücre döngüsünü önlemesi, tümör istilasını, adhezyonunu ve metastazını inhibe etmesini içerir. Bağışıklık arttırma, konak hücrenin immunofonksiyonunu arttırma ile tanımlanır. Diğer kemoterapotik ilaçlar ile sinerjik çalışmalar kanser tedavilerine karşı belirgin gelişmeler gösterir (Zong vd., 2012).

Zahran ve arkadaşları (2017) *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469’ dan elde edilen ekzopolisakkaritin düşük seviye iyonize radyasyon terapisi ile kolorektal kanserin hedef sinyallerini baskılayabileceği hipotezini kurmuşlardır. Çalışmalarının

sonucunda hipotezlerini destekleyici bulgular edinmişlerdir. Bu bulgular kolorektal kanserin tedavisinde potansiyel terapötik olarak EPS'nin kullanılabileceğini göstermiştir. Kronik inflamasyon kanser oluşumuna yönelik katkı sağlayan bir faktör olabilir. Yapılan çalışmalar inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kolorektal kanser arasında direkt bağlantı olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda uzun süre ülseratif kolit ve Crohn hastalığını çeken hastaların kolorektal kansere yakalanma riskinin fazla olduğunu göstermektedir (Sengupta vd., 2015). Farklı nedenler inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile bağlantılı olup bunların bazıları doğrudan ya da dolaylı olarak kolorektal kanserle ilişkilidir (Wang ve Huycke, 2015). İntestinal mikrobiyoma uygun olmayan bağışıklık tepkisi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Kanser oluşmasında inflamasyon kilit taşı faktördür. Probiyotikler ev sahiplerine yeterince sağlık açısından yarar sağlarlar. Carmen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada genetiği değiştirilmiş laktik asit bakterisi inflamatuvar bağırsak hastalıklarına karşı yeni tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Genetiği değiştirilmiş laktik asit bakterileri uygulanan farelerde, özellikle deney sonunda elde edilen numunelerde, kronik bağırsak iltihabı hasarı skorlarında azalma olduğunu göstermişlerdir (Carmen vd., 2017).

Probiyotikler sağlığı teşvik eden bakteriler olarak tanımlanmaktadır. *Lactobacillus casei*, *L.paracei*, *L.rhamnosus* ve *L.plantarum* gibi *Lactobacillus* türleri, birçok süt ürünü ve günlük fermente olmayan gıda ürünlerinin üretiminde kullanılan en yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler arasındadır. Probiyotik yiyecekler yeterli miktarda canlı mikroorganizma içermelidir, ancak son çalışmalar inaktive edilmiş hücreleri veya hücre özütlerini içeren yeni fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine yöneliktir. Probiyotiklerin sağlığı teşvik edici özellikleri başlangıçta Rus immünolog Elie Metchnikoff tarafından tanımlanmıştır ve 1907'de "Yaşamın uzatılması" adlı kitabında sunulmuştur. Günümüzde, bazı çalışmalar probiyotiklerin irritabl bağırsak hastalığı (Del Carmen vd., 2011), antibiyotikle ilişkili diyare (Szajewska ve Kolodziej, 2015) ve nekrotizan enterokolit gibi çeşitli sindirim bozukluklarına karşı başarılı olabileceğini göstermiştir (Deshpande vd., 2010). Ek olarak, probiyotikler, kolorektal kanserin önlenmesine karşı da olumlu bir etkiye sahip olabilir. Bağırsak mikroflorasının değiştirilmesini, kolon kanseri hücrelerine yapışmayı ve anti-proliferatif aktiviteyi

içeren çeşitli moleküler ve hücresel mekanizmalar yoluyla etki ederler (Bermudez-Brito vd., 2012; Mantzourani vd., 2019).

1.4. Ekzopolisakkaritler

Polisakkaritler monosakkaritlerin arasında glikozit bağları kurularak oluşmuş biyopolimerlerdir. Bu yapılar doğrusal ya da dallanarak zincirleri oluşturmuşlardır. Polisakkaritlerin genel formülü $C_X(H_2O)^Y$ dır. X yerine 200 ve 2500 arası yazılabilir. Polisakkaritler kaynaklarına göre iki grupta sınıflandırılır. Doğal polisakkaritler ve yarı sentetik polisakkaritler. Doğal polisakkaritler mikroorganizmalar, algler, bitkiler ve hayvanlardan elde edilir. Yarı sentetik polisakkaritler ise temel makromoleküllerin kimyasal ya da enzimatik modifikasyonları ile üretilirler. Polisakkaritler çeşitli kimyasal kompozisyonların, moleküler ağırlıkları ve yapıları varlığında farklı kaynaklardan elde edilirler. Polisakkaritler jelatin, çözülebilirlik, düşük ozmotik etki ve yüzey gibi çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Ayrıca polisakkaritler biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir. Bunlardan bazıları enerji depolaması (nişasta ve glukojen), yapısal bileşen olması (selüloz ve kitin), sinyal teşhisi, hücre-hücre iletişimidir.

EPS'ler doğal oluşumlu bioaktif bileşiklerin önemli bir sınıfı olarak sayılırlar. EPS genellikle bulundukları yere bağlı olarak iki şekilde meydana gelir: çevredeki ortama salgılanan ekzopolisakarit (r-EPS) ve hücre yüzeyine kovalent olarak bağlanan ve böylece bir kapsül oluşturan hücreye bağlı ekzopolisakarit (b-EPS) (Sanalibaba ve Cakmak, 2016). Mikrobiyal polisakkaritler arasında laktik asit bakterileri tarafından üretilen bu polisakkarit en önemli sekonder metabolit olup, immuno düzenleyici, kolesterol düşürücü, anti-koagulan, antioksidan, anti-viral, antibiyotik, anti-mutant, anti-tümör ve anti-kanser etkisi gibi çoklu farmokolojik aktiviteler ile ilişkili olup aynı zamanda gıda araştırmalarında artan ilgiyi üzerine almıştır (Deepak vd., 2015). Bu nedenle laktik asit bakterilerinden türevlenen EPS ideal bir kolon kanseri önleyicisi ve terapötik adaydır. EPS üreten mikroorganizmalar arasında, laktik asit bakterileri (LAB) ürettikleri, sağlık tehlikesi içermeyen ve genellikle güvenli olduğu kabul edilen olağanüstü biyopolimer özellikleri nedeniyle özel ilgi görmüştür (Anjum vd., 2013). Gıda endüstrisinde kullanılan bakteriyel EPS, benzersiz fonksiyonel özelliklerinden dolayı emülsifiye edici, dengeleyici ve viskoz edici bir madde olarak rol oynar (Liu vd., 2010). Ayrıca, bazı bakteriyel EPS'ler, hidrofobik moleküller, iyon değişim reçineleri,

kapsülleyici malzemeler, biyo-emiciler ve biyo-akışkanlar için konakçı olarak çeşitli endüstrilerde kullanılabilir (Kavita vd., 2014). LAB yoluyla üretilen EPS'ler, peynir ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin dokusunu, akışkanlığını ve ağız hissinin iyileştirme potansiyeline sahiptir (Anjum vd., 2013). Ayrıca, LAB tarafından üretilen EPS, konağın gastrointestinal kanalında sabit kalır, böylece yararlı bakterilerin kolonizasyonunu artırır. LAB-EPS ayrıca antioksidan aktivitesi, antibiyofilm aktivitesi ve antitümör aktivitesi için de rapor edilmiştir (Kanmani vd., 2013; Sungur vd., 2017). Farklı çalışmalar probiyotiklerin anti-proliferatif ve anti-kanser özelliklerini göstermiştir (Tiptiri- Kourpeti vd., 2016). Probiyotik bakterilerin antikanser etkilerine; kanserojen ürünlerin inhibisyonu (Motevaseli, 2017), oksidasyondan DNA koruması, immun sistem düzenlemesi (Abedin-Do vd., 2015) ve apoptoz, istila, metastaz, kök hücre bakımı ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan genlerin serbest bırakılması aracılık eder. Ayrıca probiyotik tedavisinin, gastrointestinal kanser ve iltihapları iyileştirmek ve üstesinden gelmek için etkili bir strateji olduğu görülmektedir. EPS içeren polisakkaritin anti-kanser aktivitesi, monosakkarit kompozisyonu, molekül ağırlığını, polimerik omurga yapısını ve yan zinciri etkiler. *Lactobacillus helveticus*'dan *in vitro* ortamda elde edilen EPS'nin antioksidan aktivitesi, karakterizasyonu, saflaştırılması ve üretilmesi rapor edilmiştir. Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada EPS'nin Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak EPS'nin doğal anti-kanser ilaç olabileceği düşünülmektedir (2015). EPS'lerin kısmen de sülfatlanmış polisakkaritleri son zamanların yoğun araştırma konusu olmuştur. Ekzopolisakkaritin şeker bileşenleri glukoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, mannoz, ramnoz ve fukoz türevleridir. Örneğin arabinozun EPS'de varlığı hücre agregasyonuna sebep olur. Diatomdaki EPS, ramnoz ve fukoz gibi deoksi şekerler köpüğe, topaklanmaya ve hücre adhezyonuna etki ederler. EPS *in vivo* ortamda tümör büyümesine karşı olarak inhibitör özellik sergiler. *In vitro* ortamda da kanser hücre hatlarının çoğalmasını inhibe eder. EPS'nin anti-tümör aktivitesi moleküler ağırlık ve sülfatlaşma seviyesini kritik seviyede etkilediğini göstermiştir (Geresh vd., 2002).

EPS'nin sadece 6.53 - 1002 kDa ağırlığındaki moleküler ağırlığa sahip *P.cruentum* 'dan elde edilen formu fare modellerinde S180 tümörünün hücre çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur (Sun vd., 2012). EPS'de artan sülfatlaşma seviyesinin kanser inhibisyon özelliğini geliştirdiği rapor edilmiştir (Geresh vd., 2002).

Shopen-Katz ve arkadaşları (2000) tarafından *Porphyridium sp.* ve *R. Reticulata*’ dan elde edilen EPS’deki sülfat artışının neoplastik memeli hücre büyümesi ve ratlarda kolon kanseri hücrelerinde çoğalmayı inhibe edici etkisi kanıtlanmıştır (Geresh vd., 2002). EPS’deki sülfat artışı anti-tümör aktivitesinin ana mekanizması olarak bağışıklık sisteminin güçlenmesini indüklemektedir. EPS tümörlü hücre farklılaşması, apoptoz ve hücre sinyal yolağının düzenlenmesine neden olur. Etkileşimi bloke eder ya da kanser hücreleri ve konak hücre arasında adhezyona sebep olur (Raposo vd., 2014; Zhou vd., 2004; Xiao vd., 2016).

1.4.1. EPS’nin anjiojenez üzerine etkisi

Kanser uzun yıllardır insan sağlığı açısından ciddi bir zorluk yaratmıştır. Son gelişmelerde moleküler tanı teknikleri kanserin en erken evrelerinde kan ve idrarda kanser biomarkerlerini incelemeyi ve belirlemeyi mümkün kılmaktadır (Comittee, 2015). Kanserde anjiojenez yöntemleri arasındaki farklılıkların tanılaması ve bunların normal hücrelerde bulunması kanser terapisinde hedef olarak kullanılabilen ve anjiojenezde aktif ve sadece bulunan özel moleküllerin tanılamasına yol açar (Fallah vd., 2019).

Birçok çalışmada bitki ekstratlarından ve böcekten türetilmiş materyaller gibi doğal biyomateriyallerin pro-anjiojenik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Doğal kaynaklardan elde edilen biyomoleküller arasında ekzopolisakkaritlerin anjiojenezi uyardığı rapor edilmiştir. Ekzopolisakkaritler çeşitli bakteri, mantar, maya ve denizsel alglerden salgılanan yüksek moleküler ağırlığa sahip olan şeker polimerleridir. Bu EPS’ler farmosötik, nutrasötik ve fonksiyonel gıda endüstrisinde fonksiyonel uygulamalara sahip ve potansiyel olarak kullanılırlar. Park ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada Neungee mantarından izole edilen MK1 bakteri suşu tarafından salgılanan yeni bir EPS keşfettiklerini rapor etmişlerdir. MK1-EPS, tümör nekroz faktör alfa, interlökin 1 beta ve nitrik asit RAW 264.7 hücrelerinde gibi sitokin ürünlerini uyarmayla bağışıklık düzenleyici aktivite sergiler. Birçok çalışma doğal EPS’nin anjiojenik aktiviteyi arttırdığını rapor etmiştir. MK1 –EPS’ nin HUVEC hücrelerinde çoğalmayı başlattığı gösterilmiştir. Daha sonra MK1- EPS’nin anjiojenezi desteklediği belirlenmiş ve tüp formasyon ile yara iyileştirme deneylerini uygulamış olup, HUVEC hücrelerinin anjiojenik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Park vd., 2016). Tümör anjiojenezi ve istilası iyi huylu tümörün malignan transformasyonunu içeren büyük

kanser özellikleridir. Bu patolojik değişimlerin inhibisyonu kanser metastazını ve ilerlemesini baskılayan iyi tanımlanmış stratejilerdir. Tümör mikroortamında VEGF ekspresyonu kaldırılmıştır ve anjiojenik aksiyon potenti kurulmuştur. VEGF, tümör kitlesinin büyümesinde hızlıca yeni vasküler ağları iç tarafına iletir. Böylece tümör malignitesi, istilası ve metastazı için harika bir çevre oluşturur. Şimdiki klinik girişimler kanser tedavilerinde VEGF hedefli yeni anti-anjiojenik moleküllerin keşfine yöneliktir. Dey ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada HUVEC hücresinden salgılanan VEGF molekülünün anti-anjiojenik etkisi olabileceğini böylece kanser tedavilerinde ajan olabileceğini bulmuşlardır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Biological Industries), Fetal Bovine Serum (Sigma), Tripsin-EDTA solution (Biological Industries), PBS solution, PBS-EDTA solution, Matrigel, Heparin, Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS), Endothelial Cell Basement Medium (EBM-2).

2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik, 75 cm²'lik, 175cm²'lik flaklar, 96 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), Rezervuar kapları, Thoma lamı, Vakum Sistemi (Nalgene).

2.3. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, 0,5-10 µl'lik mikropipet, 10-200 µl'lik mikropipet, 100-1000 µl'lik mikropipet, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.4. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, ve 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır.

2.5. Kullanılan Hücre Hatları

2.5.1. Caco-2 hücre kültürü

Hücre stoklarımızda bulunan Şap Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiş insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) bu çalışmada kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri

inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum DMEM-F12, %1 (v/v) Penisilin – Streptomisin ve %7,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 75 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.2. HUVEC hücre kültürü

Proje kapsamında *in vitro* deneylerin uygulanması için ATCC (American Type Culture Collection)'den HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells) hücreleri temin edilmiştir. Hücreler Nutrient Mixture F12 Ham, %10 Fetal Bovine Serum, 10 mL/L Penisilin/Streptomycin, 100 mg/L Heparin, 30 mg/L Endothelial Cell Growth Supplement'dan (ECGS) oluşan medyum içerisinde 37°C'de, %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe geliştirilmiştir.

2.6. Kullanılan Test Maddelerinin Hazırlanması

Çalışmada, Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Merih Kıvanç tarafından kısmi saflaştırılan pellet haline getirilen test madde (EPS) ultra saf su içinde çözülerek uygun dozlar hazırlanmıştır.

Lactobacillus rhamnosus G28.2 suşundan elde edilen EPS ile iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultra saf su içinde çözülerek Caco-2 için 3000 – 4000 – 5000 - 6000 µg/ml ve HUVEC için 250 – 500 – 1000 – 2000 – 3000 – 4000 – 5000 – 6000 - 8000 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak çözücü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.1. Ekzopolisakkaritin izolasyonu

L.rhamnosus MRS brotha inoküle edilerek 24-48 saat süre ile anaerobic koşullarda 35°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakteriler 6000 rpm' de +4 °C'de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte oluşan sıvı alınarak farklı bir tüpe aktarılmıştır. Tüpün üzerine %20 konsantrasyonunda trikloroasetik asit ilave edilerek +4 °C'de bir gece bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 10000 rpm' de +4 °C'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst kısımda oluşan sıvı alınarak bir başka tüpe aktarılmıştır ve sıvının üzerine soğutulmuş bir hacim etanol eklenerek -20 °C'de bir gece bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 10000

rpm' de +4 °C'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst kısımda oluşan sıvı kısım dökülmüştür ve altta oluşan pelet üzerine sıcak distile su ilave edilerek pelet çözündürülmüştür.

2.7. Yöntem

2.7.1. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu Caco-2 hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 6×10^3 hücre ve Huvec hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 8×10^3 hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda bu sayı seçilmiştir. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 ve 48 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir

2.7.1.1. *In vitro* sitotoksosite testi (MTT testi)

Sitotoksosite, hücrelerin adaptif yeteneklerinin yanı sıra hayatta kalma, üreme ve metabolik fonksiyonlarını yerine getirme becerilerine müdahale eden bir dizi modifikasyona yol açan hücrel homeostazının değişikliklerinden oluşan bir olaylar dizisidir (Todryk vd., 2001). Bir sitotoksosite testi, biyolojik aktivitesi için halihazırda araştırılan bir maddenin toksisitesini ve güvenliğini belirlemenin önemli bir yoludur ve bu testler, terapötik potansiyeli olan yeni bir ürünün geliştirilmesinin erken aşamalarında gerçekleştirilir (Sánchez vd., 2006; Badel vd., 2011). En sık kullanılan *in vitro* sitotoksosite testleri, bazal sitotoksositeyi değerlendirerek toksik konsantrasyon limitinin tanımını sağlar. Genel olarak, yöntem boyalar kullanılarak hücre geçirgenliği değişimine dayanır (Sánchez vd., 2006; Ahmed vd., 2013). MTT, canlı hücreler ile inkübe edildiğinde, substratını dehidrojenazlar gibi mitokondriyal enzimler yoluyla kırar ve sarı bir bileşikten koyu mavi bir bileşiğe (formazan) dönüştür.

Formazan üretimi, solunum zincirinin işlevsel durumunu ve hücre canlılığını yansıtır. Hücrelerin MTT'yi azaltma kabiliyeti, hücre canlılığı ölçüsü olarak yorumlanan aktivite ve mitokondriyal bütünlüğün bir göstergesidir (Wang vd., 2008; Maeda vd., 2004).

Caco-2 hücreleri, Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 6×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir, 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri uzaklaştırılmış ve test maddesi uygulanmıştır. Hücreler gerekli sürelerde inkübasyona bırakıldıktan sonra, besiyerleri gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerden uzaklaştırılmış ve MTT ilavesi yapılarak test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptanmıştır.

HUVEC hücreleri de sayıldıktan sonra her kuyucukta 8×10^3 hücre olacak şekilde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır ve ardından test maddesi ile muamele edilmiştir.

2.7.1.2. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml-1 MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondriyal metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir. Deneyler 8 paralel halinde ve 3 tekrar olarak yapılmıştır.

2.7.3. Tüp formasyon testi

96 kuyucuklu plakalar 70 μ L/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanarak 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Yaklaşık 4 saat %1 serum (FBS) içeren EBM-2 (Endothelial Cell Basement Medium) içinde serum açlığına maruz bırakılan hücreler 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde %1 oranında serum ve test maddelerinin belirlenen

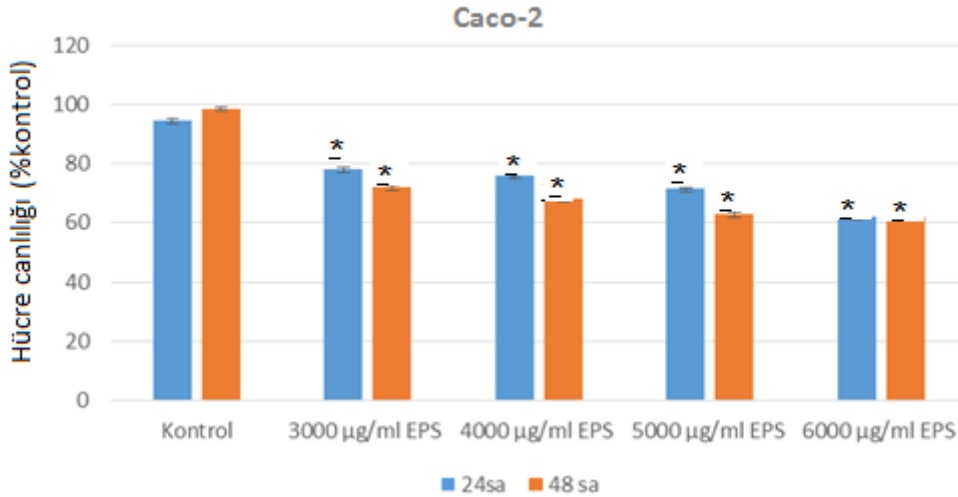
konsantrasyonlarını içeren EBM-2 medyum içinde matrijellerin üzerine ekilmiş ve yaklaşık 12 saat bekletilmiştir. Tüp ağı oluşumları mikroskop altında rastgele seçilmiş 9 alandan görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkarit Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Etkileri

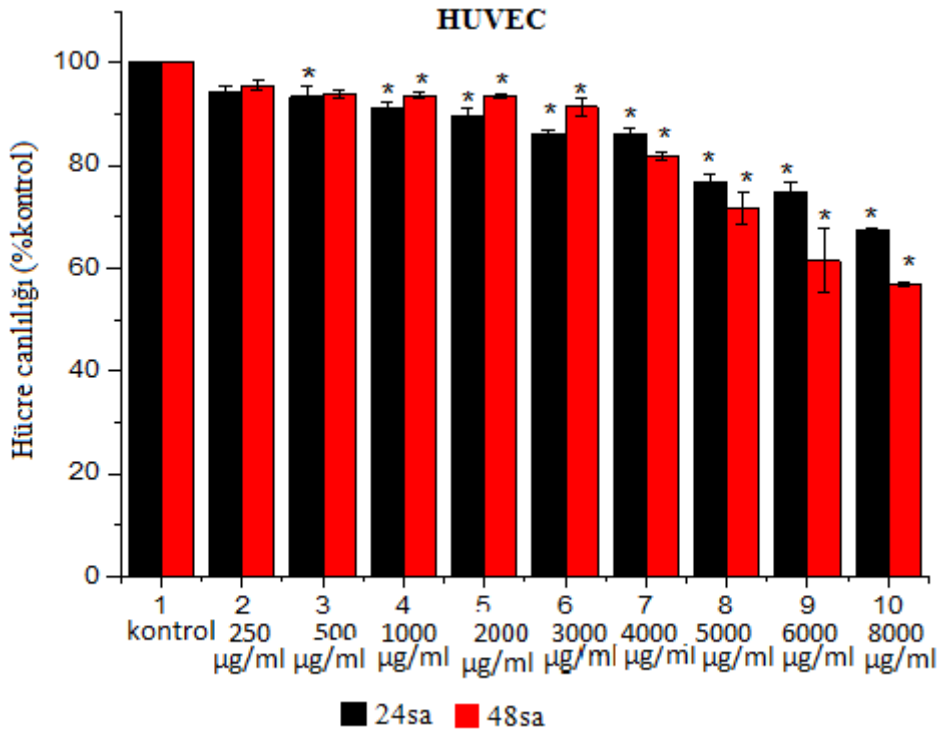
L. rhamnosus G28.2'den elde edilen EPS'nin, 6×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi sırasıyla 3000-4000-5000 ve 6000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 250-500-1000 ve 2000 µg/ml'lik dozlarda hücre çoğalmasını etkilemediği görülmüştür. EPS'nin Caco-2 hücrelerin üzerinde 3000 µg/ml'lik konsantrasyondan başlayarak hücre çoğalmasını azaltıcı etkisinin olduğu saptanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda olarak 24 saatlik deney sonucunda 3000-4000-5000 ve 6000 µg/ml olacak şekilde uygulanan dozlarda kontrole bağlı hücre canlılığında % 22 ile % 38 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 48 saat sonucunda %28 ile %38 oranında düşüş gösterirken, en fazla düşüşü gösterdiği konsantrasyon 6000 µg/ml ile muamele de kontrole bağlı hücre canlılığında % 38 oranında düşüş görülmektedir.



Şekil 3.1: Ağızdan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *L.rhamnosus* G28.2 elde edilen EPS'nin, Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.2. *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Etkileri

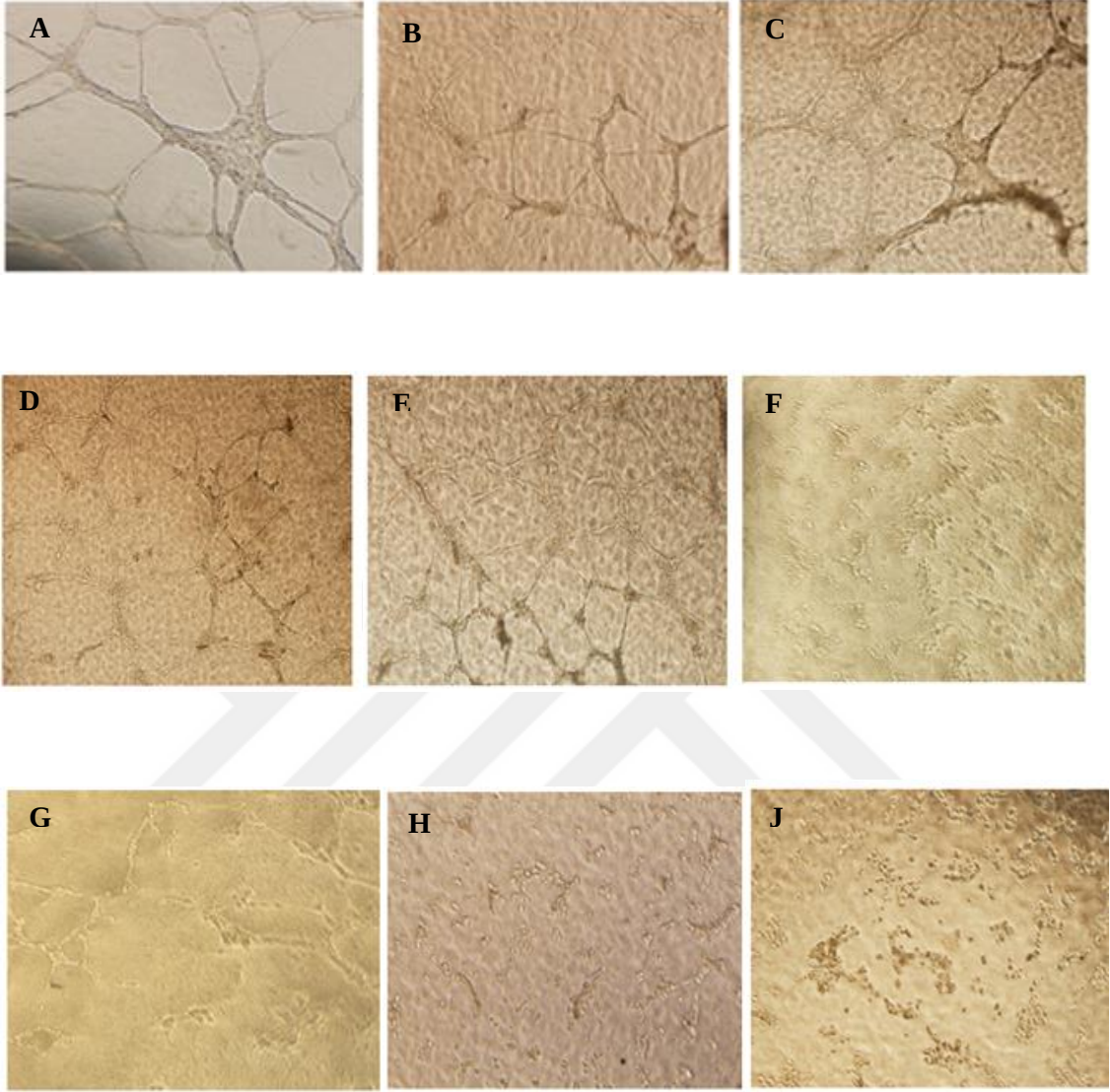
Ekzopolisakkarit uygulanan hücrelerle yapılan MTT testi sonucunda 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml ve 3000 µg/ml konsantrasyonlarında HUVEC hücrelerinde anlamlı sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. 4000 µg/ml dozundan itibaren artan konsantrasyonlara bağımlı olarak hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Tespit edilen maksimum sitotoksik etki 2.gün 6000 µg/ml ve 8000 µg/ml dozlarında gözlemlendiği ve hücre canlılığını %58 - %52 seviyesine kadar düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen MTT sitoksisite sonuçları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.



Şekil 3.2: Ağızdan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *L.rhamnosus* G28.2’den elde edilen EPS’nin, HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.3. *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 den Elde Edilen Ekzopolisakkaritin HUVEC Hücrelerinin Anjiojenezi Üzerine Etkisi

Ağızdan izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* G28.2 elde edilen ekzopolisakkariti, insan göbek kordonu veni endotel hücreleri (HUVEC) üzerine uygulanarak damar oluşumu 250-500-1000-2000-3000-4000-5000 ve 6000 µg/ml’lik konsantrasyonlarda tüp formasyon testi ile incelenmiştir (Şekil 3.3). Olympus IX70 mikroskopta 10x büyütme ile görüntülenmiştir. HUVEC hücrelerinde damar oluşumunu etkileyen en düşük dozun 3000 µg/ml olduğu görülmüştür. Anjiojenezi etkileyen 6000 µg/ml’lik en yüksek konsantrasyon olduğu saptanmıştır. Anjiojeniz yeni damarlar oluşumu ve kanserin metastazı için önemli bir roldedir. 250 µg/ml’lik konsantrasyonun HUVEC hücreleri üzerinde belirli bir etkisi olmadığı saptanmıştır.



Şekil 3.3 : *L.rhamnosus* G28.2 elde edilen EPS'nin, HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin tüp formasyon testi ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 250 µg/ml, C: 500 µg/ml, D: 1000 µg/ml, E: 2000 µg/ml, F: 3000 µg/ml, G: 4000 µg/ml, H: 5000 µg/ml, J: 6000 µg/ml.

4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Küresel kanser ölümlerinin %70'inden fazlası Asya, Afrika ve Amerika kıtasındandır (Vidya vd., 2015). Mevcut on yılda, genomik içeren kanserle ilgili yoğun araştırmalar, proteomiks ve moleküler patoloji, kanser ve halkın bilinçlendirilmesi hakkındaki bilgileri geliştirmiştir. Aynı zamanda, ışıldayan lüminesan özelliklere sahip nanoteknoloji ve biyoteknoloji (nanokapsül) kullanan birçok yeni ilacın keşfedildiği, ancak yine de bunların yük ve yan etkilerine karşı toleransının önemli bir sınırlama olduğu görülmüştür. Probiyotikler gibi anti-kanserojen etkiler yaratan doğal kaynaklar, son yıllarda odak noktası haline gelmiştir (Gayathri vd., 2016). Probiyotikler, hastalıkları azaltmak ve yan etkileri olmayan veya etkili bir ilaç geliştirmek için klinik beslenme uzmanları, bilim adamları ve sanayiciler tarafından yoğun ilgi görmüştür. Bütün hücreler; sıcakla öldürülen hücreler, hücre duvarı, peptidoglikanlar, polisakkaritler ve sitoplazmik fraksiyonlar gibi çeşitli laktik asit bakteri preparatları, insan kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri sergilemektedir (Halper vd., 2003). *Lactobacilli* kültürlerinden elde edilen ekstraktlar veya süpernatantlar, yara iyileşmesi ve bağışıklık sistemini uyarıcı aktivite dahil olmak üzere tıbbi etkileri için kullanılır. *Lactobacillus*'tan elde edilen ürünler ve özler, Uzak Doğu'da uzun yıllardır gıda fermantasyonunda ve bunların yara iyileşme ve antiviral özelliklerinde kullanılmıştır. *Lactobacillus* EPS'lerinin, enerjiyi artırdığı ve alerjiler, soğuk algınlığı, laktoz intoleransı için etkili ilaçlar olduğu ve kolon kanseri riskini azaltmada ve kolesterol seviyelerini düşürmede aktif olduğuna inanılmıştır (Ray, 1996; Wollowski, 1999). *In vitro* çalışmalar, probiyotik suşları *Lactobacillus fermentum* NCIMB-5221 ve -8829'un kolorektal kanser hücrelerini baskılamakta ve SCFA'ların (ferulik asit) üretilmesi yoluyla normal epitelyal kolon hücresi büyümesini arttırmada oldukça etkili olduğunu göstermiştir (Kahouli vd., 2015). Bu yetenek ayrıca her ikisi de daha önce tümörijenik aktivite ile karakterize edilmiş olan *L. acidophilus* ATCC 314 ve *L. rhamnosus* ATCC 51303 olan diğer probiyotiklerle karşılaştırılmıştır. Yine iki farklı probiyotik suşunun *L. acidophilus* LA102 ve *L. casei* LC232'nin, iki kolorektal kanser hücre hattına (Caco-2 ve HRT-18) karşı *in vitro* anti-proliferatif aktivite ile belirgin sitotoksik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (Kerry vd., 2018).

Bazı probiyotik bakteri suşlarının, bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitelerinin değiştirilmesi; kolondaki fizyokimyasal koşulların değiştirilmesi; potansiyel kanserojenlerin bağlanması ve bozulması; bağırsak mikroflorasında kantitatif veya kalitatif değişiklikler; anti-tümörijenik veya antimutajenik bileşiklerin üretimi; konağın immün yanıtının artırılması; ve konak fizyolojisine etkileri gibi çeşitli mekanizmalarla kolon kanserine karşı koruma potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Commane vd., 2005; Ewaschuk vd., 2006; Rafter, 2003).

Kolorektal kanser dünya çapında kanser yoluyla morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir (Thirabunyanon vd., 2009). Genetik arka plan ve yaşam tarzı ve diyet gibi çevresel faktörler kritik rol oynar. Bağırsak mikrobiyota, yerel homeostasi ve patojenlere karşı epitel savunmasını korumak için gerekli olan bakteri, virüs, arkea ve fungal türlerden oluşur (Gao vd., 2017). Probiyotikler, dengesiz bağırsak mikrobiyotasını düzenleyebilir. Kolorektal bölgede kanserojen-uyarıcı oluşumu azaltarak, terapötik ve koruyucu bir strateji olarak kullanılabilir.

Arian ve arkadaşları, (2019) yaptıkları çalışmada *L. fermentum* (E suşu) ve *L. rhamnosus* (G suşu)'dan elde edilen hücresiz liyofilize filtrat ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinin çoğalmasının inhibe edildiğini saptamışlardır. 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki filtratın 24 ve 48 saatlik inkübasyonda Caco-2 hücrelerini %20- %30 oranında düşük sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. En etkili sitotoksik etkinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonda %40 oranında hücre çoğalmasını etkilediği 1000 µg/mL konsantrasyon olduğunu saptamışlardır. *L. rhamnosus* G suşunun 10000 µg/mL'lik dozdaki liyofilize edilmiş filtratının 24 saatlik inkübasyonda %60, 48 saatlik inkübasyonunda %70 ve 72 saatlik inkübasyonunda %80 sitotoksikite miktarı ile etkili bir konsantrasyon olduğunu saptamışlardır. Lee ve arkadaşları, (2008) LAB'nin, konakçı bağışıklık sisteminde, anti-tümör etkileri oluşturmak için önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212'nin bütanol özütünün doza bağlı olarak 200 g / mL'de Caco-2, HT-29 ve SW480 hücrelerinin büyümesini %70, %30 ve %40 oranında ve indüklenmiş makrofajı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aktivasyon ve immün modülasyonu düzenleyen ve tümör hücrelerine sitotoksik olan TNF- ve NO üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. Kumar ve arkadaşları, (2010) VK1'in Caco-2 hücrelerini en yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 200 µM) inhibe ettiği gözlemlemişlerdir. Bunların tümü, *Lactobacillus*'ların kanseri önleyici etkilerini kanıtlamaktadır. Ewaschuk ve arkadaşları, (2006)

Lactobacillus acidophilus, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. longum* ve *Streptococcus thermophilus*, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin canlılığını azalttıklarını ve hücre ölümünü indüklediklerini kanıtlamışlardır. Chen ve arkadaşları, (2012) farelerde CT-26 murin kolon adenokarsinom hücrelerinde probiyotik *L. acidophilus*'un oral aşılmasının sitotoksik etkiye ve apoptoza neden olduğunu saptamışlardır. Gamallat ve arkadaşları, (2016) *L. rhamnosus* 'un bir sıçan modelinde kolon kanserojenine ve apoptoz indüksiyonuna karşı koruyucu bir etkisi olduğunu bildirmiştir. Gayathri ve Asha (2012) *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus plantarum*, vinkristin ile farelerde 1,2-dimetilhidrazin kaynaklı kolorektal kanserojeniz üzerinde sinerjistik etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, probiyotikler, vinkristinin anti-kanserli aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır. Probiyotiklerin hayvan modellerinde kansere karşı etkileri üzerine bir çalışmada Tiptiri-Kourpeti ve arkadaşları, (2016) Tümör büyümesinin 10⁹ CFU canlı *L. casei* tarafından 13 gün boyunca inhibe edildiğini, kolon kansinoması hücrelerinin *in vivo* büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini, tedavi edilen farelerin tümör hacminde yaklaşık % 80'lik bir düşüşe yol açtığını göstermiştir. Dahası, *L.casei* ATCC 393'ün, *in vitro* murin ve insan kolon kansinoma hücre hatları üzerinde anlamlı bir anti-proliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Kahouli ve Malhotra (2015) *L. fermentum* NCIMB 5221'in 48 saat (~% 46) ve 72 saat (~% 58) sonrasında *L. fermentum* NCIMB 2797'den daha fazla kanser hücresi çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Er ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında, 3 farklı laktik asit bakteri suşlarının (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, ve *Weissella confusa*) hücresiz filtrat ve hücresiz liyofilize filtratının anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır. Çalışmaları sonucunda doza bağlı olarak filtratların Caco-2 hücreleri üzerinde hücre çoğalmasını inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Sadeghi-Aliabadi ve arkadaşları, (2014) ticari bir *L. rhamnosus* GG suşunun hücresiz filtratının Caco-2 üzerindeki etkisinin 48 saat sonra 2500 - 10000 µg / mL'de (~% 21 ile % 66) oranında hücre çoğalmasını engellediğini göstermişlerdir. Rajoka ve arkadaşları, (2018) yaptıkları çalışmada *L.rhamnosus* suşlarından elde edilen EPS'nin anti tümör etkisini Caco-2 hücreleri üzerinde araştırmışlardır. Bu amaçla EPS'nin 50-100 – 200 - 400 ve 600 µg/ml konsantrasyonlarıyla hücreleri muamele etmişlerdir. Sonucunda 600 µg/ml'lik konsantrasyonun Caco-2 hücrelerinde anti-tümör aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Anti-tumoral etkiler, probiyotik etkinin bir başka önemli parametresini temsil eder. *L.rhamnosus* GG'nin Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre çoğalmasında önemli inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir (Orlando vd., 2016). Ek olarak, hem mide hem de kolon kanseri hücre hatları, *L.paracasei* IMPC2.1 ve *L.rhamnosus* GG tedavisinin neden olduğu büyüme inhibisyonu ve apoptotik hücre ölümüne karşı duyarlıydı (Orlando vd., 2012). Benzer şekilde, yakın zamanda, feta tipi peynirden izole edilmiş bir LAB suşu olan *L.paracei* K5'in, apoptozun indüklenmesi ve pro-apoptoz ile ilişkili genlerin upregülasyonu yoluyla Caco-2 hücre çizgisi üzerinde büyüme inhibe edici etkiler uyguladığını göstermiştir (Chondrou vd., 2018). Kanser hücrelerinin *P.pentosaceus* SP2 veya *L.paracei* SP5 ile tedavisinden sonra HT-29 hücre büyümesinde önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, real time PCR analizi, iki ana anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ve Bcl-xL'nin downregülasyonunu ve G1-S geçişinin kritik bir aracı olan siklin A'nın aşırı ifadesini göstererek, hücre döngüsünün deregülasyonunu ve apoptozun indüksiyonunu gösterir. Gerçekten de, siklin A'nın aşırı ifadesinin çift zincirli DNA hasarına ve S faz ilerlemesinde bir gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (Tane ve Chibazakura, 2009). Akış sitometrisi ve immünoiblottlama ile protein seviyesinde analiz dahil olmak üzere gelecekteki deneyler, dahil olan moleküler ve hücresel sinyalleşme yollarını açıklayacaktır. Fermente gıda ürünlerinin üretimi için kullanılan canlı probiyotik bakteriler, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından genel olarak Güvenli Olarak Tanınır (GRAS). Ancak bazı popülasyonlar, kemoterapi veya radyasyona maruz kalan kanser hastaları, hamile kadınlar ve yapısal kalp hastalığı olan hastalar dahil olmak üzere potansiyel olarak risk altındadır (Doron ve Snyderman, 2015). Ayrıca probiyotik etkinliği, bakteri kültürünün koşullarına ve tüketici ürünü matrislerindeki koşullara ve ayrıca konakçı bağırsağı mikrobiyotasının bileşimine de bağlıdır (Marco and Tachon, 2013; Zmora vd., 2018). Son yıllarda, hücre içermeyen süpernatantların özellikleri ve belirli probiyotik bakterilerin koşullandırılmış ortamı ile ilgili araştırmalarda bir artış olmuştur. Buna göre, probiyotik *L.casei* ATCC 334 ve *L.rhamnosus* GG'den hücre içermeyen süpernatantların, matris metaloproteinaz-9 aktivitesini ve sıkı bağlantı proteini zona occludens-1 seviyelerini azaltarak, insan kolon karsinomu hücre hattı HCT-116'nın hücre istilasını azalttığı gösterilmiştir (Escamilla vd., 2012). Benzer şekilde, Saxami ve arkadaşları (2017) probiyotik suşları *L. pentosus* B281 ve *L.pantarum* B282'nin CM'sinin, hücre döngüsünün bir G1 tutuklanmasının indüklenmesi ve spesifik siklin genlerinin downregülasyonu yoluyla Caco-2 hücrelerinin

çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Bir başka çalışma, *L.casei* ATCC 334'ün CM'sinden izole edilen ferrikromun, hem *in vitro* hem de bir fare ksenograft modelinde antikanser özellikleri sergilediğini göstermiştir (Konishi vd., 2016). Mantzourani ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında *P.pentosaceus* SP2 ve *L.paracei* SP5'in CM'sinin, *in vitro* kanser hücresi çoğalmasını zaman ve konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir.

Anjiyogenezin, tümörlerin yayılması ve büyümesinde önemli bir rol oynadığına dair çok fazla kanıt vardır. 1971'de, Dr. Judah Folkman, tümör büyümesinin ve metastazının damar sistemine bağlı olduğunu ve yeni kan damarı oluşumunun bloke edilmesinin, tümör büyümesini inhibe etmek için etkili bir strateji olduğunu ileri sürmüştür. Böylece, bir çok anti-anjiyojenik ajan uzun yıllardır çalışılmaktadır (Zhang vd., 2011; Shi vd., 2016). Anjiyogenez inhibitörleri, geleneksel ajanlara göre önemli toksisite eksikliği, ilaç direnci eksikliği ve güçlü antitümör etkileri gibi çeşitli potansiyel yararlar göstermiştir (Zi vd., 2019). Anormal anjiyogenez, tümör gelişimine ve anjiyoproliferatif hastalıklara katılır. Matou ve arkadaşları (2004) mezofilik bakteri *Alteromonas infernus* tarafından salgılanan bir polisakaritten türetilerek aşırı ekstre edilmiş ekzopolisakkaritin anjiyojenik özelliklerini belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında ağızdan izole edilen *L.rhamnosus* G28.2'den elde edilen EPS'nin Caco-2 ve HUVEC hücreleri üzerinde sitotoksik ve anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımızda EPS'nin 6000 µg/ml'lik konsantrasyonunun 24 ve 48 saatlik inkübasyonunda Caco-2 hücrelerinde en etkili sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. 3000 µg/ml'lik düşük konsantrasyonda Caco-2 hücrelerinde hücre çoğalmasını çok fazla etkilemediği görülmüştür. 4000 µg/ml'lik konsantrasyonda artan dozlara bağlı olarak HUVEC hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonunda hücre çoğalmasını etkilemeye başladığı görülmüştür. En etkili konsantrasyonun 8000 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada EPS'nin HUVEC hücreleri üzerinde anti-anjiyojenik etkiye sahip olduğu en etkili 6000 µg/ml'lik konsantrasyon olup, damar oluşumunu etkileyen en düşük dozun 3000 µg/ml'lik konsantrasyon olduğu belirlenmiştir.

Probiyotikler kanseri nötralize etmede önemli bir rol oynayabilir olsa da, araştırmalar sadece *in vitro* testlerle sınırlıdır. Bu nedenle, probiyotiklerin anti-kanser potansiyeli, *in vivo* modellerde kanıtlanmalı, hayvan ve klinik denemelere doğru

ilerlemelidir (Kohuili vd., 2015; Kerry vd., 2018). Bu bulgular doğrultusunda LAB-EPS'nin biyo-ilaç olabileceği düşünölmektedir.



KAYNAKÇA

- Abedin-Do, A., Taherian-Esfahani, Z., Ghafouri-Fard, S., Ghafouri- Fard, S. and Motevaseli, E. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: Emphasis on their effects on cancer cells. *Immunotherapy*. 7(12):1307–29. doi: [10.2217/imt.15.92](https://doi.org/10.2217/imt.15.92). [PubMed:26595390].
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmadc, A. and Khan, S.T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - part II. *Food Hydrocoll.* 2013 (30), 343–350.
- Anjum, N., Ahmed, Z., Ahmad, A. and Tariq, S. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 343–350.
- Arian, S., Kaboosi, H., Heshmatipour, Z. and Koohpar, Z.K. Pyravii-Ghadikolaii. F. (2019). Anti-Proliferative Effects of Two New *Lactobacillus* Strains of Human Origin on Caco-2 Cell Line. *Iran Red Crescent Med J*. 2019 March; 21(3):e84683.
- Azcarate-Peril, M.A., Sikes, M., Bruno-Barcena, J.M. (2011). The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (3) G401-24.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. (2011). New perspective for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29, 54–66.
- Bagchi T. (2014). Traditional food & modern lifestyle: impact of probiotics. *Indian J Med Res*;140(3):333e5.
- Behare, P.V., Rameshwar, S., Kumar, M., Prajapati, J.B. and Singh, R.P. (2009). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: a review. *J Food Sci Technol* 46, 1–11.
- Bermudez- Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez- Llorente, C., Gil, A. (2012). Probiotic mechanism of action. *Ann Nutr Metab* 61:160-174. <http://doi.org/10.1159/00034209>.
- Carmen, S., LeBlanc, A. et al. (2017). Anticancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model, *international immunopharmacology* 42 122-129.
- Chan, A.T. and Giovannucci E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6):2029–2043.

- Chen, C.C., Lin, W.C., Kong, M.S., Shi, H.N., Walker, W.A., Lin, C.Y. et al. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br J Nutr.* **107**(11):1623–34. doi:10.1017/S0007114511004934. [PubMed: 21992995].
- Chondrou, P., Karapetsas, A., Kioussi, D.E., Tsela, D., Tiptiri-Kourpeti, A., Anestopoulos I et al (2018). *Lactobacillus paracasei* K5 displays adhesion, antiproliferative activity and apoptotic effects on human colon cancer cells. *Benefic Microbes* 0:1-10.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* 591:276–289.
- Committee, S. (2015). Cancer progress report, *Clin. Cancer Res.* 21 (19 Suppl) S1.
- Collins, T.S. Hurwitz H.I. (2005). Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer, *Semin. Oncol.* 32 61–68.
- Deepak, V. and Ramachandran, S. (2016). In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* (2016) 52:163-173.
- Del Carmen, S., de LeBlanc, A.M., Miyoshi, A., Rocha, C.S., Azevedo, V., LeBlanc, J.G. (2011). Potential application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease. *Ulcers* 841651-13. <https://doi.org/10.1555/2011/841651>.
- Deshpande, G., Rao, S., Patole, S., Bulsara, M. (2010). Updated meta- analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 125:921-930. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1301>.
- Dey, G., Bharti, R., et al. (2017). Therapeutic implication of ‘Iturin A’ for targeting MD-2 /TLR4 complex to overcome angiogenesis and invasion, *Cellular signalling* 35 24-36.
- Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R., et al. (2017). Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. *Carbohydrate Polymers*, 171, 307–315.
- Di, W., Zhang, L., Yi, H., Han, X., Zhang, Y., Xin, L. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* strains suppress HT-29 cell growth via induction of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis, *ONCOLOGY LETTERS* 16: 3577-3586.

- Doron, S. and Snyderman, D. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis* 60:S129-S 134. <http://doi.org/10.1093/cid/civ085>.
- Er, S., Koparal, T., Kıvanç, M. (2015). Cytotoxic Effects of Various Lactic Acid Bacteria on Caco-2 Cells. *Turk J Biol* 39: 23-30 TUBİTAK doi:10.3906/biy-1402-62.
- Escamilla, J., Lane, M.A., Maitin, V. (2012). Cell free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer invasion in vitro. *Nutr Cancer* 64:871-878. <http://doi.org/10.1080/01635581.2012.700758>.
- Ewaschuk, J.B., Walker, J.W., Diaz, H., Madsen, K.L. (2006). Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J Nutr* 136:1483–1487
- Fallah, A., Sadeghinia, A., et al. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis dependent diseases, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 110 775–785.
- Gamallat, Y., Meyiah, A., Kuugbee, E.D., Hago, A.M., Chiwala, G., Awadasseid, A., et al. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. *Biomed Pharmacother.* **83**:536–41. doi:10.1016/j.biopha.2016.07.001. [PubMed: 27447122].
- Gao, R., Gao, Z., Huang, L., Qin, H. (2017). Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **36**(5):757–69. doi: [10.1007/s10096-016-2881-8](https://doi.org/10.1007/s10096-016-2881-8). [PubMed: [28063002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28063002/)]. [PubMed Central: [PMC5395603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395603/)].
- Gayathri, D. and Asha. (2012). Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Exp Ther Med.*; **3**(6):1049–54. doi: 10.3892/
- Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J. (2002). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50 (2), 179–187.
- Ghany, K., Hamouda, R., Elhafez, E., Mahrous, H., Salem-Bekhit, M., Hamza, H. (2015). A potential role of LA-1 and Exopolysaccharide on Cancer Cells in Male Albino Mice. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol. 29, No. 5, 977_983.

- Halper, J., Leshin, L.S., Lewis, S.J., Li, W.I. (2003). Wound Healing and Angiogenic Properties of Supernatants from *Lactobacillus* Cultures. Exp Biol Med (Maywood). 2003 Dec;228(11):1329-37.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56:549–580.
- Iivanainen, E., Kahari, V.M., Heino, J., Elenius, K. (2003). Endothelial cellmatrix interactions. *Microsc Res Tech* 60:13–22.
- Imani Fooladi, A.A., et al. (2017). Recombinant staphylococcal enterotoxin type a stimulate antitumoral cytokines, *Technol. Canc. Res. Treat.* 16 (1) 125–132.
- Kahouli, I., Malhotra, M. (2015). Identification of *Lactobacillus fermentum* strains with potential against colorectal cancer by characterizing short chain fatty acids production, anti-proliferative activity and survival in an intestinal fluid: In vitro analysis. *J Bioanalysis Biomed.* 7(4). doi: [10.4172/1948-593x.1000132](https://doi.org/10.4172/1948-593x.1000132).
- Kanmani, P., Suganya, K., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A., et al. (2013). Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 1001.
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2014). Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 29–35.
- Kerry, R. Patra, J.K. Gouda, S. Park, Y. Shin, H. Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis* 26 (2 0 1 8) 9 2 7 e9 3 9.
- Keskin, M., Ustuner, Z., et al. (2015). Importance of serum VEGF and basic FGF levels in determining response to treatment and survival in patients with metastatic colorectal cancer, *International journal of hematology and oncology*.
- Konishi, H., Fujiya, M., Tanaka, H., Ueno, N., Moriichi, K., Sasajima, J. et al. (2016). Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nat Commun* 7:12365. <http://doi.org/10.1038/ncomms12365>.
- Kontos, C.D., Annex, B.H. (1999). Angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep*1:165–171.

- Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., et al. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: An update. *Int J Food Sci Nutr.* **61**(5):473–96. doi: 10.3109/09637480903455971. [PubMed:20187714].
- Lai, K., Hsu, H., Yang, J., Yu, C., Lein, J., Chung, J. (2015). Diallyl trisulfide inhibits migration, invasion and angiogenesis of human colon cancer HT-29 cells and umbilical vein endothelial cells, and suppresses murine xenograft tumour growth. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 19, No 2, pp. 474-484.
- Lee, D.K., Jang, S., Kim, M.J., Kim, J.H., Chung, M.J., Kim, K.J., et al. (2008). Antiproliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. *BMC Cancer.* **8**(1). doi:10.1186/1471-2407-8-310
- Li, H., Li, M., Luo, C., Wang, J., % Zheng, N. (2017). Lactoferrin Exerts Antitumor Effects by Inhibiting Angiogenesis in a HT29 Human Colon Tumor Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2017, 65, 10464–10472.
- Li, W., Tang, W., Ji, J., Xia, X. (2015). Characterization of a novel polysaccharide with anti-colon cancer activity from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Researched* 411(2015) 6-14.
- Li, Z., Zhang, X., Covasa, M. (2014). Emerging roles of Lactic Acid Bacteria in Protection Against Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* June 28; 20(24): 7878-7886
- Lilly, D., Stillwell, R. (1965). Probiotics, growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747–748
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., and Xiao, M. (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 101(14), 5528–5533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.151>.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., Kitamura, S. (2004). Structural characterization and biological activite of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5533–5538.
- Mantzourani, I. et al. (2019). Assessment of the probiotic potential of lactc acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in *in vitro* experimental systems, *Annals of Microiology* 69:751-763. <http://doi.org/10.1007/s13213-019-01467-6>.

- Marco, M.L., Tachon, S. (2013). Environmental factors influencing the efficacy of probiotic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 24:207-213. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.002>.
- Matou, S., Collic-Jouault, S., Galy-Fauroux, I. et al. (2004). Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 751-759
- Motevaseli, E., Dianatpour, A., Ghafouri-Fard, S. (2017). The role of probiotics in cancer treatment: Emphasis on their in vivo and in vitro anti-metastatic effects. *Int J Mol Cell Med*. 6(2):66–76. doi:[10.22088/acadpub.BUMS.6.2.1](https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.2.1). [PubMed: [28890883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890883/)]. [PubMed Central: [PMC5581548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5581548/)].
- Nakagawa, H. ve Miyazaki, T. (2017). Beneficial effects of antioxidative lactic acid bacteria, *Aims Microbiology*, 3 (1): 1-7
- Nauts, H.C., Swift, W.E., & Coley, B.L. (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, reviewed in the light of modern research. *Cancer Research*, 6, 205e214.
- Norouzi, Z., Salimi, A., Halabian, R., Fahimi, H. (2018). Nisin, a potent bacteriocin and anti bacterial peptide, attenuates expression of metastatic genes in colorectal cancer cell lines, *Microbial Pathogenesis* 123 183–189.
- Orlando, A., Refolo, M.G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heatkilled *Lactobacillus paracei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HCG-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer* 64:1103-1111. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.717676>.
- Orlando, A., Linsalata, M., Russo, F. (2016). Anti proliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int J Oncol* 48:2629-2638. <http://doi.org/10.3892/ijo.2016.3463>.
- Orlova, A., Sirotkina, M., Smolina, E., Elagin, V., Kovalchuk, A. (2019.) Raster-scan optoacoustic angiography of blood vessel development in colon cancer models, *Photoacoustics* 13 25–32.
- Park, E., Park, Y., Yuo H. (2016). Assessment of the anti-metastatic properties of sanguin H-6 in HUVECs and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters* 26(2016) 3291-3294.

- Park, J., Kim, B., Lee, J. (2016). Evaluation of the angiogenic potency of a novel exopolysaccharide produced by the MK1 bacterial strain, *Arch. Pharm. Res.* 39: 1223-1231.
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012). Potentials of Exopolysaccharide from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol* (Jan–Mar 2012) 52(1):3–12 DOI 10.1007/s12088-011-0148-8.
- Plank, M., Sleeman, B. (2003). Tumour-induced angiogenesis: a review, *J. Theor. Med.* 5 (3-4) 137–153.
- Prado, M.R.M., et al. (2016). Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir, *Microvascular Research* 108 29–33.
- Puro, D., Kohmoto, R., et al. (2016). Bioelectric impact of pathological angiogenesis on vascular function, *Pnas* August 30, 2016. Vol. 113, no. 35, 9934-9939.
- Rafter, J. (2003). Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:849–859
- Rajitha, B., Nagaraju, G. (2017). Novel synthetic curcumin analogs as potent antiangiogenic agents in colorectal cancer, *Molecular carcinogenesis* 56:288-299
- Rajoka, M.S.R. Jin, M. Haobin, Z. Li, Q. Shao, D. Jiang, C. Huang, Q. Yang, H. Shi, J. Hussain, N. (2018). *LWT - Food Science and Technology* 89 (2018) 638–647.
- Raman, M., Ambalam, P., Kondepudi, K., Pithva, S., Kothari, C., Patel, A., Purama, R., Dave, J., Vyas, B.R.M. (2013). Potential of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Management of Colorectal Cancer. *Gut Microbes* 4:3, 181–192; May/June 2013; Landes Bioscience.
- Raposo, M.F.J., Morais, A.M.M.B., Morais, R.M.S.C. (2014). Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae. In: Merillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnolog.* Springer, Cham, Switzerland, p. 38.
- Ray, B. (1996). Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications. In Bozoglu TF, Ray B, Eds, *NATO ASI Series*. Vol. H98. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A.G., Mozzi, F. and de los Reyes- Gavila'n, C.G. (2008). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In *Molecular*

- Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications ed. Mayo, B., Lo'pez, P. and Pe'rez-Martí'nez, G. pp. 137– 166. Kerala: Research Signpost.
- Sadeghi-Aliabadi, H. Mohammadi, F. Fazeli, H. Mirlohi, M. (2014). Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17:815-819.
- Sanalibaba, P. and Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2), 1000115. <http://dx.doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>.
- Sánchez, J.I., Martínez, B., Guillen, R., Jimenez-Diaz, R., Rodriguez, A. (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7495–7502.
- Sauer, M., Russmayer, H. et al. (2017). The efficient clad: lactic acid bacteria for industrial chemical production, *TIBTEC* 1504 1-14.
- Saxami, G., Karapetsas, A., Chondrou, P., Vasiliadis, S., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Ypsilatis, P. et al. (2017). Potentially probiotic *Lactobacillus* strains with anti-proliferative activity induce cytokine /chemokine production and neutrophil recruitment in mice. *Bemefic Microbes* 8:615-623. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0202>.
- Sengupta, N., Yee, E., Feuerstein, J.D. (2015). Colorectal cancer screening in inflammatory bowel disease, *Dig. Dis. Sci.* 61 (4) 980–989.
- Shi, Y., Zhu, N. et al. (2017). Wnt5a and its signaling pathway in angiogenesis, *Clinica Chimica Acta* 471 263-269.
- Shopen-Katz, O., Ling, E., Himelfarb, Y., Lamprecht, S., Arad, S., Shany, S. (2000). The effect of *Porphyridium* sp., biomass and of its polysaccharide in prevention and inhibition of human colon cancer. *Proceedings of the Era of Biotechnology*, p. 32.
- Sun, J. Zhao, Z., Li, W., Yang, G., Jing, P., Li, P., Dang, H., Chen, Z., Zhou, Y., and Li, X. (2017). Knockdown of MALAT1 expression inhibits HUVEC proliferation by upregulation of miR-320a and downregulation of FOXM1 expression. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (no. 37), pp 61499-61509.

- Sun, L., Wang, L., Zhou, Y. (2012). Immunomodulation and antitumor activities of different molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* 87 (2), 1206–1210.
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa), *Anaerobe* 47 137e144.
- Szajewska, H. and Kolodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Aliment Pharmacol Ther* 42:1149-1157. <https://doi.org/10.1111/apt.13404>.
- Tane, S. and Chibazakura, T. (2009). Cyclin a overexpression induces chromosomal double strand breaks in mammalian cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 8(23): 3900-3903. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10071>
- The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Latest Global Cancer Data, 2018. World Health Organization* (2018).
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tommpoulidou, E., Lamprianidou, E. et al. (2016). *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PLoS One* 11: e0147960. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147960>
- Thirabunyanon, M. Boonprasom, P. Niamsup, P. (2019). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett* (2009) 31:571–576 DOI 10.1007/s10529-008-9902-3
- Todryk, S., Melcher, A., Bottley, G., Gough, M., Vile, R. (2001). Cell death associated with genetic prodrug activation therapy of colorectal cancer. *Cancer Lett.* 174, 25–33.
- Tukenmez, U., Aslim, B., Aktas, B., Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*, www.nature.com/scientificreports 9:8268 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44753-8>
- Vidya, S. and Thiruneelakandan, G. (2015). Probiotic potentials of *Lactobacillus* and its anti-cancer activity. *Int J Curr Res*, 7:20680e4

- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 283–288.
- Wang, X., Huycke, M.M. (2015). Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects, *Gut Microbes* 6 (6) 370–376.
- Weis, S.M. and Cheresch, D.A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets, *Nat. Med.* 17 (11) 1359.
- Wollowski, I., Ji, S.T., Bakalnsky, A.T, Neudecker, C., Pool-Zobel, B.L. (1999). Bacteria used for the production of yoghurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr* 129:77-82.
- Xiao, R. and Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances* 34(2016)1225-1244.
- Yang, Z., Xu, J., Fu, Q., Fu, X., Shu, T., Bi, Y. and Song, B. (2013). Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydr Polym* 95: 615-620.
- Zahran, W., Elsonbaty, S., Moawed, F. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 exopolysaccharides synergizes with low level ionizing radiation to modulate signaling molecular targets in colorectal carcinogenesis in rats, *biomedicine & pharmacotherapy* 92 384-393.
- Zi, M., Liu, F., Wu, D., Li, K. et al. (2019). Discovery of 6-Arylurea-2 arylbenzoxazole and 6-Arylurea-2-arylbenzimidazole Derivatives as Angiogenesis Inhibitors: Design, Synthesis and in vitro Biological Evaluation. *ChemMedChem* 2019, 14, 1291 – 1302.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research, *Carbohydrate polymers* 90 1395-1410.
- Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashirades, S. et al. (2018). Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell* 174:1388-1405. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>