

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDEN ELDE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN (EPS) MEMELİ KÜLTÜR
HÜCRELERİNDE BİYOLOJİK AKTİVETİSİNİN
İNCELENMESİ**

Burcuğöl ALTUĞ
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Ağustos 2013

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1201F014

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burcugöl Altuğ'un “Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin (EPS) Memeli Kültür Hücrelerinde Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi” başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 25.07.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. AYŞE TANSU KOPARAL	
Üye :	Yard. Doç. Dr. EMEL ERGENE	
Üye :	Yard. Doç. Dr. FİGEN ÇALIŞKAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN (EPS) MEMELİ KÜLTÜR HÜCRELERİNDE BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Burcugül ALTUĞ

Anadolu Üniversitesi
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji

Danışman; Doç. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
Eş Danışman; Prof. Dr. Merih KIVANÇ
2013, 61sayfa

Laktik asit bakterileri (LAB) sağlığa yararlı mikroorganizmalardır. LAB'den elde edilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) anti-tümoral, antioksidan, bağışıklık sistemini destekleyici ve kolesterol düşürücü özellikleri bulunmaktadır.

Bu çalışmada süt ve süt ürünleri ile et ve et ürünlerinden izole edilen LAB'den elde edilen farklı EPS'ler insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) üzerine sitotoksik ve antikanser aktivitesinin belirlenmesi amacı ile uygulanmıştır. LAB'nin farklı suşlarından elde edilen EPS'lerin sitotoksik aktivitesi MTT testi ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ile belirlendikten sonra aralarından seçilen en etkin EPS'nin kolon kanseri için önemli bir gen olan MUC5AC gen ekspresyonu üzerindeki etkisi Real Time PCR ile incelenmiştir.

Sonuçlar, LAB'nden *Enterococcus faecium* D-36 suşundan izole edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu hücrelerdeki MUC5AC gen ekspresyonu seviyesinde azalma meydana getirdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar *Enterococcus faecium* D-36 suşunun Caco-2 hücreleri üzerinde anti-kanser etkisinin olduğunu, yapılacak daha ayrıntılı incelemeler doğrultusunda insan kolon kanserinin engellenmesi amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Laktik Asit Bakterileri (LAB), Ekzopolisakkarit (EPS), Caco-2, Antitümoral

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXOPOLYSACCHARIDE ISOLATED FROM LACTIC ACID BACTERIA, IN MAMMALIAN CELLS CULTURE

Burcugül ALTUĞ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Advanced Technologies Program
Biotechnology

Supervisor, Assoc. Prof. Ayşe Tansu KOPARAL

Co-Supervisor Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2013, 61 pages

Lactic Acid Bacterias (LAB) are microorganisms that are beneficial to health. Exopolysaccharide (EPS) obtained from LAB, have anti-tumoral, antioxidant, immunity system supporter and cholesterol lowering properties.

In this study, different EPS's obtained from LAB that is isolated from milk and milk products and meat and meat products, were applied for the determination of cytotoxic and anticancer activity on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). After the determination EPS', obtained from different strains of LAB, cytotoxic activity with MTT test ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), most effective EPS is selected from among and MUC5AC gene expression level that is important for colon cancer, is investigated by real time PCR method.

Our results showed that EPS, is obtained from LAB's *Enterococcus faecium* D-36 strain, has cytotoxic effect on Caco-2 cells and brought about MUC5AC gene expression level decreases in this cells. According to this results, *Enterococcus faecium* D-36 strain's has an anticancer effect on Caco-2 cells and after the further investigations, it could be useful for prevention of human colon cancer.

Key Words: Lactic Acid Bacterias (LAB), Exopolysaccharide (EPS), Caco-2, Antitumoral

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni her zaman destekleyen, motive eden, sevgisini esirgemeyen, hep anlayışla yol gösteren Danışman Hocam Doç. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a,

Çalışmam boyunca her zaman sevgisiyle ve anlayışıyla bana destek veren ve çalışmamda kullandığım test maddelerini temin eden ikinci Danışmanım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a,

Hem laboratuvar hem de teorik çalışmalarım sırasında bana bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan canım dostum R. Beklem BOSTANCIOĞLU'na,

Çalışmam boyunca her zaman destekleriyle bana yardım eden sevgili arkadaşlarıma,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım AİLEM'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burcugül ALTUĞ

Ağustos 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Polisakkaritler.....	3
1.2.Ekzopolisakkaritler (EPS).....	4
1.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS).....	4
1.2.2. Heteropolisakkaritler (HePS).....	5
1.3. Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları ve Amaçları.....	6
1.4. EPS ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	7
1.5. Kanser	9
1.5.1 Kolon kanseri	11
1.5.1.1 Kolonda tümör gelişimi.....	11
1.6.Caco-2 Hücre Hattı	12
1.7.Musin.....	13
1.7.1. Musin Gen Ailesi	15
1.8. Sitotoksisite	16
1.8.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Sitotoksisite	16
1.8.2. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT Testi	17
1.9. PCR	17
1.9.1 PCR Kullanım Alanları	18
1.10.Real Time PCR	19
1.10.1. Özgül Olmayan Belirleme Yöntemi	19
1.10.1.1. SYBR Green I Boyası	19
1.10.2. Özgül Belirleme Yöntemi	21
1.10.2.1. TaqMan® Prob Yöntemi	21
1.10.2.2. Moleküler Boncuk Yöntemi	22
1.10.2.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi	23

1.11. Çalışmada Kullanılan Genler	24
1.11.1. Hedef Gen: MUC5AC	24
1.11.2. Housekeeping Gen: 18S Rrna	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	25
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	25
2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	26
2.3. Kullanılan Aletler	26
2.4. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması	26
2.5. Caco-2 Hücre Kültürü	27
2.6. Test Maddelerinin Hazırlanması	27
2.6.1 <i>Lactobaccillus plantarum</i> 9 Test Maddesi.....	27
2.6.2. <i>Lactobaccillus plantarum</i> 157 Test Maddesi.....	27
2.6.3. <i>Enterococcus faecium</i> Test Maddesi.....	27
2.6.4. <i>Enterococcus faecium</i> D-36 Test Maddesi.....	27
2.6.5. Kefir Test Maddesi.....	28
2.6.6. <i>Lactobaccillus plantarum</i> 4L2 Test Maddesi.....	28
2.6.7. <i>Lactobaccillus reuteri</i> Test Maddesi.....	28
2.6.8. <i>Lactobaccillus plantarum</i> 13LA1 Test Maddesi.....	28
2.7. Yöntem	28
2.7.1. Hücre Kültürü	28
2.7.2. Hücrelerin Testler için Hazırlanması	28
2.7.2.1 <i>În vitro</i> Sitotoksisite Testi (MTT)	29
2.7.2.2. MTT Ölçümü	30
2.7.3. Real Time PCR	30
2.7.3.1. Hücrelerin RT PCR için Hazırlanması	30
2.7.3.2. RNA İzolasyonu	31
2.7.3.3. gDNA uzaklaştırılması	32
2.7.3.4. cDNA Sentezi	32
2.7.3.5. RT PCR Analiz	33

3. BULGULAR	35
3.1. Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen Ekzopolisakkaritlerin Caco-2 kanserli hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri	35
3.2. Laktik asit bakterilerinden izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS) Caco-2 kanserli hücre hattına uygulanması sonucu MUC5AC gen ekspresyonundaki değişimin real time PCR ile belirlenmesi	48
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanserin yayılmasının şematik gösterimi	10
Şekil 1.2. Kolon kanseri şematik gösterimi	11
Şekil 1.3. Caco-2 Hücre Hattı	12
Şekil 1.4. Goblet Hücrelerinin Görünümü	13
Şekil 1.5. Mukus tabakasının lümende şematik olarak görünümü	14
Şekil 1.6. Normal ve Kanserli hücre yüzeyinde musin değişikliklerinin şematik gösterimi....	14
Şekil 1.7. Farklı MUC Genlerinin çeşitli dokularda eksprese olduğu yerlerin şematik gösterimi	15
Şekil 1.8. Farklı formlarda sentezlenen MUC genlerinin şematik gösterimi	16
Şekil 1.9. SYBR Green I Yöntemi	20
Şekil 1.10. TaqMan® Probe Yöntemi	22
Şekil 1.11. Moleküler Boncuk Yöntemi	23
Şekil 1.12. Hibridizasyon Prob Yöntemi	24
Şekil 1.13. HT29, Caco-2, LS174T ve LoVo Kolon kanserli hücre hatlarının MUC2 ve MUC5AC mRNA seviyeleri	24
Şekil 2.1. Real Time PCR 1. Döngü	34
Şekil 3.1. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden (KOD 9) elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	35

Şekil 3.2. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden (KOD 157) elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	36
Şekil 3.3. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden (KOD 157) elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	37
Şekil 3.4. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 3.5. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	39
Şekil 3.6. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	40
Şekil 3.7. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	41
Şekil 3.8. Kefir'den elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	42
Şekil 3.9. Ağız florasından izole edilen Laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	43
Şekil 3.10. Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	44
Şekil 3.11. Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	45
Şekil 3.12. Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	46

Şekil 3.13. Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	47
Şekil 3.14. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin (d-36 izolatu) Caco-2 hücrelerinde yüksek düzeyde Eksprese edilen MUC5AC geninin ekspresyonuna etkisi real time PCR ile değerlendirilmesi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri.....	2
Çizelge 2.1. gDNA uzaklaştırma miks miktarı	32
Çizelge 2.2 cDNA sentez miks miktarı	32
Çizelge 2.3. Real Time PCR miks miktarı	33

1.GİRİŞ

Günümüzde insanlar, yoğun iş temposu nedeniyle yanlış beslenme alışkanlıkları edinmektedir (Örneğin, hazır yiyecekleri tüketmek gibi). Protein ve karbonhidrattan zengin lifden fakir yiyeceklerin tüketilmesi, sonucunda çeşitli sindirim problemleri ya da bu sindirim problemlerine bağlı sindirim sistemi hastalıkları ve kanser özellikle kolon kanseri gibi hastalıklara yakalanmaktadırlar (McIntosh ve Ark. 2001). Bu problemlerin sıklığı da insanları bu sorunları doğal yollarla aşmak için çareler aramaya itmektedir. Bunlardan birisi de probiyotik içeren besinlerdir (Rafter 2003).

Probiyotik mikroorganizmalar sağlığa yararlı mikroorganizmalardır. Özellikle intestinal sistemde yapılan araştırmalarda probiyotiklere odaklanılmıştır. Probiyotiklerle yapılan anti-kanser çalışmalarının büyük çoğunluğu, çeşitli kanser türleri ile özellikle de kolon kanseri ile ilişkilendirilmektedir (Rafter 2003). Probiyotiklerin bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde probiyotiklere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar arasında yağın olarak bilineni ve kullanılanı Laktik asit bakterileridir (LAB).

20.yüzyılda LAB terimi ortaya çıktığında ilk olarak heterojen bakteri grubu olarak tanımlanmıştır. Günümüzdeki tanımı ise kok (cocci), çubuk şekilli (bacilli), gram pozitif, katalaz-negatif, hareketsiz, sporlanmayan, anaerobik, aerotolerant ve laktik asit üreticisi olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri genellikle süt ve süt ürünlerinde bulunmasına rağmen çeşitli yiyeceklerde de (hayvansal et ve bitkiler) bulunabilirler. LAB'lar yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar ve fonksiyonel ekzopolisakkarilerin (EPS) üreticisi olarak sınıflandırılırlar (Welman ve Ark. 2003, Meulen ve Ark. 2007). Süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ve bitkilerden izole edilen LAB'lardan EPS elde edilebilmektedir (Meulen ve Ark. 2007). LAB'lar aynı zamanda şarap yapımında da kullanılmaktadırlar (Munoz ve Ark 2011). Bunun yanı sıra LAB'lar hem insan hem de hayvanlarda probiyotik etkileri olan yararlı mikroorganizmalardır (Çizelge 1.1.) (Choi ve Ark. 2005).

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri
(Tok ve Ark. 2007)

Probiyotiklerin Sağlık Açısından Faydalı Oldukları Alanlar	Öne Sürülen Mekanizmalar
Laktoz intoleransının hafifletilmesi	Bakteriyel galaktosidazın laktoz üzerine etki etmesi
Barsak florası üzerine olumlu etki	-Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla aşırı gelişmiş floranın aktivitesinin etkilenmesi -Antibakteriyal özellikler
İntestinal sistem infeksiyonlarının engellenmesi	-Sistemik ve salgısal immün cevap stimülasyonu -Barsak koşullarının patojenlerinin yaşamasına imkan vermeyecek şekilde değiştirilmesi (pH, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosinler) -Agregasyon, koagregasyon yetenekleri -İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi -Besinler için rekabet
İmmün sistem güçlendirilmesi	-Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitesinin artırılması -IgA aktivitesinin artırılması -İntra-epitel lenfositlerin çoğaltılması
İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması	-Bağışıklık sisteminin dengesinin yeniden düzenlenmesi -Sitokin sentezinin düzenlenmesi
Kolon kanseri riskinin azaltılması	-Mutajen bağlama -Karsinojenlerin inaktif hale getirilmesi
Ürogenital infeksiyonlar	-Üriner ve vajinal kanal hücrelerine yapışma -İnhibitör maddelerin üretimi (H ₂ O ₂ gibi)
<i>Helicobacter pylori</i> infeksiyonu	-Laktik asit üretimi - <i>H.pylori</i> 'nin üreaz aktivitesinin azaltılması
Kan lipidlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması	-Kolesterol asimilasyonu -Safra tuzu hidrolaz enzim aktivitesi

Probiyotik mikroorganizmaların, çoğalmaları sırasında sekonder metabolit olarak ortama saldıkları polisakkarit yapıda, yüksek moleküler ağırlıklı polimer olan ekzopolisakkaritler, gıda endüstrisinde kıvam artırıcı tıp alanında pıhtı azaltıcı olarak kullanılmaktadır. EPS'lerin tümör oluşumunu engelleyici, bağışıklık sistemini destekleyici, makrofaj ve lenfosit aktive edici, kan kolesterolünü düşürücü özellikleri de bulunmaktadır (Karaca ve Ark. 2010, Lin ve Chien 2007). LAB'ların anti-kanser özelliklerinin olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Rafter 2002). LAB suşları gastrik, bağırsak patojenleri ve diğer mikroplara karşı mikrobisidal maddeler üretir ya da hücre yüzeyi ve musin (mucin) bağlayıcı bölgelere bağlanmak için rekabet ederler (Ljungh ve Ark. 2006). Özellikle kanserli hücrelerde musinin, eksprese oldukları yer ve ekspresyon seviyelerinde ve musin glikoproteininin glikolizasyonunda değişiklik meydana geldiği bilinmektedir. Bu değişiklikler sonucunda bazı kanserli hücrelerde invazyon yetenekleri gelişmektedir. Örneğin; kolon kanserli hücrelerde değişen musin ekspresyonları ve glikolizasyon değişiklikleri sonucunda hücrelerin

invazyon kabiliyetleri gelişmekte ve hücreler metastaz yapabilme yeteneği kazanmaktadırlar (Varki ve Ark. 2009).

Bu tez kapsamında LAB'lerden izole edilen EPS'lerin insan kolon kanserli hücre hattı olan Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve uygulama sonucunda musin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır.

1.1.Polisakkaritler

Polisakkaritler, doğada yaygınca bulunan biyopolimerlerdir. Hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilmektedirler. Bunlar, enerji deposu olarak kullanılmakta ve hücreler arası iletişim gibi biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Bu makropolimerler bazen bir kaç milyon Dalton ağırlığına ulaşabilir. Bütün bu polisakkaritler, doğal şekerin homopolimerleri ve heteropolimerleri olabilirler. Bunlar şeker olmayan bileşikler ve doğrusal ya da kollara ayrılmış biçimlerde olabilirler. Bu özellikler, spiral, düzgün, tekil, çiftli ve üçlü şekillerde, aralarında uyum sağlayacak şekilde sonuç gösterirler (Badel ve Ark. 2011). Bakterilerde hücre duvarının dışına salgılanan polisakkaritlere Ekzopolisakkaritler ya da kısaca "EPS" adı verilir. Ökaryotlar ve prokaryotlar tarafından üretilen EPS'lerin kompozisyonlarındaki farklılık pentoz şekerlerinin varlığıdır. Ökaryotik polisakkaritler D-riboz veya D-ksiloz gibi pentozları içerebilirler, fakat prokaryotlar tarafından üretilen ekstraselüler polisakkaritlerde bu pentozların oluşumu yaygın değildir

Mikrobiyal polisakkaritler, akışkan özelliğe sahiptirler. Mikrobiyal polisakkaritler genel olarak çoğunlukla monosakkaritlerden; D-glikoz, D-galaktoz, D-mannoz, L-fruktoz ve L-ramnoz ve genellikle, N-asetil hekzozamin, N-asetil-D-glikozamin ve N-asetil-D-galaktoz içermektedir. Bu polisakkaritler, diğer bileşenler ile beraber hücre duvarında (LPS), kapsül halinde hücrelere bağlanmış (CPS) veya hücre dışına salgılanmış (EPS) halde bulunurlar. Mikrobiyal polisakkaritlerde bunların dışında birçok şeker bulunduğu yapılan yeni çalışmalarla belirlenmektedir (Demir 2007).

1.2.Ekzopolisakkaritler (EPS)

EPS'ler dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalardan EPS elde edilmektedir ve büyük çoğunluğu laktik asit bakterileri grubundan elde edilir. Farklı LAB'lardan üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları, proteinlerle ilişkileri de birbirinden farklıdır (Badel ve Ark. 2011, Welman ve Ark. 2003). Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki gruba sınıflandırılmaktadırlar. Homopolisakkaritler bir tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içermekte olup glukanlar ve fruktanlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* gibi bazı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit içermekte ve *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler (Karaca ve Ark 2010).

1.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS)

HoPS tek tip monosakkaritlerden (D-glukopiranoz ve D-fruktofuranoz) oluşmaktadır. HoPS'e selüloz, dekstran, pullulan, levan ve kurdan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir. HoPS ya tek tip bağlantı (örn. 1-2 veya 1-4) ile veya sınırlı sayıda bağlantı (örn. 1-2 veya 1-4) kombinasyonları ile oluşturulmaktadır. Çoğu LAB türü özel şeker olarak sakkarozdan yararlanarak dekstran, levan ve mutan üretmektedir.

Genellikle HoPS moleküler ağırlıkları 4×10^4 ile 6×10^6 Da aralığındadır. Sadece *Lactobacillus* suşları tarafından salgılanan monosakkarit olarak glukoz ve fruktoz içeren HoPS, sırasıyla, glukanlar ve fruktanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu 2 alt aile spesifik bağlanma tipleri, moleküler ağırlık, uzunluk ve kimyasal yapısına göre çok çeşitli polisakkaritler içermektedir (Badel 2011).

Alfa-glukanlar α -1,6 ve α -1,3 bağlı glikozidik birimlerinden oluşmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Leuconostoc mesenteroides*

dextranicum tarafından üretilen dekstranlar, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* tarafından üretilen mutanlar bu gruba dahildir (Mıdık 2011).

Fruktanlar ise β -2,6 bağlı fruktoz moleküllerinden oluşmaktadır. *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen levan bu grupta yer almaktadır.

1.2.2. Heteropolisakkaritler (HePS)

HePS tekrar eden alt birimleri temelde, dallanmış (C2, C3, C4 veya C6 pozisyonlarından) veya dallanmamış, üç ila sekiz monosakkarit ve monosakkarit türevlerinden meydana gelmektedir. Homopolisakkaritler ile kıyaslandığında LAB heteropolisakkaritleri çok daha az miktarlarda (60 ile 400 mg L-1) üretilmektedir. HePS'e gellan ve ksantan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir. Heteropolisakkaritler bir oligosakkaritin çok sayıda kopyasından oluşmaktadır. Oligosakkaritler, üç ile yedi birimden oluşmakta olup iki veya daha fazla farklı monosakkarit çeşitlerine sahiptir ve çoğunlukla farklı bağlanma modelleri göstermektedir (Yang 2005).

Mikrobiyal ekstraselüler heteropolisakkaritler, düzenli aralıklarla uzunluk ve kompleksliği çeşitli olan ve yan zincirlerle bağlanmış, esasen doğrusal moleküllerdir. Mikrobiyal ekzopolisakkarit yapılarının yakından incelenmesi, yapıdaki minor (veya major) değişikliklerin bu makromoleküllerin fiziksel özelliklerine etkisini belirlenmesinde önemlidir. Bu değişiklikler polisakkaritlerin enzimlere duyarlılık, lektinler ve antikorlarla etkileşimler ve iyonlara bağlanma özelliği ve kapasitesi gibi bazı biyolojik özelliklerinde de görülmüştür. Asetil grupları çoğu kez mikrobiyal polisakkaritlerin özellikleri üzerinde oldukça belirli etkiler ortaya koymaktadır. Her bir oligosakkaritin tekrar eden ünitesinde O-asetil ve pruvat (ketal) gruplarının varlığı veya eksikliği çok sayıda polisakkaritin özelliklerini geniş ölçüde değiştirebilmektedir (Mıdık 2011).

LAB heteropolisakkaritleri, mezofilik *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; termofilik *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterileri tarafından üretilmektedir (Mıdık 2011).

1.3. Ekzopolisakkaritlerin (EPS) Kullanım Alanları ve Amaçları

Ekstraselüler polisakkarit ya da EPS ekonomik olarak çok önemlidir. Çünkü; EPS'nin yiyecekler üzerinde fonksiyonel ve sağlığa yararlı etkileri vardır (Welman ve Ark. 2003). Xu ve Arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada *Bifidobacterium animalis RH*'dan izole edilen EPS'lerin antioksidan özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bakteriyel ekzopolisakkaritler, bakteriyel yüzeyi saklamak diğer bakteriyel yüzeyler veya alt tabaka ile yapışkan bir şekilde ilişkilendirilmek, çevreye karşı koruyucu ajanlar, rizosfer topluluklarda bakteriyel kümeleşme için madde, biyofilmden yapısal stabilizer ve molekülleri uyaran gibi çeşitli görevlerde bulunabilirler. Buna rağmen, fizyolojik özellikleri hala tam olarak bilinmemekle birlikte, sadece birkaçı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmektedir (Badel ve Ark 2011).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler bakteri ve funguslardan üretilirler. Son zamanlarda biyoteknolojistler tarafından dikkat çekmektedir. Çünkü çoğu alanda özellikle tıp alanında uygulamaları mevcuttur. Son zamanlarda EPS'lerin beklenmedik etkileri olduğunu bulunmuştur. Örneğin; EPS'lerin *in vitro* koşullarda insulinoaktif aktivitesinin olduğu yani; insulin üretimi ve insulinoma hücrelerinin diabetik ajanlardan koruduğu keşfedilmiştir (Ruiz ve Ark 2011).

Alteromonas infernus'dan salınan modifiye EPS'nin zayıf antikoagulant etki fakat güçlü anjiyojenik etkisinin olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmada araştırmacılar, sülfatlanmış EPS'nin anti-tümöral etkisinin olduğunu ve sülfatlanmış EPS üretiminin Halofilik bakteri olan *Halomonas stenophila* B100 straininden üretildiğini keşfetmişler (Ruiz ve Ark. 2011).

Bakterilerin yaşadıkları ortama göre kendilerini adepte edebildikleri ve ortam şartlarına göre enzim, polisakkarit gibi yapılarını modifiye edebildikleri bilinmektedir. Ruiz ve Arkadaşları (2011), ekstrem koşullarda yaşayan Halofilik bakterilerin salgıladığı sülfatlanmış EPS tümör ve bazı virüslerin büyümesini inhibe edebildiğini yaptıkları çalışma ile kanıtlamışlardır ve gelecekte halofilik

bakterilerden elde edilen EPS'lerin teröpatik ajan olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

EPS aynı zamanda süt ürünlerinin raf ömrünü arttıran bir bileşiktir. EPS üretimi biyosentetik yolun sonucu olup enerji üreten bir yol değildir. Glikoliz reaksiyonları ile yakından ilişkilidir. Katabolik ve anabolik yolun ayrılmasında önemli rol oynayan fosfoglukomutaz (PGM) enzimi Glikoz 6P'ın glikoz-1P'a dönüşümünü katalizlemektedir (Karaca ve Ark. 2010).

EPS; biyokimya ve tıp alanında, antioksidan ve immun sistem düzenleyici özelliğinden dolayı oldukça dikkat çekmektedir. Polisakkaritler kanser hücrelerini apoptoza yönlendirirken sağlıklı hücelere toksik etkisi azdır (Haung ve Ark. 2012).

Biofilmler gıda hijyeni açısından oldukça önemlidir. Biofilmlerin özel bir öneme sahip olmalarının nedeni, uygun şartlar altında mikroorganizmaların gıda ve gıda temas yüzeyleri üzerinde tutunabilme ve gelişebilme kabiliyetlerindendir (Zottola ve Sasahara 1994). Yapılan çalışmalar ile çeşitli mikroorganizmaların ürettikleri ekzopolisakkaritlerin biofilm oluşturabildiği bilinmektedir (Kim ve Ark. 2009, Costerton ve Ark. 1995).

1.4. EPS ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Alp ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada anne sütü ve infant feçesden izole edilen *Bifidobacterium* türlerinin ürettiği ekzopolisakkaritlerin (EPS) safra tuzu ve düşük pH'a olan direnci ve aralarındaki ilişki incelenmiştir. *Bifidobacterium spp.*'nin EPS üretimi tespit edilmiştir. EPS üretimi (38.00–97.64 mg/l) oranında değişiklik göstermektedir ve *Bifidobacterium sp.*'nin safra tuzu ve düşük pH'a direnci tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda *Bifidobacterium*'un yüksek EPS üretimi safra tuzu ve düşük pH'a direncinin, probiyotik ırk seçiminde önemli olabileceği gösterilmiştir.

Paolillo ve Arkadaşlarının (2009) yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus plantarum* intestinal epitelyum hücrelerine olan etkisini araştırılmıştır. Bu çalışmada Caco-2 hücreleri *L.plantarum* ile muamele edildiklerinde önemli

derecede Human β -defensin (HBD-2) mRNA ekspresyonu ve HBD-2 sekresyonunu zamana bağılı olarak indüklediği ve ek olarak 48 saat içinde hücrelere lipopolisakkarit (LPS) ilave edildiğinde, interlökin (IL-23) sekresyonu ve IL-23 mRNA ekspresyonu artarken, LPS *L.plantarum* ile birlikte kültür edildiğinde bu değerlerin düştüğü gözlemlenmiştir. *L.plantarum* HBD-2 ekspresyonunun artışı indüklerken anti Toll Like Reseptör (anti-TLR-2) neutralizing antikorlar tarafından inhibe edilmektedir. Aynı şekilde, tedavi öncesinde anti-TLR-2 antikorlarla birlikte Caco-2 hücrelerinde LPS tarafından indüklenen IL-23'ün üretiminin de inhibe edildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda *L. plantarum*'un bağırsakta enfeksiyonun kontrol edilmesinde bir role sahip olduğu ve ayrıca TL-2'nin (TLR-2 doğuştan gelen bağışıklık sensörü) indüksiyonu yoluyla sistemik bağışıklığın aktivasyonunda önemli olabileceği gösterilmiştir.

Cordyceps sinensis (Cs) geleneksel Çin Tıp'ın da çoğu hastalığın tedavisi için kullanılmaktadır. Doğal ilaç olarak kabul edilmektedir. *C.sinensis*'den elde edilen EPS'nin c-Myc, c-Fos ve VEGF ekspresyonuna etkisi B16 melanoma hücreleri aktarılan farelerde (C57BL/6) denenmiştir. Farelere EPS ile tedavi yapılmıştır, EPS farklı doz ve günlerde uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda doz uygulanmış farelerin c-Myc, c-Fos, VEGF seviyesinin doz uygulanmayan fare grubundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Veriler fungusdan elde edilen EPS fragmentlerinin tümör büyümesini baskılayıcı özellikte olduğunu göstermektedir. Kanser terapilerinde potansiyel adjuvant olabileceği düşünülmektedir (Yang ve Ark. 2005).

Lactobacillus acidophilus 606 bakterisinden elde edilen hücre bağılı ekzopolisakkaritin (cb-EPS) kolon kanserli hücrelerde anti-tümör etkileri ve bu yolakda rol alan kritik proteinler araştırılmıştır. Cb-EPS'nin HT-29 kolon kanserli hücre hattının çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır. Protein analizi için iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmış ve MALDI-TOF/MS cihazı ve immunoblot teknik ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda, cb-EPS'nin, Beclin-1 ve GRP78 proteinlerini indüklediği ve Bcl-2 ve Bak regülasyonuna etkisi olduğu keşfedilmiştir. Çalışmanın sonuçlarından cb-EPS'nin antitümörojenik

etkisinin olduğu ve bu etkiyi otofajik hücre ölümlerini tetikleyen Beclin-1 ve GRP78 proteinlerini indükleyerek, bunun sonucunda dolaylı olarak Bcl-2 ve Bak proteinlerinin regülasyonunu etkilediğini göstermiştir. Bu çalışma sonuçları, probiyotik bakterilerin tümör hücrelerini otofaji yolu ile ölüme götürmesi mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Kim ve Ark 2010).

Rhizobium türlerinden elde edilen ekzopolisakkaritin (REPS) sarkoma, hepatoma ve karsinoma tümörleri üzerinde tümör oluşumunu azaltıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (Zhao ve Ark. 2010).

Yine yapılan çalışmalar sonucunda alternatif karbon kaynakları tarafından üretilen EPS'lerin, kanser hücreleri üzerinde çoğalmasını engelleyici özellikte olduğu gösterilmiştir (Sugitani Chimilovski ve Ark. 2011).

1.5. Kanser

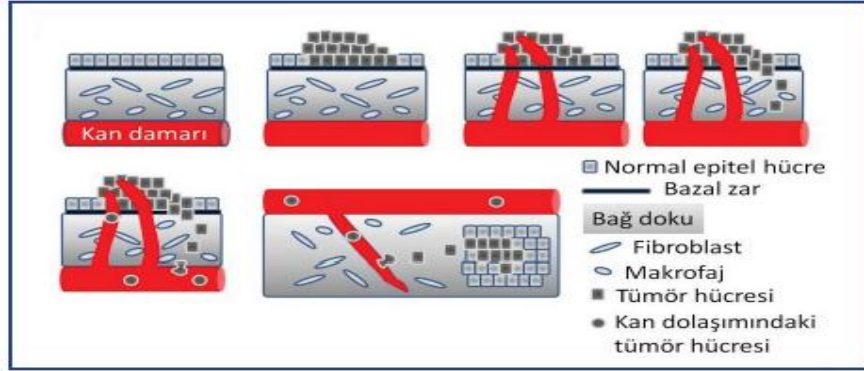
Kanser son yıllarda yapılan araştırmalarda ölüm nedenleri arasında, üçüncü sırada yer almaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda batılı ülkelerde kanserin en önemli ölüm nedenlerinden biri olduğu rapor edilmiştir (Liu ve Ark. 2011).

Kanser, çeşitli genetik mutasyonlar sonucu hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile başlar. Birçok veya tüm kanser olgularına neden olan hücresel düzenlemenin kaybı genellikle tümör oluşturunca kimyasallar, hormonlar ve bazen virüslerin etkisiyle birlikte gelişen genetik bozulmaların sonucudur.

Apoptoz programlı hücre ölümüdür. Birçok sinyal patikası apoptoza gidişte rol oynar. Bu patikalar kesişip, birbirinin etkisini artırabilirler. Bunların başlıcaları; TNF-TNFR-Nfkb, Fadd-Fadd-Procaspace, Granzyme-B-Procaspace yollarıdır. Bu sinyal patikaları iki yere ulaşır. Hücre çekirdeğine ulaştığı anda DNA parçalanmaya başlar. Mitokondrilere ulaştığında ise sitoplazma proteinleri ve bağlı oldukları membran bölümleri parçalanır (Lodish ve Ark 2011).

Kanserin ölümcül olmasının en büyük nedenlerinden biri metastaz (yayılma) yapabilme kabiliyeti kazanmasıdır. Kanser belli bir büyüklüğe geldikten sonra besin ve oksijen ihtiyacını karşılayamaz hale gelir ve damarlanma

oluşturmaya başlar (angiojenez). Damara yaklaşan kanserli hücreler damar içine girerler ve tek tek veya toplu halde tüm vücuda yayılabilirler (Şekil 1.1.) (Okvur 2011).



Şekil 1.1. Kanser yayılımının şematik gösterimi (Okvur 2011)

Birçok tümör anjiyojenezi uyarıcı büyüme faktörleri üretir. Diğer tümörler ise etraflarını çevreleyen diğer normal hücelere benzer faktörleri sentezletir ve salgılatır. Pek çok tümör tarafından salgılanan bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF α) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörler anjiyojenik özelliktedir (Lodish ve Ark. 2011).

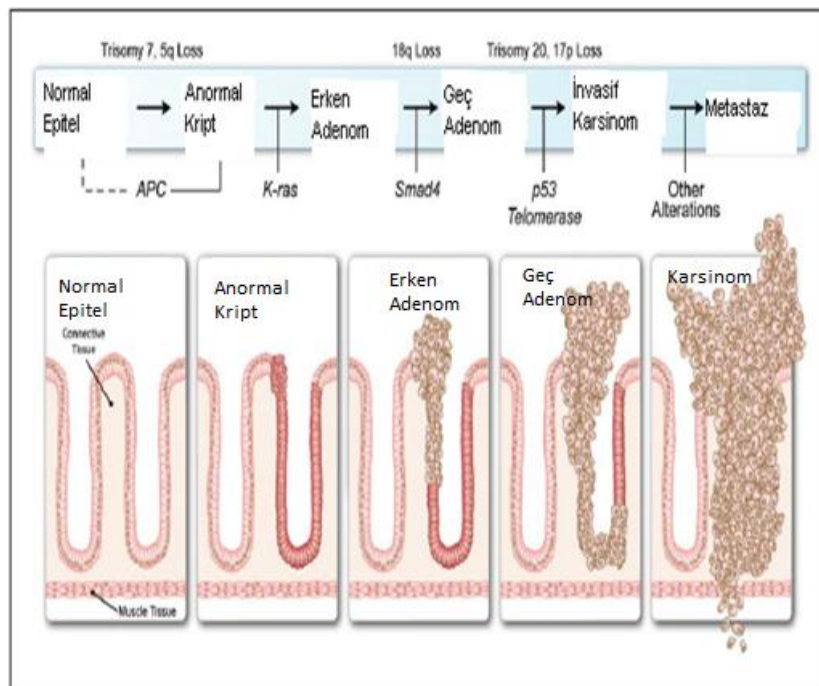
Kanser Hücrelerinin Özellikleri

- ✓ Hücre siklusunda bulunan G₀ evresine geçemezler.
- ✓ Apoptozdan kaçarlar.
- ✓ Kontak inhibisyon mekanizması kaybı ile yığılma yaparlar. Hücreler üst üste çoğalmaya başlar. Çok katlı bir kitle oluşumu gözlemlenir. Doku istilası durumu söz konusudur.
- ✓ Anjiyojeneze neden olurlar.
- ✓ Metastaz yapabilme özelliği kazanırlar.
- ✓ Kendi büyüme sinyallerini oluştururlar.
- ✓ Anti büyüme sinyallerine duyarsızdırlar.
- ✓ Sınırsız bölünme özelliği kazanırlar (Lodish 2011).

1.5.1. Kolon kanseri

Batılı ülkelerde kanserden ölüm nedenleri arasında kolon kanseri üçüncü sırada yer almaktadır. Kolon kanseri gastrointestinal sistemin en çok rastlanan tümörleridir. Erkeklerde akciğer kadınlarda ise meme kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür. Ailesinde kolon kanseri olanların birinci derece akrabalarında kolon kanseri olma riski yüksektir. Gelişmiş ülkelerde daha sık, az gelişmiş ülkelerde ise daha az sıklıkta rastlanmaktadır. Hayvansal gıdalardan, karbonhidrat ve yağdan zengin, lifden fakir gıda tüketimi kolon kanseri riskini arttırmaktadır.

Kolon kanserli hastalarda ölümlerin kolon kanseri sonucu değil, bu kanser türünün invazif hücre özelliği kazanıp metastaz kabiliyetinin gelişmesi sonucu ölüm oranını arttırdığı bilinmektedir (Lacy ve Ark. 2002) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Kolon kanseri şematik gösterimi (Roig ve Ark 2009'dan değiştirilerek).

1.5.1.1 Kolonda tümör gelişimi

Kolondaki tümör gelişiminde birden fazla sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikiminin görüldüğü iki farklı yol vardır. Bu mutasyonlar, gerçekleştikleri genler ve birikim mekanizmaları itibarıyla farklılık gösterirler.

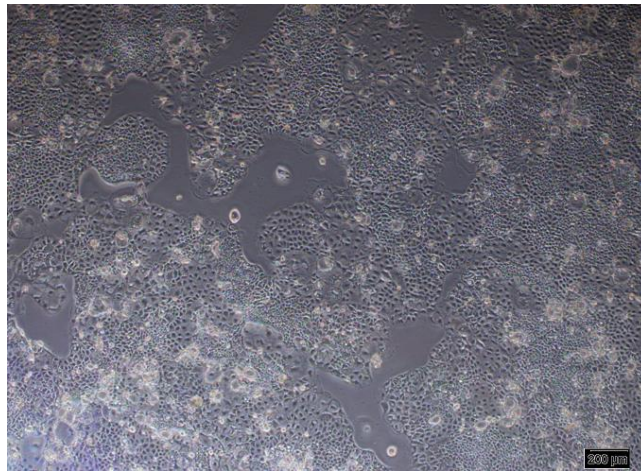
Adenom-karsinom süreci olarak da adlandırılan ve sporadik kolon karsinomlarının yaklaşık %80'inde görülen APC/B-katenin yolu; kromozomal dengesizlik ile karakterize moleküler olayların yanı sıra morfolojik olarak da tanımlanabilen aşamalarla gerçekleşir. Lokalize bir epitel proliferasyonu ile başlayan süreç, artan displazi derecesinin eşlik ettiği küçük adenomların oluşumunun ardından bunların progresif olarak genişlemesiyle devam eder ve sonunda invazif kansere dönüşür (Frattini ve Ark. 2004).

DNA tamir genlerinin inaktivasyonu ile ilişkili olan ikinci yol ise sporadik (aniden gelişen) vakaların %10-15'inde saptanmıştır. Bu yolda mutasyonlar farklı genlerde gerçekleşir. Tanımlanmış morfolojik değişimler yoktur (Frattini ve Ark 2004, Kumar 2000)

1.6. Caco-2 Hücre Hattı

İnsan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsünde geliştirilmiştir. Caco-2 intestinal sisteme benzerliğinden dolayı ilaç endüstrisinde permabilite testleri için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Morfolojik olarak, Caco-2 hücreleri büyük çoğunlukla vakuollerinde düşük elektron yoğunluğunda mukus depoladığı, çoğu hücre yüzeyinde mikrovillilere sahip ve hücreler arasında boşluk olmadığı bilinmektedir (Şekil 1.3.) ve LS147T hücre hattı da bu özelliklerle uyumlu morfolojiye sahiptir. Caco-2 ve LS147T hücreleri kolon kanserli hücrelerde mucin ekspresyonu çalışmaları için en iyi *in vitro* modellerdir (Bu ve Ark. 2011).



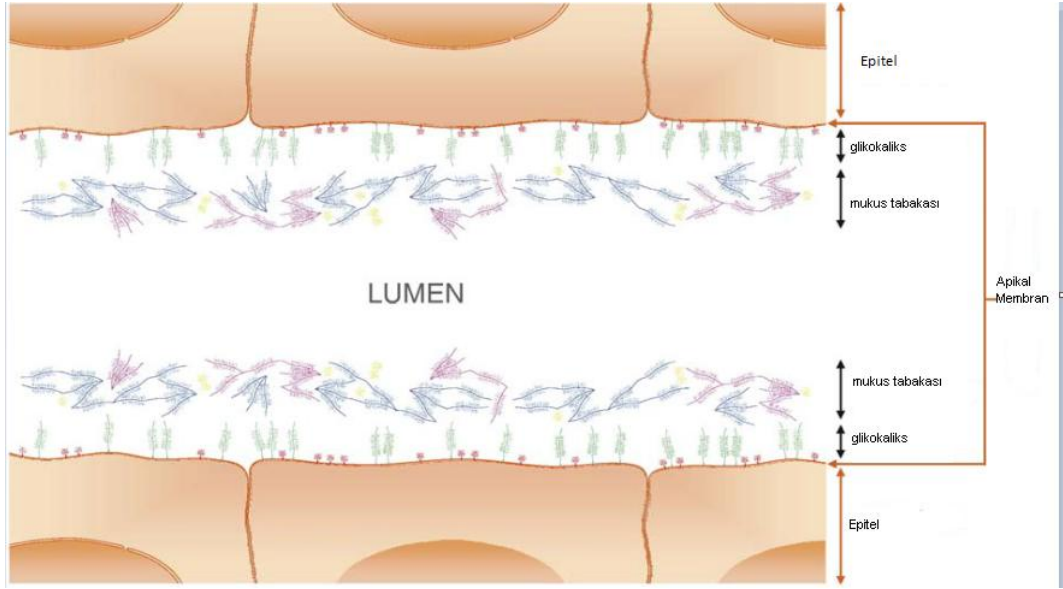
Şekil 1.3. Caco-2 Hücre Hattı

1.7. Musin

Musin (mucin) bazı organlarda epitel hücreleri arasında yer alan, biçiminden dolayı kadeh hücresi olarak da adlandırılan goblet hücreleri tarafından salgılanırlar. Bu salgılanan madde glikoprotein yapıdadır (Şekil 1.4.)Heterojen O-glikoprotein ailesindendir, yüksek moleküler ağırlığa sahiptir ve ağırlığının %80'ininden fazlası oligosakkarit zincirden oluşmaktadır. Bu zincirlerin kompozisyonu ve uzunluğu sülfat, sialat ve nötr içeriğine göre değişmektedir (Vandenhoute ve Ark 1991). Musinin dehidrasyonu ile oluşan kaygan sıvıya mukus denir. Mukus, dokuların kimyasal ya da fiziksel bakımdan zarar görmesini engeller. Musin (mucin) proteinin aşırı ekspresyonu çoğu kanser tipi ve akciğer hastalığıyla ilişkilendirilmektedir (Jonckheere ve Ark. 2010). Musin (mucin)'nin mukus formu, gastrointestinal sisteminde ve solunum sisteminde yer alır ve görevi besin maddelerinin örtü epiteli yüzeyine zarar vermeden kaydırılması ve bulundukları organı nemli tutmasıdır (Şekil 1.5.) (Akay, 2010).

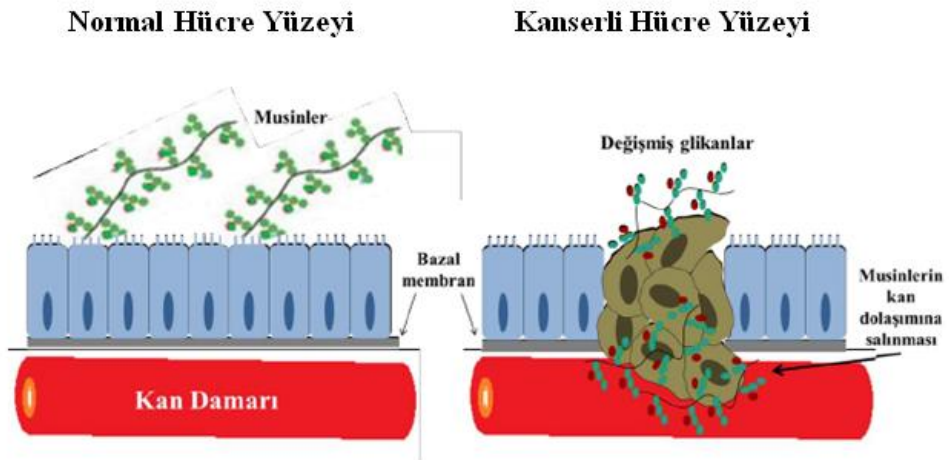


Şekil 1.4. Goblet Hücrelerinin Görünümü



Şekil 1.5. Mukus tabakasının lümende şematik olarak görünümü (Andrianifahanana ve Ark. 2006'dan değiştirilerek)

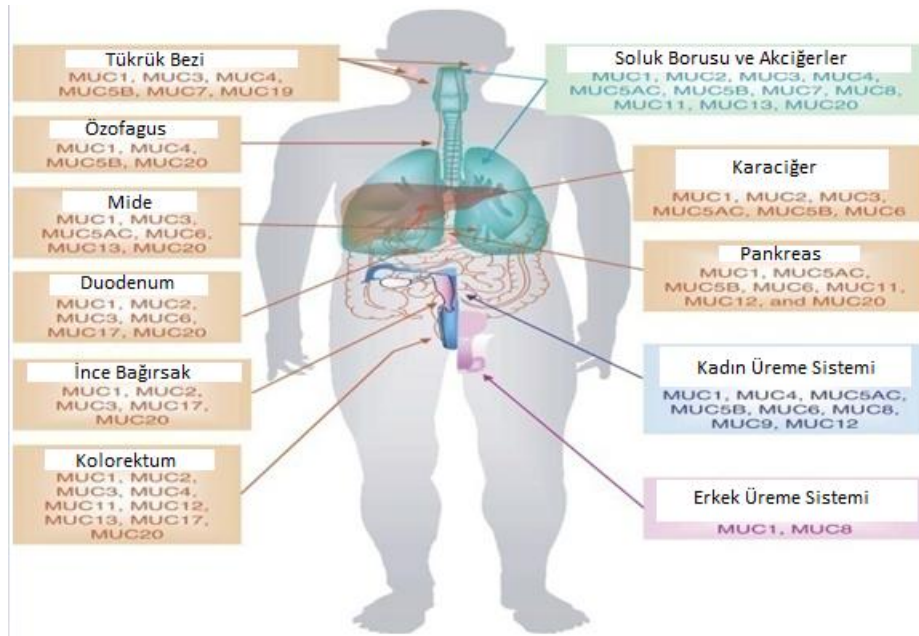
Hücre zarlarına bağlı veya salgılanmış musinleri oluşturan glikoproteinlerde serin ve treonin O-glikozilasyon yerleri çok bol bulunur. O-bağlı glikanlar, organizmanın kanal sistemlerinin içini döşeyen kutuplanmış epitel hücrelerinin özellikle lümene bakan tarafında şekillenen, MUC1 familyası musinlerinde yer alırlar. Epitel hücrelerde meydana gelen tümörlerde (karsinoma) O-glikanlar bol miktarda kutuplanmalarını kaybeden hücrelerin her tarafında bulunarak hücrelerin normal organizasyonunun kaybolmasına neden olur (şekil 1.6.) (Karacalı ve Ark. 2011).



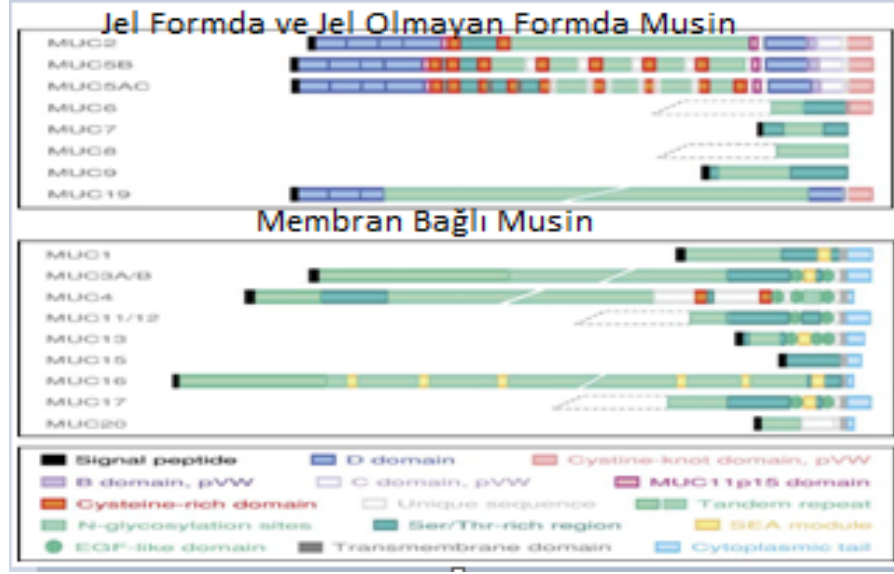
Şekil 1.6. Normal ve Kanserli hücre yüzeyinde musin değişikliklerinin şematik gösterimi (Karacalı ve Ark. 2011)

1.7.1. Musin Gen Ailesi

Yirmi adet insan musin geni bugüne kadar MUC gen ailesi ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19 MUC20 ve MUC21’dir(Şekil 1.7.) Bu yirmi adet genin çeşitli dokularda ekspresyonu gerçekleşmektedir. Musin, jel formunda, jel olmayan formda, membran bağlı formda üç farklı formda sentezlenir (Şekil 1.8.) (Andrianifahanana 2006 ve Ark.)



Şekil 1.7. Farklı MUC Genlerinin çeşitli dokularda eksprese olduğu yerlerin şematik gösterimi(Andrianifahanana ve Ark. 2006’dan değiştirilerek)



Şekil 1.8. Farklı formlarda sentezlenen MUC genlerinin şematik gösterimi(Andrianifahanana ve Ark. 2006'dan değiştirilerek)

1.8. Sitotoksosite

Hücre kültürü tekniği kullanılarak uygulanan yöntemler ilaç ve kozmetik araştırma geliştirme çalışmalarında hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle sağlık endüstrisi tarafından geliştirilen yeni etken madde adaylarının biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. *In vitro* sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre poliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad, 2000). Sitotoksosite deneyleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell 2006; Fent 2001).

1.8.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Sitotoksosite

Günümüzde herhangi bir maddenin organ ve dokular üzerine kanserojen, mutajen, teratojen olma olasılığını araştırmak ve anti-kanser ilaç etkinliğini belirlemek için hayvan testlerine tercih edilen hücre kültürü testlerinden elde edilen sonuçların daha gerçekçi ve spesifik olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Davila, 1998). Toksisite testleri zaman alıcı, pahalı ve çok sayıda hayvanın kullanılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, *in vitro* yöntemler,

deneyler için gerekli hayvan sayısını azaltabilen ve bunun sonucunda giderleri azaltan bir metot olarak tercih edilmektedir. Yeni anti-kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı en çok kullanılan metot sitotoksite testleridir. *In vitro* sitotoksite testleri hızlı ve rasyonel methodlardır.

1.8.2. Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı MTT Testi

MTT yöntemi hücre çoğalmasının ve mitokondrial fonksiyonun bir belirteci olarak kullanılır (Mosmann, 1983). MTT yöntemi direk ve hızlı bir şekilde başlıca mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların (süksinat dehidrogenaz) aktivitesini ölçer (Wu, 1999). MTT testi, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir. Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak tetrazolium tuzunun formazon ürününe çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır.

1.9.PCR

PCR (Polymerase chain reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir

PCR, bir çeşit "*in vitro* klonlama"dır. PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu

siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. (Sırasıyla 94°C-98°C; 37°C-65°C; 72°C) (Orum 2000). Denatürasyon optimum sıcaklığı 95 C°'dir. Çift iplikli DNA'nın açılabilmesi için uygun sıcaklık derecesi budur. Bağlanma sıcaklığı 55-60 C° optimum sıcaklık kabul edilir çünkü açılan çift iplikli DNA'ya primerlerin bağlanabileceği sıcaklıktır (primerin boyuna göre bu sıcaklık aralığı değişebilmektedir). Uzama sırasında sıcaklık 72 C° olmalıdır. Çünkü, DNA sentezi sırasında kullanılan Taq polimeraz enzimi optimum çalışma sıcaklığı 72 C°'dir (Eckert 1991). Bu teknikle; bir DNA hedefini 106- 1012 baz arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır (Temizkan ve Ark. 2004). PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; bir çok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale gelmiştir

PCR Teknolojisi için:

- 1) DNA örneği, genelde genomik DNA,
- 2) Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,
- 3) dNTP'ler (A,T,C,G),
- 4) Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
- 5) Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg⁺²) sağlayan tampon karışımı gereklidir (Temizkan ve Ark. 2004).

1.9.1. PCR kullanım alanları :

Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, adli tıpta, onkogenesinin araştırılmasında, probe'ların oluşturulmasında / klonlamada / gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin

oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin belirlenmesinde, geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında, Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) Analizinde, Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması, DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir (Boehm 1989, Boum 2000, Temizkan ve Ark. 2004).

1.10. Real Time PCR

PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaları kullanıldığı, floresanın olusan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Bustin 2006).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın ekspresyon seviyesini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Real time PCR Aynı zamanda tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır (Kubista ve Ark. 2006).

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar ve en çok kullanılanlar şunlardır, “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”, “Chromo4”, “Smart Cycler”, “Rotor- Gene”, “LightCycler” (Günel 2007).

1.10.1. Özgül Olmayan Belirleme Yöntemi

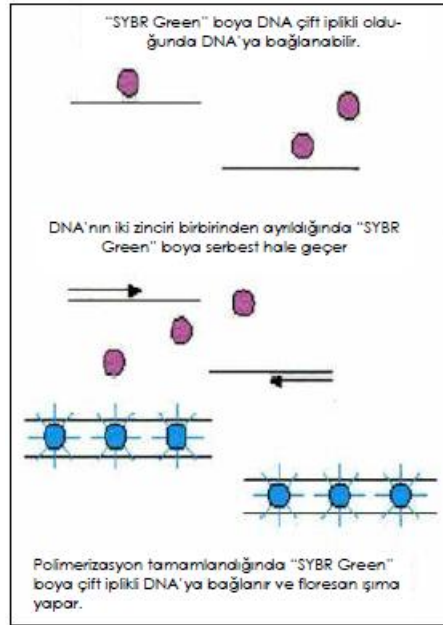
1.10.1.1 SYBR Green I Boyası

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-

time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar (Gunel 2007).

“SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA’nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6’sını kaybeder. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar (Kubista 2006).

Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA’nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış “real-time” cihazının monitöründen izlenebilir. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir (Şekil 1.9.) (Kubista 2006).



Şekil 1.9. SYBR Green I Yöntemi (Gunel 2007)

Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin

çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığına primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ısıma gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri (“melting curve”, “dissociation”) yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya baslar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindendir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Gunel 2007).

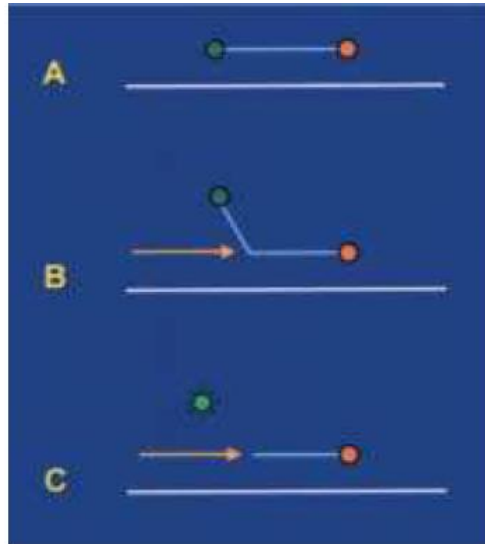
1.10.2. Özgül Belirleme Yöntemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problemler kullanılır. Bu tekniklerin başında “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problemler kullanılarak yapılanlardır (Gunel 2007).

1.10.2.1. Taq Man Yöntemi

TaqMan® probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TaqMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil rodamin= TAMRA). 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya

bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problemler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder (Şekil 1.10) “TaqMan® probe” yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır (Günel 2007, Cacherill 2001).

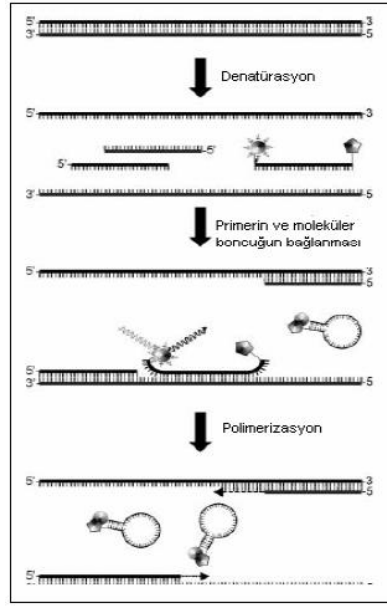


Şekil 1.10. TaqMan® Probe Yöntemi (Cacherill 2001)

1.10.2.2. Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile “TagMan® probe” ve “SYBR Green I” yönteminden çok farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ısıma

yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizaynedildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer (Şekil 1.11). Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası seklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Bu teknikte oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (Gunel 2007).



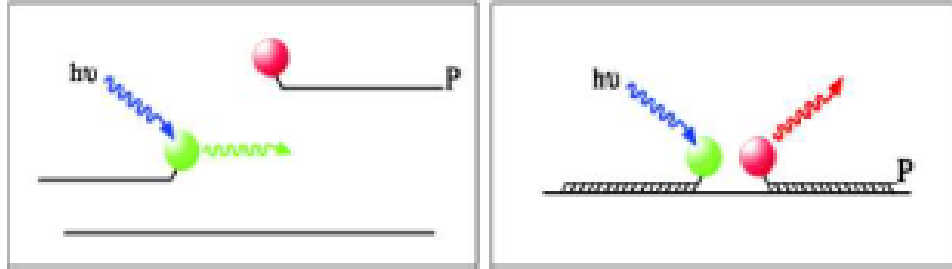
Şekil 1.11. Moleküler Boncuk Yöntemi (Gunel 2007)

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalardır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışıma elde edilemeyebilir.

1.10.2.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler®” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. iki farklı prob dizayn edilmiştir. 3’ ucunda floresans işaretli boya (donor), 5’ ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır (Şekil 1.12). PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence

Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar.

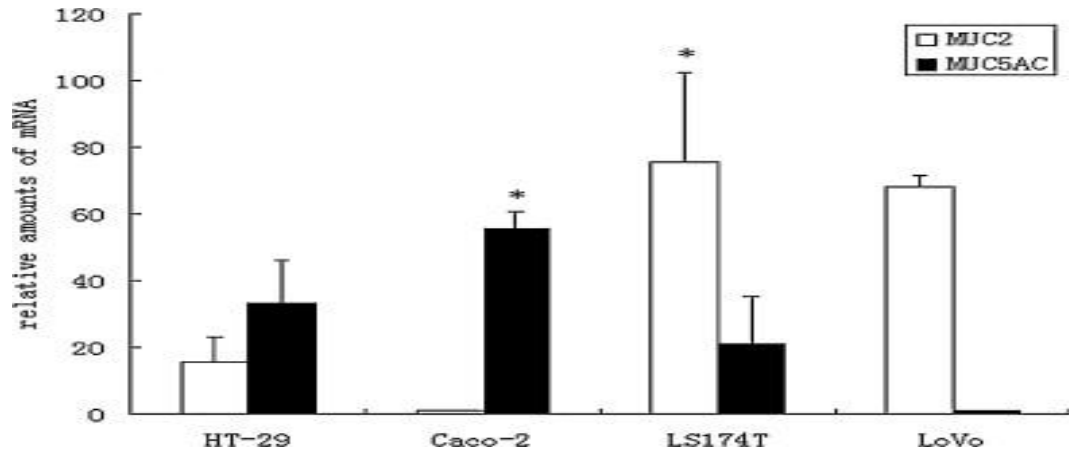


Şekil 1.12. Hibridizasyon Prob Yöntemi (Günel 2007)

1.11. Çalışmada Kullanılan Genler

1.11.1. Hedef gen : MUC5AC

Bu ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu bir çalışmada dört kolon kanser hücre hattı (Caco-2, HT29, LoVo ve LS174T) kullanılarak MUC2 ve MUC5AC mRNA seviyeleri araştırılmıştır. Caco-2 hücre hattının en yüksek MUC5AC mRNA seviyesine sahip olduğu bu çalışma sonunda rapor edilmiştir (Şekil.1.13).



Şekil 1.13. HT29, Caco-2, LS174T ve LoVo Kolon kanserli hücre hatlarının MUC2 ve MUC5AC mRNA seviyeleri (Bu ve Ark. 2011).

MUC5AC ve MUC2 kromozomun 11p15.5 bölgesinde yer almaktadır ve protein sentezi biyolojik aktif moleküller (sitokinler, bakteriyel ürünler ve büyüme

faktörleri) tarafından düzenlenmektedirler. MUC5AC normal kolon epitelinde sentezlenmez ama adenokarsinoma ve kolorektal kanserde *de novo* sentezi olur.

Kolorektal kanser malign olan kanser türünün en yaygın olanıdır. Ringel ve Arkadaşlarının (2003) yaptıkları bir çalışmada değiştirilmiş ya da uygun olmayan musin gen ekspresyonundan tümör gelişiminde, tümörün yayılmasında ve kolorektal kanserin tahmininde yararlanılabileceği rapor edilmiştir.

1.11.2. Housekeeping gen: 18 S rRNA

Ribozom yapılarının % 60'ını oluşturan r RNA'lar, ökaryotik hücrenin % 80-85'ini meydana getirmektedirler. rRNA'lar nükleolusdaki 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların satellit saplarındaki DNA bölgelerinden kopyalanmaktadır. Bu gen bölgelerinin transkribe ettiği 45 S'lik RNA öncül RNA'dır ve bu RNA'dan 5.8, 18S ve 28 S'lik rRNA'lar oluşturulmaktadır. 1.9 kb uzunluğa sahip olan 18S rRNA, ribozomun küçük alt biriminin oluşturulmasından sorumludur (internet 1).

Gen ifadelerinin belirlenmesinde kontrol grubu olarak housekeeping genler kullanılmaktadır. Housekeeping genler hücre içinde sürekli anlatılımı yapılan genlerdir ve seçilen bu genlerin transkripsiyon düzeylerinin deneysel koşullardan etkilenmediği düşünülmektedir (Arenz ve Ark. 2007, Morse 2005).

18S rRNA, GAPDH, ACTB, gibi genler gen anlatım seviyelerinin incelenmesinde sıklıkla kullanılan housekeeping genlerden birisidir. Kantitatif RT-PCR yönteminde 18S rRNA, karşılaştırılan diğer housekeeping genlere göre, deney koşullarından en az etkilenmekte ve daha az bozulmaya uğramaktadır (Morse 2005).

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), Sodyum bikarbonat (Sigma), EDTA (Merck), MTT (Biological Industries), Sıvı Azot, RNeasy Mini Kit 50

(QIAGEN), QuantiTect Reverse.Transcription Kit 50 (QIAGEN), PP-HU-600 Custom RT PCR assays prob 600 (QIAGEN), HK-PP-HU-600/Human probe housekeep 600 (QIAGEN), PRECISION/Precision Mastermix 12.5ml (QIAGEN).

2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik ve 75 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 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), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), 0,2 ml'lik ve 0,5 ml'lik PCR tüpü, 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), Real Time PCR (Corbett Research (Rotor Gene RG3000), Palm Cyler, Nano Drop (NanoVue).

2.4.Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121°C, 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. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri vakum filtre sisteminden geçirilerek steril edilmiştir

2.5. Caco-2 Hücre Kültürü

Caco-2 (human colon adenocarcinoma) hücreleri Ankara Şap Enstitüsünden alınıp stoklanmıştır. Caco-2 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum,%10 non-esential aminoasit, Minimal Esential Medium (MEM) , Penicilin-Streptomycin ve %7,5 NaHCO₃, içeren besiyerinin bulunduğu 25 ve 75 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.6.Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

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

2.6.1. *Lactobacillus plantarum* 9 suşundan iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözülerek 50-100-200-500-600-800-1000 µg/ml ve 1-2,5-5-10-20-40-50-80-100-200 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcö madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.2. *Lactobacillus plantarum* 157 suşundan hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 0,5-1-5-10-12,5-25-50-100-200-400 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcö madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.3. *Enterococcus faecium* suşundan iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 10-20-30-40-50-60-80-100-150-200 µg/ml ve1000-2000-4000 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcö madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.4. *Enterococcus faecium* D-36 suşundan iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 2000-4000-8000 µg/ml ve 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar

hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.5. *Kefir* ‘den hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.6. *Lactobacillus plantarum* 4L2 suşundan hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.7. *Lactobacillus reuteri* suşundan iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 500-1000-2000-4000 µg/ml ve 1000-2000-4000 µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.6.8. *Lactobacillus plantarum* 13LA1 suşundan iki set deney kurulmuştur ve farklı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan test maddesi; ultrasaf su içinde çözölererek 500-1000-2000-4000-8000-10000-20000 ve 2000-4000-8000 µg/ml µg/ml dozlar hazırlanmıştır. Test maddesi, ultra saf su içinde çözöldüğü için; negatif kontrol olarak çözöcü madde olan ultra saf su kullanılmıştır.

2.7. Yöntem

2.7.1 Hücre Kültürü

Caco-2 hücreleri uygun besiyerinde 25 ve 75 cm²’lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO₂’li gaz ortamında ve 37°C’deki CO₂ inkübatöründe kültüre edilmişlerdir.

2.7.2. 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 hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 5×10^3 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.

Kolon kanserinin tümör oluşturduğu bilinmektedir. Tümör dokusu çok sayıda hücreden oluşmaktadır. Bu nedenle uygulanan bazı test maddelerinin yüksek hücre sayısında sitotoksik etkisine bakılmıştır. Bunun için 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 hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 2×10^4 ve 3×10^4 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 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 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 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

2.7.2.1. *In vitro* Sitotoksisite Testi (MTT Testi)

Caco-2 hücreleri, Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^3 hücre için 48 saatlik inkübasyon, 2×10^4 ve 3×10^4 hücre için 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.

2.7.2.2. 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 mitokondrial 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

2.7.3 Real Time PCR

2.7.3.1.Hücrelerin Real Time PCR 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 real time PCR için 25 cm²'lik flaslara 22x10⁴ hücre gelecek şekilde ekimi yapılmıştır. 24 saat 37 C°'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir inkübasyondan sonra, MTT testi sonucunda uygun görülen doz konsantrasyonu taze besiyeri ile hücre ekimi yapılan flaslara uygulanmıştır ve 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

2.7.3.2. RNA izolasyonu

- ✓ Hücreler 24 saat süresince maddelerle muamele edildikten sonra süpernatantla birlikte, PBS, PBS-EDTA, tripsin yardımı ile hücreler santrifüj tüpüne toplanmış, thoma lamı 35×10^4 hücre kullanılmak üzere alınıp 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- ✓ Hücrelerin üzerine Buffer RTL plus + Beta merkaptotanol karışımı konarak yavaş yavaş pipetlenmiş ve genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece genomik DNA kolonda kalır.
- ✓ Alttaki genomik DNA'nın bulunmadığı lizatın üzerine 350 µl %70'lik etanol ekleyerek pipetlenmiş ve pembe renkli kolonlara konarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Altta kalan sıvı atılarak kolona 700 µl RW1 eklenmiş, 15 sn 10 000 rpm de santrifüj edilmiş ve sıvı yine dökülmüştür.
- ✓ Kolonların üzerine 500 µl Buffer RPE konulmuş, 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Kolonlar yeni bir toplama tüpünün üzerine koyularak aynı işlem tekrarlanarak 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Kolon yeni bir toplama tüpüne koyulmuş, hiçbir şey eklemekten kuruması için 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase free water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklenmiş ve 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Üstteki kolon atılarak, altta kalan RNA'lar nano dropta ölçülmüş ve real time PCR için işlem yapılana kadar (-80) C°'de saklanmıştır.
- ✓ RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen RNA nanodrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş 1 ngr DNA ya

ulaşacak şekilde DNase, RNase free su ile seyreltilmiştir (QIAGEN RNeasy Protect Mini Kit).

2.7.3.3. gDNA uzaklaştırma (wipeout)

Çizelge 2.1. gDNA uzaklaştırma miks miktarı

Miks	Miktar (µl)
gDNA Wipeout Buffer	2
H ₂ O	x
Toplam	(2+x)

- ✓ Nanodropta izole edilen RNA miktarları belirlenmiştir.
- ✓ Her bir reaksiyon tüpüne 2 µl gDNA wipeout dağıtılacağı için;
12- RNA miktarı = x µl H₂O ilave edilmiştir
- ✓ (2+x) µl miks tüplere toplam hacim 14 µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- ✓ 42 C° de 2 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Sonra hemen buz üstüne alınmıştır.(QIAGEN QuantiTect Rev.Transcription Kit 50)

2.7.3.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi için, gDNA'sı uzaklaştırılmış DNA üstüne (14 µl) , 6 µl cDNA sentez miksinden ilave edilir ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmış olur. cDNA sentez işlemi palm cyclers cihazında 42 C°de 15 dk. 95 C°de 3 dk. 4 C°de ∞ Olacak şekilde toplam 18 dakikada yapılmıştır (QIAGEN QuantiTect Rev.Transcription Kit 50)

Çizelge 2.2 cDNA sentez miks miktarı

Miks	Miktar (µl)
Quantiscript Reverse Transcriptase	1
Quantiscript RT Buffer	4
RT Primer Miks	1
Toplam	6

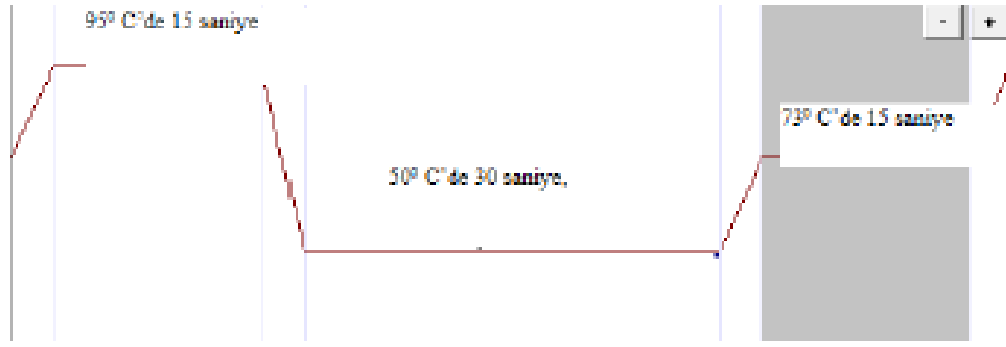
2.7.3.5. Real Time PCR Analiz

- ✓ cDNA sentezinden sonra PCR tüpleri soğuk bloğa alınmıştır.
- ✓ Başka PCR tüplerine 90 µl RNase-DNase free water konur ve üzerine 10 µl cDNA eklenmiştir
- ✓ cDNA'lar 1/10 oranında dilüye edilmiş olur
- ✓ 1/10 oranında dilüye edilen cDNA'lar , real time PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Real Time PCR miks miktarı

Miks	Miktar (µl)	x Örnek Sayısı	Toplam(µl)
Primer Prob	1	7	7
Master Mix	10	7	70
H ₂ O	4	7	28
Genel Toplam			105

- ✓ Real time PCR miksi, housekeeping gen ve hedef gen için ayrı ayrı hazırlanmıştır.
- ✓ Boş PCR tüpleri hazırlanmıştır. (örnek sayısı kadar)
- ✓ real time PCR miksinden 15 µl ilave edilir.
- ✓ Dilüye edilmiş cDNA'lardan 5 µl real time miks bulunan pcr tüplerine eklenmiştir.
- ✓ Toplam hacim 20 µl olmuştur.
- ✓ Örnekler cihaza yüklenmiştir ve real time pcr başlatılmıştır.



Şekil 2.1. Real Time PCR 1. döngü

- ✓ Örnekler cihaza yüklendikten sonra real time PCR işlemi 95 C°'de 15 saniye, 50 C°'de 30 saniye, 73 C°'de 15 saniye olacak şekilde toplam 50 döngüde tamamlanmıştır (QIAGEN).
- ✓ Çalışmada TaqMan Prob kullanılmıştır ve hedef gen ve housekeeping gene özgü primer-prob firma tarafından tasarlanmıştır (QIAGEN).

Real Time PCR için kullanılan primer-prob dizileri

Hedef gen: MUC5AC

5' CAGAGGGGTTGACAGTGAC-3' (Forward)

5'- GAACCGCATTTGGGCATC 3' (Reverse)

Housekeeping gen: 18 S rRNA

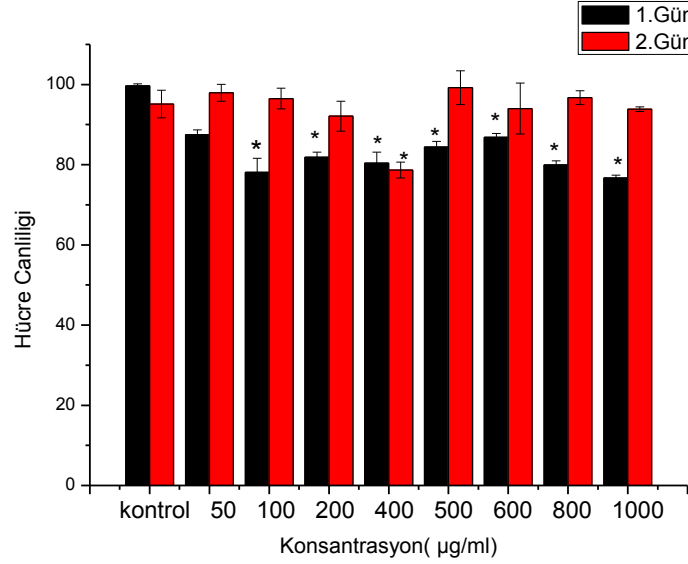
5'ATCAACTTTTCGATGGTAGTCG-3'(Forward)

5'-TCCTTGGATGTGGTAGCCG-3' (Reverse)

Çalışmayı yorumlayabilmek için hedef gen, housekeeping genin değerine bölünmüştür. Böylelikle hücrelere uygulanan maddenin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinde artış veya azalış belirlenmiştir.

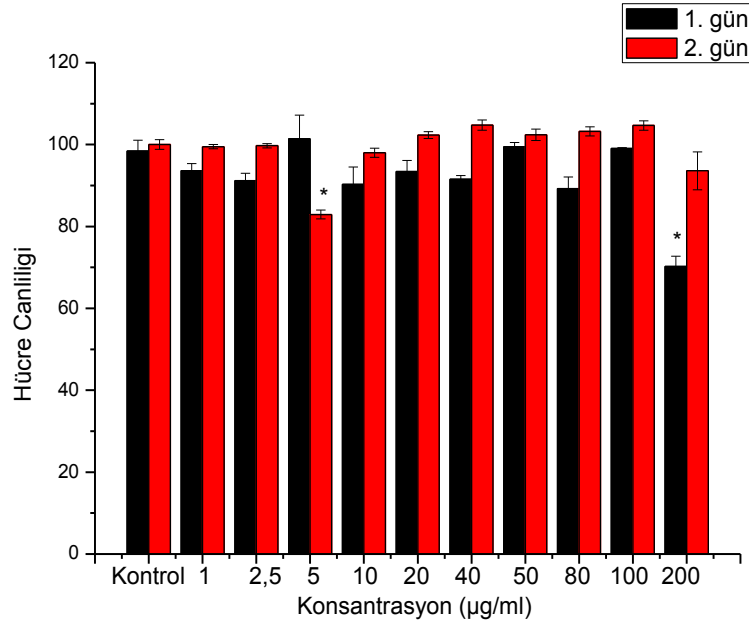
3. BULGULAR

3.1. Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen Ekzopolisakkaritlerin Caco-2 kanserli hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri



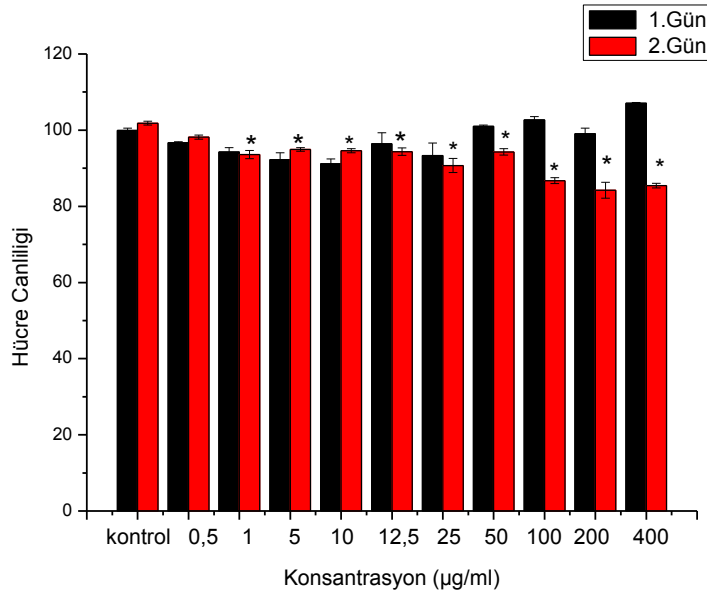
Şekil 3.1. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *L.plantarum* 9'dan elde edilen EPS'nin, Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 9'dan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 50-100-200-400-500-600-800-1000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda olarak 24 saatlik deney sonucunda 50-100-200-400-500-600-800-1000 µg/ml olacak şekilde uygulanan dozlarda kontrole bağlı hücre canlılığında % 15 ile % 20 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 48 saat sonucunda 400 µg/ml ile muamele de kontrole bağlı hücre canlılığında % 20 oranında düşüş görülmektedir. Fakat uygulanan diğer dozlar (50-100-200-500-600-800-1000 µg/ml) sonucunda hücre canlılığında azalış beklenirken artış gözlemlenmiştir.



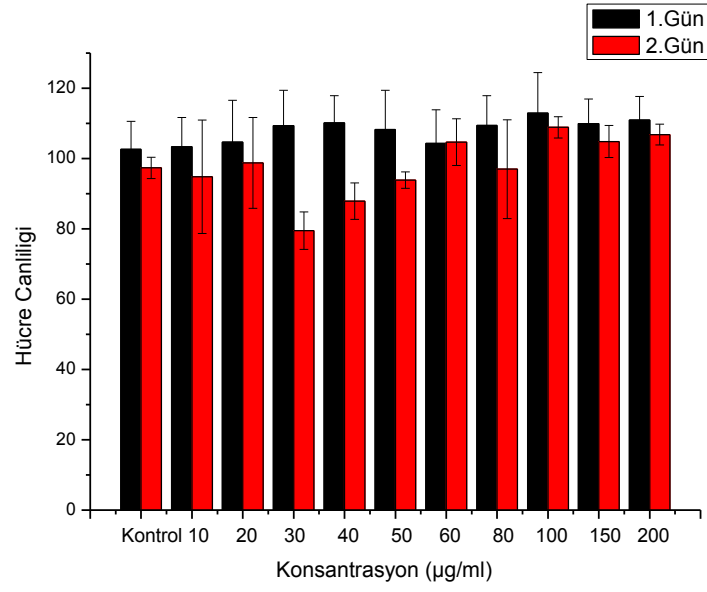
Şekil 3.2. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *L.plantarum* 157 elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 157'den elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 1-2,5-5-10-20-40-50-80-100-200 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda, 24 saat sonunda 200 µg/ml doz ile muamelede kontrole göre hücre canlılığı %20 oranında düşüş, 48 saat sonunda 5 µg/ml doz ile muamelede kontrole göre hücre canlılığında % 15 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Fakat 24 saat ve 48 saat sonucunda uygulanan diğer dozlarda hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemektedir



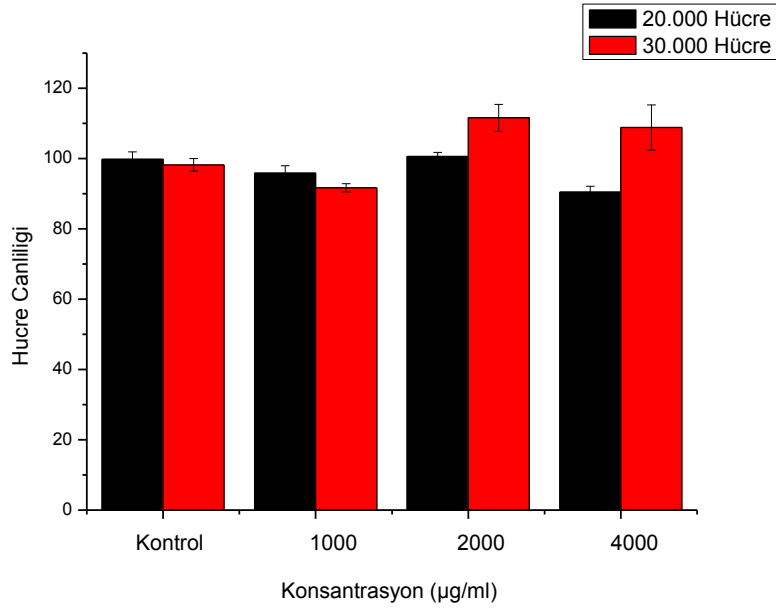
Şekil 3.3. Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *L.plantarum* 157 elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Pastırmadan izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 157'den elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 0,5-1-5-10-12,5-25-50-100-200-400 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda, 24 saat sonunda tüm dozlar ile muamelede kontrole göre hücre canlılığı %20 oranında düşüş 48 saat sonunda 5 µg/ml doz ile muamelede hücre canlılığında % 15 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Fakat 24 saat ve 48 saat sonucunda uygulanan diğer dozlarda hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemektedir.



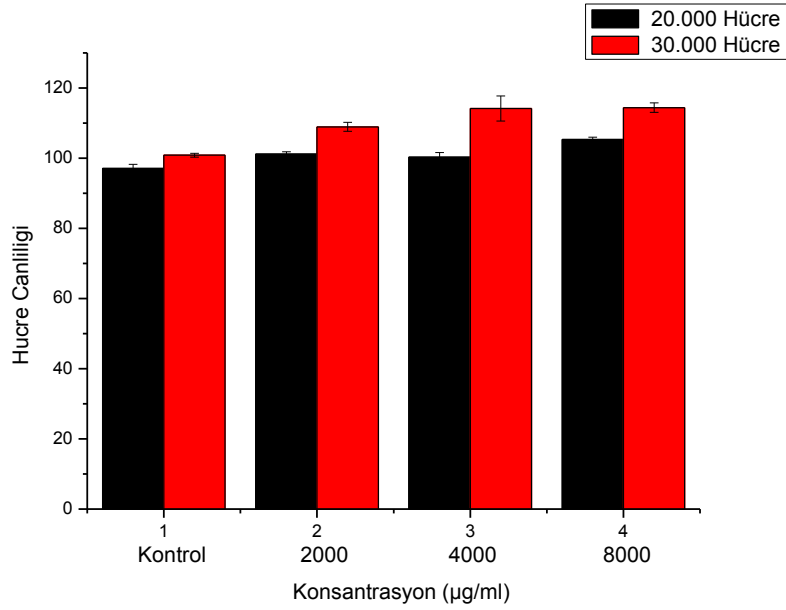
Şekil 3.4. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Enterococcus faecium* suşundan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 10-20-30-40-50-60-80-100-150-200 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda uygulanan dozlarda (10-20-30-40-50-60-80-100-150-200 µg/ml) hücre canlılığında azalış beklenirken artış gözlemlenmiştir



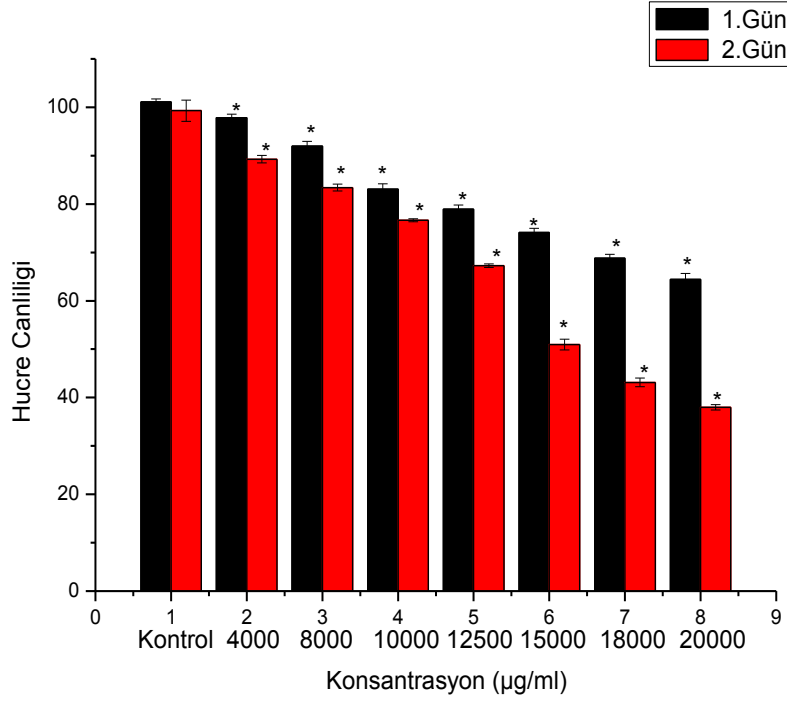
Şekil 3.5. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Enterococcus faecium* elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 1000-2000-4000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 20.000 ve 30.000 hücre ekilmiştir 24 saatlik deney kurulmuştur. 24 saat sonucunda doz yükseldikçe hücre canlılığında azalma beklenirken hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda yüksek ekilen hücre sayısı doza bağlı olarak hücre sayısında daha fazla artış olmuştur.



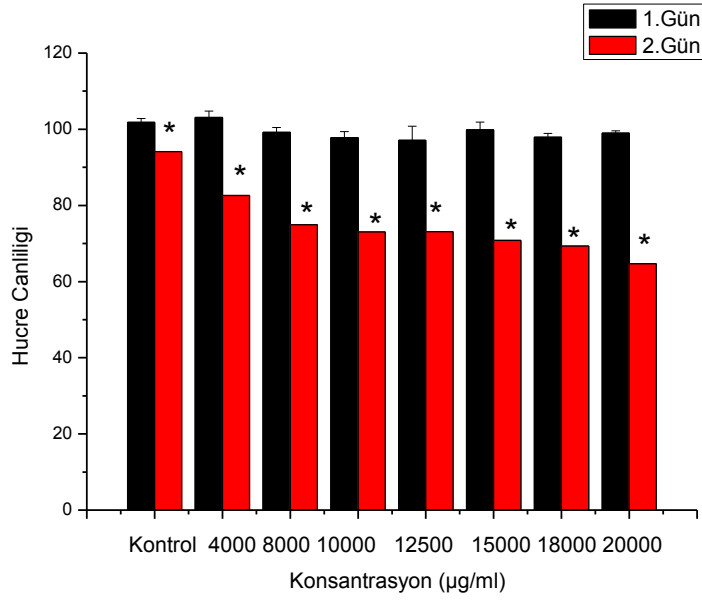
Şekil 3.6. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 suşundan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 2000-4000-8000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 20.000 ve 30.000 hücre ekilmiştir 24 saatlik deney kurulmuştur. 24 saat sonucunda doz yükseldikçe hücre canlılığında azalma beklenirken hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda yüksek ekilen hücre sayısı doza bağlı olarak hücre sayısında daha fazla artış olmuştur.



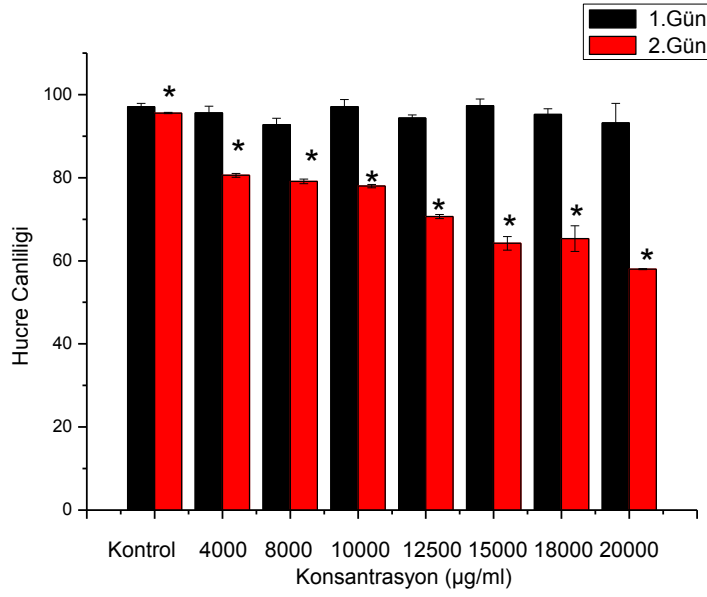
Şekil 3.7. Sütten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 suşundan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 5000 hücre ekilip 24 ve 48 saatlik deney kurulmuştur. 24 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmiştir. En son dozda % 20 oranında bir düşüş vardır. 48 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmiştir. En son dozda % 60 oranında bir düşüş vardır.



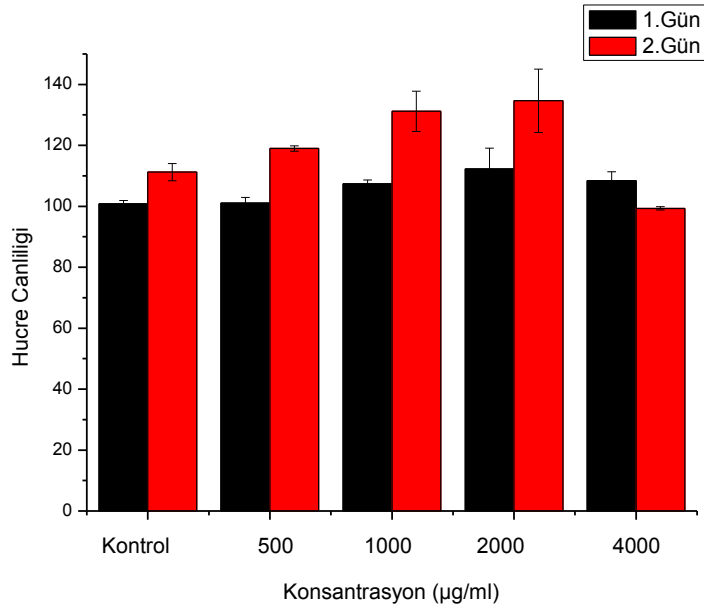
Şekil 3.8. *Kefir*'den elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Kefir'den elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 5000 hücre ekilip 24 ve 48 saatlik deney kurulmuştur. 24 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemiştir. 48 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmiştir. En son dozda % 20 oranında bir düşüş vardır.



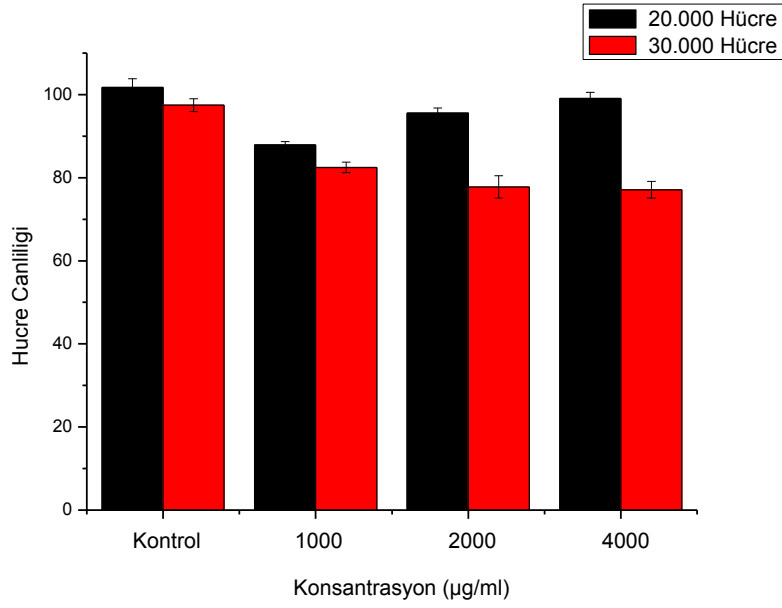
Şekil 3.9. Ağız florasından izole edilen Laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Ağız florasından izole edilen Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 4L2 suşundan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 4000-8000-10000-12500-15000-18000-20000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 5000 hücre ekilip 24 ve 48 saatlik deney kurulmuştur. 24 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemiştir. 48 saatlik deney sonucunda doza bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre canlılığında düşüş gözlemlenmiştir. En son dozda % 35 oranında bir düşüş vardır.



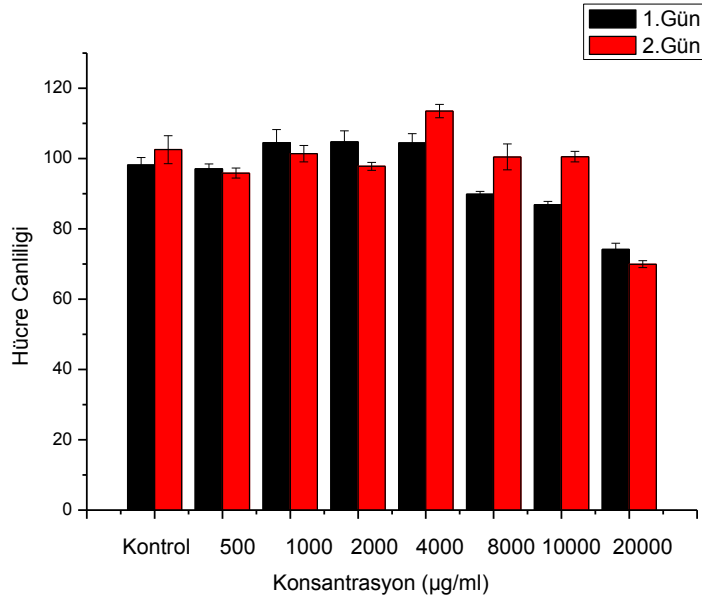
Şekil 3.10. Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus reuteri* suşundan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 500-1000-2000-4000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda uygulanan dozlarda hücre canlılığında azalış beklenirken artış gözlemlenmiştir



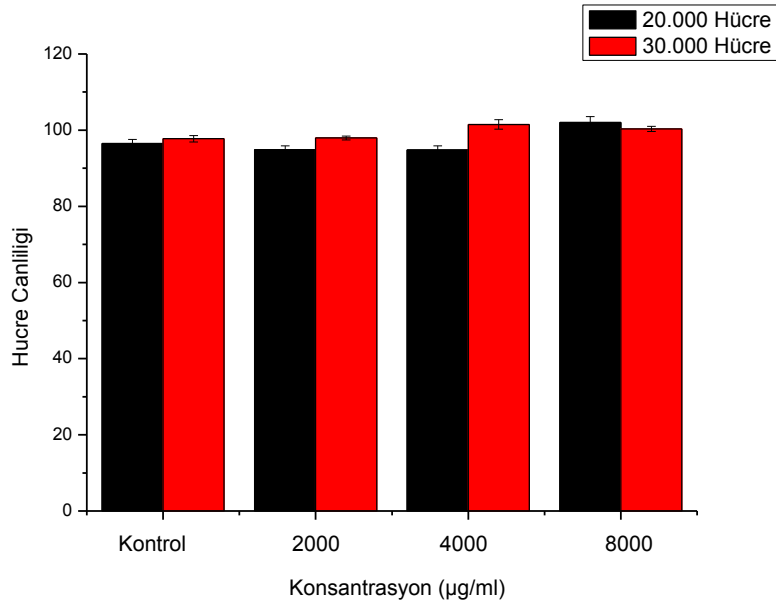
Şekil 3.11. Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Etten izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus reuteri* suşundan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 1000-2000-4000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 20.000 ve 30.000 hücre ekilmiştir 24 saatlik deney kurulmuştur. 20.000 hücre ekilen 24 saatlik sonucunda doz yükseldikçe hücre canlılığında azalma beklenirken hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. 30.000 hücre ekilen 24 saatlik deney sonucunda hücre sayısı doza bağlı olarak hücre sayısında azalış gözlemlenmiştir. En son uygulanan dozda %15 oranında bir düşüş vardır.



Şekil 3.12. Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

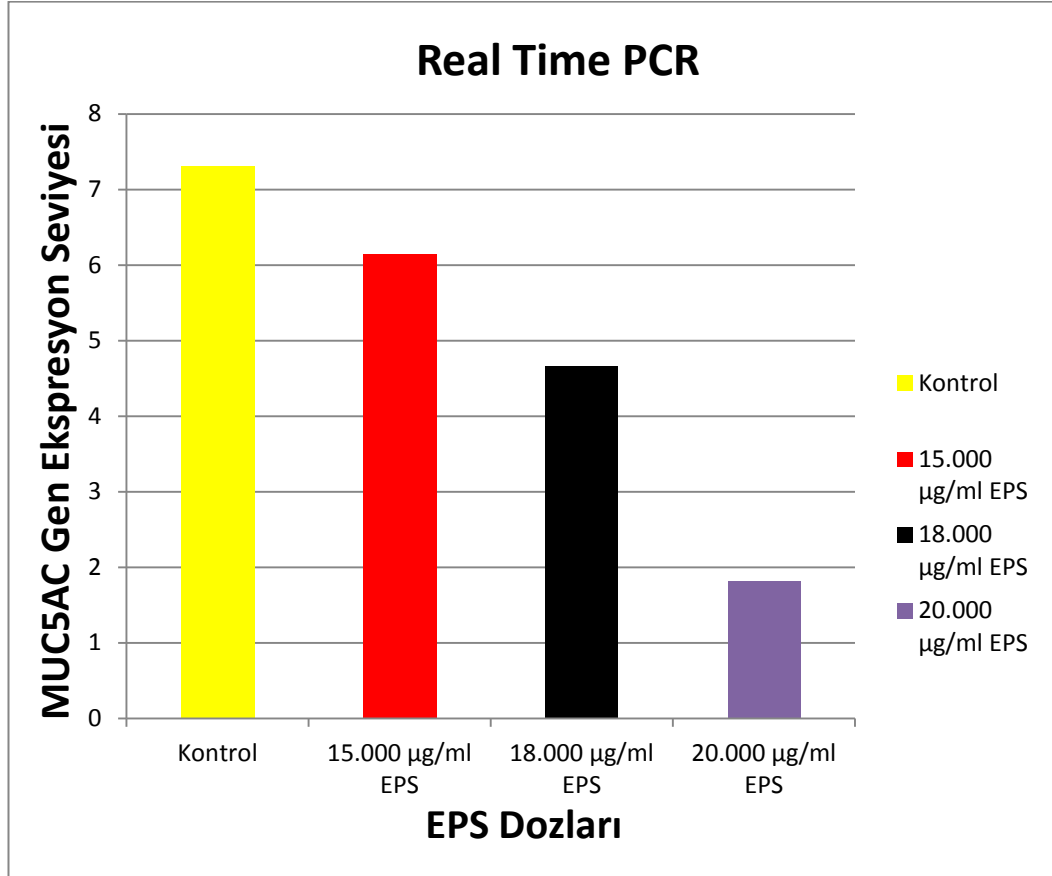
Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 13LA1 suşundan elde edilen EPS'nin, 5×10^3 hücre sayısında ekim yapılan Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 500-1000-2000-4000-8000-10000-20000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik deneyler sonucunda uygulanan dozlarda hücre canlılığında azalış beklenirken artış gözlemlenmiştir



Şekil 3.13. Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Ağız florasından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinden *Lactobacillus plantarum* 13LA1 suşundan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sırasıyla 2000-4000-8000 µg/ml dozlar uygulanmıştır. 20.000 ve 30.000 hücre ekilmiştir 24 saatlik deney kurulmuştur. 24 saat sonucunda doz yükseldikçe hücre canlılığında azalma beklenirken 2000-4000 µg/ml uygulanan dozlarda hücre canlılığında bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 8000 µg/ml'de hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. 30.000 hücre ekilen 24 saatlik deney sonucunda 2000 µg/ml uygulanan dozda hücre canlılığında değişiklik gözlemlenmemiştir. 4000-8000 µg/ml uygulanan dozlarda hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir.

3.2. Laktik asit bakterilerinden izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS) Caco-2 kanserli hücre hattına uygulanması sonucu MUC5AC gen ekspresyonundaki değişimin real time PCR ile belirlenmesi



Şekil 3.14. Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 suşundan elde edilen EPS'nin sırasıyla 15000-18000-20000 µg/ml dozları uygulanmış ve 24 saatlik deney kurulmuştur. Caco-2 hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen MUC5AC geninin ekspresyonuna etkisi real time PCR ile değerlendirilmiştir.

Real Time PCR için 22×10^4 hücre sayısı belirlenmiş ve bu sayıda ekim yapılarak deney kurulmuştur. Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 suşundan elde edilen EPS, Caco-2 hücrelerine sırasıyla 15000-18000-20000 µg/ml dozları uygulanmış ve 24 saat maruziyet sonucunda Caco-2 hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen MUC5AC geninin ekspresyonuna etkisi real time PCR yapıp değerlendirmiştir ve kontrol grubuna göre doza bağlı olarak doz arttıkça MUC5AC gen ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Probiyotik gıdaların günlük hayatımızda kullanımı oldukça fazladır ve bu gıdalara gün geçtikçe talep artmaktadır. Probiyotik gıdalar probiyotik özellikte (sağlığa yararlı) mikroorganizmalar içermektedir. İntestinal sistem araştırmalarında probiyotiklere ilgi büyüktür. Probiyotik özelliğe sahip mikroorganizmaların en yaygın olarak kullanılanı ve bilineni Laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri genellikle süt ve süt ürünlerinde bulunmasına rağmen, çeşitli yiyeceklerde de (hayvansal et ve bitkiler) bulunabilirler. LAB'lar yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar ve fonksiyonel EPS üreticisi olarak sınıflandırılırlar (Welman ve Ark. 2003, Meulen ve Ark. 2007). EPS'ler gıda endüstrisinde kıvam artırıcı, pıhtı azaltıcı olarak kullanılmaktadır ve tıp biyokimya alanında ise tümör oluşumunu engelleyici, bağışıklık sistemini destekleyici, makrofaj ve lenfosit aktive edici, kan kolesterolünü düşürücü özellikleri de bulunmaktadır (Karaca ve Ark. 2010, Lin ve Chien 2007).

Bu tez çalışmasında, süttten, etten, pastırmadan ve ağız florasından izole edilen laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS insan kolon kanserli hücre hattı olan, Caco-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi ve Caco-2 kanserli hücre hattında musin glikoproteinini eksprese eden gen olan, MUC5AC gen ekspresyon seviyesindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız laktik asit bakterilerinin farklı suşlarının farklı sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Caco-2 hücrelerinin, pastırmadan izole edilen *Lactobacillus plantarum* 157 ve 9, Süttten izole edilen *Enterococcus faecium*, Etten izole edilen, *Lactobacillus reuteri*, Ağız florasından izole edilen *Lactobacillus plantarum* 13L1A'dan elde edilen EPS'ler ile yüksek hücre sayısında 24 saat'lik, düşük hücre sayısında 24 ve 48 saatlik maruziyet sonucunda sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. Hücre canlılığında doza bağılı olarak azalış beklenirken artış gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyona çıkmıştır ve yine hücre canlılığında azalış gözlemlenmemiştir.

Ağız florasından izole edilen *Lactobacillus plantarum* 4L2'den elde edilen EPS'in, 5×10^3 hücre sayısına sahip Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat olmak üzere iki ayrı zaman diliminde ölçülmüştür. 24 saatlik maruziyet sonucunda hücre canlılığında azalış meydana gelmemiş, fakat 48 saatlik maruziyet sonucunda hücre canlılığında doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiştir.

Kefirden izole edilen EPS'in, 5×10^3 hücre sayısına sahip Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat EPS ile muamele edilmiştir. 24 saatlik deney sonucunda hücre canlılığında azalış gözlemlenmemiştir fakat 48 saatlik deney sonucunda hücre canlılığında doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiştir.

Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 'dan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, yüksek hücre sayısı ($2 \times 10^4, 3 \times 10^4$) belirlenip, 24 saat EPS ile muamele edilmiştir ve düşük hücre sayısı belirlenip (5×10^3) 24 ve 48 saat EPS ile muamele edilmiştir. 24 saat maruziyet sonucunda yüksek hücre canlılığında doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmemiştir. Fakat, 24 saat ve 48 saat maruziyet sonucunda hücre canlılığında azalış gözlemlenmektedir. Özellikle 48 saatlik deney sonucuna bakıldığında doza bağlı olarak azalış meydana gelmiştir ve en son dozda % 60'a varan bir azalış gözlemlenmektedir.

Sütten izole edilen *Enterococcus faecium* D-36 'dan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerine yapılan sitotoksisite çalışmaları sonucunda etkili doz belirlenip Caco-2 hücre hattında musin ekspresyonundan sorumlu ve Caco-2 hücre hattında yüksek eksprese edilen MUC5AC gen ekspresyonunun seviyesine bakabilmek için Caco-2 hücre hattına uygulanmış ve gen ekspresyon seviyesi real time PCR ile değerlendirilmiştir. Yapılan deney sonucunda MUC5AC gen ekspresyonu seviyesinde, kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azalış gözlemlenmiştir.

Etten izole edilen *L. reuteri*'den elde edilen EPS'nin uygulama sonucunda hücre canlılığında azalış yerine artış gözlemlenmesi, etten zengin gıda tüketiminin kolon kanseri riskini artırabileğini düşündürmekte ve kolon kanseri ve diyet ilişkisinin önemi vurgulamaktadır.

Ağız florasından izole edilen *Lactobacillus plantarum* 4L2 ve Kefir'den elde edilen EPS, 5×10^3 hücre sayısına sahip Caco-2 hücreleri üzerinde 48 saatlik maruziyet sonucunda hücre canlılığında azalış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, bu maddeleri içeren gıdalar üretilip piyasaya sürülebilir ve insan metabolizmasında 48 saat boyunca duramayacağı için günlük tüketilip gıda takviyesi olarak kullanılabileceği ve kolon kanseri riskini azaltabileceği düşünülmektedir.

Enterococcus faecium D-36'dan elde edilen EPS'nin yüksek hücre sayısında etkili olmadığı fakat düşük hücre sayısında etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu bize erken teşhisin önemini hatırlatmaktadır. Çünkü kolon kanseri, tek bir hücreden oluşup tümörlü kitle oluşumu yapabilme özelliğine sahiptir (O'Connell ve Ark 2004, Roig ve Ark 2009). Çıkan sonuçlar doğrultusunda *Enterococcus faecium* D-36'dan elde edilen EPS, kanserin özellikle kolon kanserinin erken safhalarında kanserden koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kolon kanserinde değişen birçok protein ekspresyonu gibi musin glikoproteininin ekspresyonu ve glikolizasyonunda değişiklik meydana gelmektedir. Kolon kanserinde değişen musin glikolizasyonu hücrelere invazif özellik kazandırmakta yani kan damarına doğru eğilim göstermekte ve metastaz yapabilme özelliği kazandırmaktadır (Varki 2009, Li ve Ark. 2010, Kufe 2009). Musin gen ekspresyonu seviyesi arttıkça musin proteini artmakta ve bu musin proteini yanlış glikolize olmaya devam etmektedir. (Li ve Ark. 2010).

Caco-2 hücre hattında musin ekspresyonundan sorumlu gen musin gen ailesinden MUC5AC genidir ve Caco-2 hücre hattında ekspresyonu oldukça yüksektir (Bu ve Ark. 2011). Çalışmamızda *Enterococcus faecium* D-36'dan elde edilen EPS'nin MUC5AC gen ekspresyonu seviyesine etkisine bakıldığında kontrole göre doza bağlı olarak azalış gözlemlenmiştir. Bu bize, kullanılan maddenin kolon kanserli hücrelerde musin ekspresyonunu azaltıcı özelliğe sahip olması nedeniyle kanserli hücrenin invazyon yeteneğini azaltacağı dolayısıyla metastaz yeteneğinin azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Kanserli hastalarda doğal ürünlerle beslenmeye talep oldukça yüksektir. Probiyotik gıdalarda doğal ürünler arasında yer almaktadırlar. Fakat, probiyotik gıdaların dezavantajı mikroorganizma içermeleridir. Kanser tedavisi gören hastaların aldıkları kemoterapi ve radyoterapiler bağışıklık sistemlerini zayıflatmaktadır. Bu yüzden probiyotikler gibi mikroorganizma içeren gıdalar kanser tedavisi gören hastalar için tehlike arz etmekte olup, kanser tedavisi gören hastaların bu tarz gıdalarla beslenmeleri sakıncalı bulunmaktadır. Bizim elde ettiğimiz EPS (D-36) saf olarak gıdaların içine konularak (örneğin EPS içeren yoğurt üretimi gibi) gıda haline dönüştürülebilirse, bu tarz gıdaların tüketiminin sağlıklı bireylerde koruyucu özelliğinin yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi gören hastalarda gıda takviyesi olarak kullanıldığında, tedavi edici özellikte olduğu düşünüldüğünden dolayı tedaviye destek vereceği düşünülmektedir.

Kanserle savaşta erken teşhis çok önemli bir durumdur. Erken ve doğru tanıda bize yol gösterebilecek araçlardan biri de tümör markerlarıdır. Kolon kanserinde artan musin ekspresyonu tümör markerı olarak kullanılabilir. Örneğin, MUC-1: CA 27-29 ve CA 15-3 ölçümleri ile değerlendirilen müsinoit antijendir. Caco-2 hücre hattında MUC5AC gen ekspresyonunun yüksek olduğu bilinmektedir (Bu ve Ark 2011). Bu tez çalışması sonucunda, Caco-2 hücrelerine uygulanan EPS (D-36)'nin, MUC5AC gen ekspresyon seviyesinde azalış olduğu saptanmıştır. Bu durum artan musin ekspresyonlarının tümör markerı olarak kullanılmasının yanı sıra tedavi aşamasında tedavinin başarılı olup olmadığının anlaşılmasında da faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde edilen EPS (D-36)'nin koruyucu ve başlangıç aşamasında kolon kanserini tedavi edici özelliğinin varlığı ve musin ekspresyonunu azaltıcı özelliğinin oluşu ile tümör markerı olarak kullanılabilceği düşüncesinin *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akay T., Genel Histoloji, Palme Yayıncılık Sekizinci Baskı 2010 syf 27-29
- Alp G., Aslim B., Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. Isolated from infants feces and breastmilk, *Anaerobe*, 16 (2010) 101–105
- Andrianifahanana M., Moniaux N., Batra K.S., Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1765 (2006) 189–222
- Arenz A., Stojicic N., Lau P., Hellweg C.E., Baumstark-Khan C., Suitability of commonly used housekeeping genes in gene expression studies for space radiation research, *Advances in Space Research* 39 (2007) 1050–1055
- Badel S., Bernardi T., Michaud P., New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 54–66
- Boehm C.D., Use of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Inherited Disorders, *Clinical Chemistry*, Vol.35, No.9, 1989 1843
- Bu X.D., Li N., Tian X.O., Huang P.L., Caco-2 and LS174T cell lines provide different models for studying mucin expression in colon cancer, *Tissue and Cell*, 43 (2011) 201–206
- Bustin S.A., Mueller R., Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2006) 192–223
- Cacherill FR, Uhl JR. Applications and challenges of Real- Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg; 2001. p.11.

- Choi S., Kim Y., Han K.S., You S., Oh S., Kim S.H., Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stres in vitro, *Lett Appl Microbiol*, (2005) 42(5) 89-94
- Costerton JW, Leweandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofillms. *Annual Rev. of Microbiol*, 49, 711-745.
- Davila J.C.,Rodriguez R.J., Melchert R.B., Acosta D. Jr., Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38: 63-96.
- Demir M. S., Cesitli Makrofunguslara Ait Fruktifikasyon, Vejetatif Misel ve Ekzopolisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar Yüksek Lisans Tezi (Temmuz 2007) Biyoloji Anabilim Dalı Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir
- Eckert K.A.,Kunkel T.A., DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction, *Genome Res.* 1991 1: 17-24
- Fent, K., Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicology in Vitro*, 2001; 15: 477-488.
- Fotakis G., Timbrell, J.A., In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 2006; 160:171-177.
- Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(12):4015- 21.
- Gad, S.C., *Invitro toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York, 2000.

- Gorska S., Jachymek W., Rybka J, Strus M., Heczko B. P., Gamian A., Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142, Carbohydrate Research, 345 (2010) 108–114
- Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. J Virol Methods 1999;77:37-46.
- Günel T., Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27
- Hayeshi R. , Hilgendorf C. Artursson P., Augustijns P., Brodin D., Dehertogh P., Fisher K., Fossati L, Hovenkamp E. , Korjamo T., Masungi C., Maubon N., Mols R., Müllertz A., Mönkkönen J., O’Driscoll C., Oppers-Tiëmssen H.M., Ragnarsson E.G.E., Rooseboom M., Ungell A. L., Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories, european journal of pharmaceutical sciences, 35 (2008) 383–396
- Heravi R.E., Hadizadeh F., Sankian F., Afshari J.T., Taghdisi S.M., Jafarian H., Behravan J., Novel selective Cox-2 inhibitors induce apoptosis in Caco-2 colorectal carcinoma cell line, European Journal of Pharmaceutical Sciences 2011 doi:10.1016/j.ejps.2011.09.005
- Ho S.B., Niehans G.A., Lyftogt C., Van P.S., Cherwitz D.L., Gum E.T., Dahiya R., Kim Y.S., Heterogeneity of Mucin Gene Expression in Normal and Neoplastic Tissues¹, Cancer Research, 53:641 -651, February I. 1993
- Horinaka M, Yoshida T., Kishi A., Akatani K, Yasuda T., Kouhara J., Wakada M., Sakai T., Lactobacillus strains induce TRAIL production and facilitate natural killer activity against cancer cells, FEBS Letters, 584 (2010) 577–582
- Huanga T., Linb J., Caoa J., Zhanga P., Baia Y., Chena G., Chena K., An exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* and its apoptotic

- activity on human leukemia K562 cells, *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 701– 708
- Jonckheere N., Van Seuningen I., The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers, *Biochimie* 92 (2010) 1–11
- Karaca H., Dinçer E., Kıvanç M., Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri, *Akademik Gıda* 8 (1) (2010) 32-38 Derleme Makale / Review Paper
- Karaçalı S., İzzetoğlu S., Deveci R., “Genel Kanser Biyolojisi- Bölüm 4: Kanserde Glikozilasyon Değişiklikleri” Türkçe, Birinci Baskı, 2011
- Kim Y, Oh S., Kim S. H., Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379 (2009) 324–329
- Kim Y., Oh S., Yun H.S., Kim S.H., Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells, *Letters in Applied Microbiology*, ISSN 0266-8254 (2010)
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reactionn *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
- Kufe D.W., Mucins in cancer: function, prognosis and therapy, *Nat Rev Cancer*. 2009 December ; 9(12): 874–885. doi:10.1038/nrc2761.
- Kumar V, Robbins S, Cotran R (Çeviri: U. Çevikbaş). *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000:505-514.
- Lacy A.M., García-Valdecasas J.C., Delgado S., Castells A., Taurá P., Piqué J.M., Visa J., Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial, *The Lancet* Volume 359, Issue 9325, 29 June 2002, Pages 2224–2229

- Li M., Song L., Qin X., Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines, *J. Biosci.* 35665–673, 2010
- Lin T.Y.,Chien M-F., Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time, *Food Chemistry* 100 (2007) 1419-1423
- Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M., Isolation, Structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 5528-5533
- Liu C-T., Chu F-L., Chou C-C., Yu R-C., Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fraction and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01, *Mutation Research*, 721(2011) 157-162
- Ljungh A.,Wadström T., Lactic acid bacteria as probiotics, *Curr Issues Intest Microbiol*, (2006) 7(2) 73-90
- Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira, *Moleküler Hücre Biyolojisi* Altıncı Baskıdan Çeviri Palme Yayıncılık 2011 Syf 1111-1118
- Matou S., Collic-Jouaultb S., Galy-Fauroux I., Ratiskolb J., Siquinb C., Guezennecb J., Fischera A. M., Helleya D., 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
- McIntosh G.H., Le Leu R.K., The influence of dietary proteins on colon cancer risk, *Nutrition Research* 21 (2001) 1053–1066
- Meulen R.V.,Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., Valdez G.F., Vuyst L., Screening of lactic acid isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved, *International Journal of Food Microbiology*, 118 (2007) 250–258

Mıdık F., Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Yönünden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi 2011

Morse D.L., Carroll D., Weberg L., Borgstrom M.C., Ranger-Moore J., Gillies R.J. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry* 342 (2005) 69–77

Mossman, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunological Methods*, 1983; 65:55–63

Muroz R., Moreno-Arribas M. V., Rivas B., Lactic Acid Bacteria, Chapter 8 (2011) *Molecular Wine Microbiology* Doi: 10.1016/B978-0-12-375021-1.10008-6

O’Connell J.B., Maggard M.A., Ko C.Y., Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging Journal of the National Cancer Institute, Vol. 96, No. 19, October 6, 2004

Okvur P.S., “Genel Kanser Biyolojisi – Bölüm 5 Metastaz ve İnvazyonun Biyolojik ve Genetik Temeli” Türkçe, Birinci Baskı, 2011

Ortega A., Gill A., Sanchez-Pozo A., Exogenous nucleosids modulate expression and activity of transcription factors in Caco-2 cells ,*Journal of Nutritional Biochemistry*, 22 (2011) 595-604

Orum H., PCR Clamping, *Curr. Issues Mol. Biol.* (2000) 2(1): 27-30

Paolillo R., Carratelli C. R., Sorrentino S., Mazzola N., Rizzo A., Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells, *International Immunopharmacology*, 9 (2009) 1265–1271

- Piana C., Toegel S., Guell I., Gerbes S., Viernstein H., Wirth M., Gabor F., Growth surface-induced gene and protein expression patterns in Caco-2 cells, *Acta Biomaterialia*, 4 (2008) 1819–1826
- Rafter J., Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective, *British Journal of Nutrition*, (2002) 88(1) 89-94
- Rafter J., Probiotics and colon cancer, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 17, No. 5, pp. 849–859, 2003
- Ringel J., Löhr M., The MUC gene family: Their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer, *Molecular Cancer*, 2003, 2:9
- Roig A.I, Wright W.E., Shay J.W., Is Telomerase a Novel Target for Metastatic Colon Cancer? *Current Colorectal Cancer Reports* 2009, 5:203–208
- Ruiz-Ruiz C., Seivastava GK., Carranza D., Mata JA., Llamas I., Santamaria M., Quesada E., Molina IJ., An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophilla* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells, *Appl Microbiol Biotechnol* 2011 Jan;89(2):345-55. Epub 2010 oct 3.
- Sanoa Y., Maedaa N., Kanzaki A., Fujiid T., Ochiaie A., Seiichi Takenoshita, Takebayashi Y., Angiogenesis in colon hyperplastic polyp, *Cancer Letters*, 218 (2005) 223–228
- Seithel A., Karlsson J., Hilgendorf C., Bjorquist A., Ungell A., Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells, *European journal of pharmaceutical sciences*, 28 (2006) 291–299
- Sugitani Chimilovski J., Habu S., Teixeira R.F.B., Thomaz-Soccol V., Nosedá M.D., Medeiros A.B.P., Pandey A., Soccol C.R., Antitumour Activity of *Grifola frondosa* Exopolysaccharides Produced by Submerged Fermentation Using Sugar Cane and Soy Molasses as Carbon Sources, *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (3) 359-363 (2011)

- Temizkan G., Yilmazer S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Sarıkaya A., Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 101-112, Nobel Tıp Kitapevleri, 2004
- Tok E., Aslım B., Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri, Türk Mikrobiyoloji Cem Derg (2007) 37 (1) : 62-68
- Toomey D.P., Murphy J.F., Conlon K.C., Cox-2, VEGF And Tumour Angiogenesis, Review, Surgeon, 1 June 2009, pp. 174-80
- Vandenhoute B., Buisine M.P., Debailleul V., Clement B., Moniaux N., Dieu M-C., Degand P., Porchet N., Aubert J-P Mucin gene expression in biliary epithelial cells *Journal of Hepatology* 1991; 21: 1057 1066 *Printed in Denmark . AN rights reserved Munksgaard . Copenhagen*
- Varki A., Kannagi R., Toole B.P., Chapter 44 Glycosylation Changes in Cancer, Essentials of Glycobiology. 2nd edition., Cold Spring Harbor Press 2009
- Wang Y., Ahmed Z., Feng W., Li C., Song S., Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir, International Journal of Biological Macromolecules, 43 (2008) 283–288
- Welman A.D., Maddox I.S., Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges, Trends in Biotechnology, Vol.21 No.6 June 2003
- Wu F., Lukinus A., Bergström M., Eriksson B., Watnabe, Langström Y.B., Mechanism behind the Antitumour Effect of 6- diazo–5-oxo- L-norluicine (DON) : Disruption of Mitochondria, Pergamon, 1999; 35(7):1155-1161.
- Xu R., Shang N., Li P., In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH, Anaerobe 17 (2011) 226-231

Yang J., Zhang W., Shi P., Chen J., Han X., Wang Y., Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice *Pathology – Research and Practice* 201 (2005) 745–750

Zhao L., Chen Y., Ren S., Han Y., Cheng H., Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613, *Carbohydrate Research*, 345 (2010) 637–643.

Zottola EA, Sasahara KC. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern? *Int J of Food Microbiol*, 23, 125-148.

İnternet Kaynakları

İnternet 1: http://en.wikipedia.org/wiki/18S_ribosomal_RNA