



**ÇEŞİTLİ BAKTERİ İZOLATLARININ KÜLTÜR
FİLTRETLERİ VE PROTEİNLERİNİN İNSAN
FİBROBLAST HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE
MOLEKÜLER YANITLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Fatma Necmiye KACI

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ**

2018

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ**

**ÇEŞİTLİ BAKTERİ İZOLATLARININ KÜLTÜR FİLTRETLERİ VE
PROTEİNLERİNİN İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK VE MOLEKÜLER YANITLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Fatma Necmiye KACI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2018

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**ÇEŞİTLİ BAKTERİ İZOLATLARININ KÜLTÜR FİLTRETLERİ VE
PROTEİNLERİNİN İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK VE MOLEKÜLER YANITLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ danışmanlığında, Fatma Necmiye KACI tarafından hazırlanan bu çalışma 28 / 12 / 2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **Oy birliği / Oy çokluğu ile (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Prof. Dr. M. Hamidullah UYANIK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017/08 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

28 / 12 / 2018

Fatma Necmiye KACI



ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÇEŞİTLİ BAKTERİ İZOLATLARININ KÜLTÜR FİLTRETLERİ VE PROTEİNLERİNİN İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE MOLEKÜLER YANITLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatma Necmiye KACI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Kolorektal kanser, kolon ve rektumun epitel hücrelerinde polip oluşumuyla başlayan bir kanser türüdür. Oluşan polipler pek çok kolorektal kanser için prekürsör olarak kabul edilmektedir. Kolorektal kanser kadınlarda, akciğer ve meme kanserinden sonraki üçüncü, erkeklerde ise, akciğer ve prostat kanserinden sonraki dördüncü ölüm sebebini oluşturmaktadır. Hastalığa sebep olabilecek muhtemel risk faktörleri araştırılmış, ancak kolorektal kanser patogenezi ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda öncelikli olarak kolorektal kanserli hastalardan alınan biyopsi örneklerinden bakteri izolasyonları yapılmıştır. Bakterilerin kültür filtratları ile total proteinleri izole edildikten sonra sağlıklı fibroblast hücre hattına olan etkileri; WST-8, hemoliz testi, Kaspaz-3, JC-1 ve Annexin- V analizi yöntemleri ile; gen düzeyindeki değişimleri ise qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. İzolasyonlar sonucunda biyopsi örneklerinden 3 adet *Klebsiella pneumoniae*, 1 adet *Acinetobacter baumannii* ve 1 adet *Escherichia coli* izole edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda tüm izolatların kültür filtratları ve proteinlerinin sağlıklı hücreleri özellikle inflamasyon ve nekroz yoluyla ölüme götürdüğü sonucuna varılmıştır. Gen düzeyinde etkileri incelendiğinde ise *TP53*, *SMAD* ve *APC* gibi tümör suppresör genlerin ekspresyonunda azalma, *KRAS* onkogeninin anlatımında ise kontrole göre artış gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde kolorektal kanser ile mücadelede enfeksiyonel etmenlere yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve bu etmenlerle mücadelenin kansere yakalanmamış kişilerde de uygulanması açısından literatüre yeni veriler kazandırıldığı düşünülmektedir.

2018, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, Apoptoz, Nekroz, qRT-PCR

ABSTRACT

Ph.D

EVALUATION OF THE CITOTOXIC AND MOLECULAR RESPONSE OF THE CULTURAL FILTRATES AND PROTEINS OF VARIOUS BACTERIA ISOLATES ON HUMAN FIBROBLAST CELLS

Fatma Necmiye KACI

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Colorectal cancer is a type of cancer that begins with the formation of polyps in epithelial cells of the colon and rectum. Polyps formed are considered as precursors for many colorectal cancers. Colorectal cancer is the third cause of death in women after lung and breast cancer, fourth in men, after lung and prostate cancer. The possible risk factors for the disease have been investigated, but the relationship between colorectal cancer pathogenesis and microorganisms has not been fully elucidated. Therefore, in our study, bacterial isolation was made from cancerous tissues of patients with colorectal cancer. Bacterial culture filtrates and total proteins were isolated and their effects on healthy fibroblast cell line were determined by WST-8, hemolysis test, Caspase-3, JC-1 and Annexin- V analysis methods; changes in gene level were analyzed by qRT-PCR method. As a result of isolation, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Escherichia coli* and 1 *Acinetobacter baumannii* were isolated from biopsy samples. As a result of the analysis, it was concluded that culture filtrate and proteins of microorganisms lead to death of healthy cells especially inflammation and necrosis. When the effects on gene level were examined, it was observed that they caused a decrease in expression of tumor suppressor genes such as *TP53*, *SMAD* and *APC* and an increase in expression of *KRAS* oncogene compared to control. When the results of the study are evaluated, it is thought that new strategies are gained to the literature in terms of the development of treatment strategies for the treatment of infectious factors in the fight against colorectal cancer and in the application of the fight against these factors to the people who do not have cancer.

2018, 83 page

Keywords: Colorectal Cancer, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, Apoptosis, Necrosis, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezinde (YÜTAM) bulunan Moleküler Mikrobiyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarlarında yapılmıştır. İlk olarak tez danışmanım Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ'e, tezim süresince vermiş olduğu destek, teşvik, tavsiye ve rehberliğinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca tez jürimde yer alan, Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL, Prof. Dr. M. Hamidullah UYANIK, Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ ve Dr. Öğretim Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ hocalarıma katkıları, önerileri, eleştirileri ve destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Laboratuvardaki yardımları için, Mikrobiyoloji Laboratuvarı üyeleri, Merve ŞİMŞEK ve Damla RÜZGAR'a teşekkür etmek istiyorum.

Ayrıca sevgili arkadaşlarım Özlem ÖZDEMİR TOZLU, Murat CEYLAN ve Kadir GÜNAYDIN'a tezim boyunca verdikleri destek, motivasyon ve unutulmaz anılarımız için minnettarım.

Son olarak, benim bu günlere gelmemde her türlü fedakarlığı yapan, sonsuz sevgileri, anlayışları ve motivasyonları ile canım annem Hayriye KACI, babam Mehmet Şevket KACI ve kardeşlerim Ayşe Burcu KACI YURTTAŞ ve Sinan YURTTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Biliyorum ki, onlar ne olursa olsun her zaman benimleler.

Fatma Necmiye KACI
Aralık 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser Biyolojisi	1
1.2 Apoptoz, Otofaji ve Nekroz	2
1.3 Kolon Yapısı	9
1.4 Kolorektal Kanser ve Moleküler Oluşum Yolağı	11
1.5 Kolorektal Kanser Evreleri	17
1.6 Kolorektal Kanser Tedavisi.....	19
1.7 Bakteri ve Kanser.....	19
1.8 Kolon Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen Bakteri Türleri.....	23
1.9 Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	32
3.2 Yöntem.....	35
3.2.1 Kolon Biyopsi Örneklerinden Bakteriyel İzolasyon	35
3.2.2 Bakterilerin Tanılanması.....	35
3.2.2.1 Bakterilerin Klasik Yöntemlerle Tanılanması	35
a. Hücre Morfolojisi Testi	35
b. Koloni Şekli ve Rengi	36
c. Gram Boyama.....	36
d. Oksidaz Testi.....	36
e. Üreaz Testi	37
f. Katalaz Testi	37
3.2.2.2 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması	38
a. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu	38

b. Bakterilerin 16S rRNA Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	39
c. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	39
d. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması	40
e. 16S rRNA Sekans Analizi.....	40
3.2.3 Bakterilerden Kültür Filtratı Eldesi.....	40
3.2.4 Bakteriyel Protein İzolasyonu	41
3.2.5 Bakteriyel Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.2.6 Kültür Filtratı ve Bakteriyel Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi	41
3.2.7 Hücre Kültürü.....	42
3.2.8 Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi	42
3.2.9 Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	43
3.2.10 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması	44
3.2.11 Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki (MMP) Azalmanın Saptanması	45
3.2.12 Annexin-V Analizi ile Apoptotik Hücre Populasyonunun Saptanması.....	46
3.2.13 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	46
3.2.14 cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ...	47
3.2.15 İstatistiksel Analizler.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	49
4.1 Kolon Biyopsi Örneklerinden Bakteri İzolasyonu.....	49
4.2 Bakterilerin Tanılanması.....	49
4.2.1 Bakterilerin Klasik Yöntemlerle Tanılanması	49
4.2.2 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması	50
Bakterilerin 16S rRNA Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	50
4.3 Bakteriyel Kültür Filtratı Eldesi.....	52
4.4 Bakteriyel Protein Eldesi.....	52
4.5 Kültür Filtratı ve Bakteriyel Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi	53
4.6 Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi	55
4.7 Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	58
4.8 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması	60
4.9 Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki (MMP) Azalmanın Saptanması	61
4.10 Annexin-V Analizi ile Apoptotik Hücre Populasyonunun Saptanması.....	63
4.11 cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	73
EKLER.....	81
EK-1. Etik Kurul Onay	81



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ




<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mw	Molekül ağırlığı
s	Saniye
°	Derece

Kısaltmalar

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor- 1
APC	Adenomatous polyposis coli
BSA	Bovine serum albümin
CAD	Caspase activated DNase
CD	Crohn Disease
DCC	Deleted in colorectal cancer
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DR	Ölüm reseptörü
Endo-G	Endonükleaz G
FADD	Fas-associated death domain
FAP	Ailesel adenomatöz polipozis koli
FLR	Fas ligand reseptörü

HNPCC	Hereditör non-polipozis kolorektal kanser
ICAD	Inhibitör of caspase activated DNase
İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
Kaspaz	Cystein dependent aspartate specific protease
KRAS	Kirsten rat sarcoma
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PLA	Piyojenik karaciğer absesi
ROS	Reaktif oksijen türleri
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspas
TCF/LEF	T-cell factor /lymphoid enhancer factor
TGF β	Transforming growth factor β
TNF-R	Tümör nekrosiz faktör reseptörü
TNF α	Tümör nekroz faktör α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor associated death domain
TRAIL	TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligan
TSA	Tripton Soy Agar
TSB	Tripton Soy Broth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Apoptoz Yolağı.....	6
Şekil 1.2 Otofajinin Aşamaları	7
Şekil 1.3 Otofajinin Farklı Tipleri	8
Şekil 1.4 Nekroz Oluşum Mekanizması	9
Şekil 1.5 Sindirim Sistemi	10
Şekil 1.6 Lümen Yapısı	10
Şekil 1.7 Polipten Kanser Gelişimi.....	12
Şekil 1.8 Genler Arası Etkileşimler (:  Deneysel olarak belirlenmiş,  :Komşu gen,  : Ko- ekspresyon.....	14
Şekil 1.9 Kolorektal Kanseri Gelişiminin Genetik Modeli.....	16
Şekil 1.10 Kolorektal Kanserdeki İntestinal Flora.....	21
Şekil 3.1 WST-8 ile Formazan Bileşiğinin Oluşumu	43
Şekil 3.2 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Reaksiyonu	44
Şekil 4.1 İzolatların 16S rRNA Bölgelerinin Elektroferez Görüntüsü	50
Şekil 4.2 İzolatların Filogenetik Ağacı	51
Şekil 4.3 BSA Standart Grafik.....	52
Şekil 4.4 A: Kültür Filtratı SDS-PAGE Profili; B: Total Protein SDS-PAGE Profili	53
Şekil 4.5 Kültür Filtratlarının Sitotoksik Aktivitesi.....	56
Şekil 4.6 Proteinlerin Sitotoksik Aktivitesi	56
Şekil 4.7 Kültür Filtratlarının Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi	59
Şekil 4.8 Proteinlerin Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi	59
Şekil 4.9 Kültür Filtratlarının Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
Şekil 4.10 Proteinlerin Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	61
Şekil 4.11 Kültür Filtratlarının Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi	62
Şekil 4.12 Proteinlerin Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi	63
Şekil 4.13 Kültür Filtratlarının % Apoptotik ve Nekrotik Hücre Populasyonu Üzerine Etkisi	65
Şekil 4.14 Proteinlerin % Apoptotik ve Nekrotik Hücre Populasyonu Üzerine Etkisi	66
Şekil 4.15 <i>K. pneumoniae</i> 'ye (FNK1) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının <i>APC</i> , <i>SMAD</i> , <i>TP53</i> ve <i>KRAS</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	67

Şekil 4.16 <i>K. pneumoniae</i> 'ye (FNK2) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının <i>APC, SMAD, TP53</i> ve <i>KRAS</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	68
Şekil 4.17 <i>K. pneumoniae</i> 'ye (FNK3) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının <i>APC, SMAD, TP53</i> ve <i>KRAS</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	68
Şekil 4.18 <i>E. coli</i> 'ye (FNK4) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının <i>APC, SMAD,</i> <i>TP53</i> ve <i>KRAS</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi	69
Şekil 4.19 <i>A. baumannii</i> 'ye (FNK5) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının <i>APC,</i> <i>SMAD, TP53</i> ve <i>KRAS</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi	69



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Kolorektal Kanser Evreleri	18
Çizelge 3.1 Sarf Malzemeler ve Kitler.....	31
Çizelge 3.2 Cihazlar.....	31
Çizelge 3.3 qRT-PCR’da Kullanılan Primerler	48
Çizelge 4.1 İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	49
Çizelge 4.2 İzolatların Sekans Analiz Sonuçları.....	51
Çizelge 4.3 Total Protein Konsantrasyonları	53



1. GİRİŞ

1.1 Kanser Biyolojisi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesiyle karakterize edilmiş, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır. Hücrelerin düzensiz proliferasyonu, tümör oluşumunu tetiklemekte ve anormal hücre topluluklarının birikmesine neden olmaktadır. Eğer bir tümör hücresi kendini çevreleyen diğer dokuları istila ederse malign olarak, etmezse benign tümör olarak adlandırılır. Metastaz sürecinde ise, malign tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılarak, sekonder tümörleri oluştururlar. Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz mekanizması bozulur veya inaktif hale gelirse kanser oluşumu da kaçınılmaz olmaktadır (Pavlopoulou *et al.* 2015). Kanser hücreleri köken aldıkları hücre ve doku tipine göre sınıflandırılmaktadır. Epitel hücre kanserleri, “karsinoma”; bağ doku, yumuşak doku ve destek doku kanserleri, “sarkoma”; sindirim sistemi kaynaklılar, “gastrointestinal stromal tümörler”; immün sistem ve hemopoietik kaynaklı kanserler, “hematolojik malignansiler (lösemi)” ve pluripotent hücrelerden (testis ve yumurtalık gibi) köken alanlar ise “germ hücreli tümörler” olarak adlandırılmaktadır (Varricchio 2004).

Kromozomlar üzerinde sıkı bir şekilde paketlenmiş olan genler, vücuttaki hücrelerin tamamının kontrolünü sağladığı için, hücrede kontrolsüz çoğalma olarak bilinen kanser de temel olarak genlerle ilişkilendirilebilir. Genlerde meydana gelecek herhangi bir fiziksel ya da kimyasal değişiklik, doğrudan genin işlevini veya genin ürünü olan proteinin eksik veya hatalı bir şekilde üretilmesini ve böylelikle gen ürünü olan protein ile ilişkili hücresel işlevlerin bozulmasına neden olmaktadır. Genin işlevini değiştiren bir başka durum ise, genin yapısını değiştirmeden işlevinin değişmesine neden olan asetilasyon, deasetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, vb. gibi epigenetik modifikasyonlardır (Blackadar 2016).

Kanser oluşumunda üç büyük gen grubu rol oynamaktadır. Bunlar, tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamir genleridir.

1. GİRİŞ

Tümör baskılayıcı genler, hücrenin çoğalmasını ve bölünmesini kontrol eden, hücre döngüsünde görev alan, hücrenin hasar aldığı durumlarda DNA tamir mekanizmasını başlatan ve tamir mekanizmasının başarısız olduğu zamanlarda apoptozu tetikleyen gen grubunu oluşturmaktadır. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen *TP53* genidir. *TP53* genindeki fosforillenme, delesyon, insersiyon, mitotik rekombinasyon, mutasyon ve ubikinitasyon gibi değişiklikler, genin işlevinin bozulmasına yol açarak, hücre döngüsü kontrolünün kaybolmasına ve karsinogeneze neden olabilmektedir.

Onkogenler, sağlıklı bir organizmada hücre büyümesi ve proliferasyonundan sorumlu olan, gen ekspresyonunda, mRNA stabilitesinin sağlanmasında, translasyonda ve protein stabilizasyonunun düzenlenmesinde görev alan proto-onkogenler olarak bulunmaktadır. Proto-onkogenlerde meydana gelecek mutasyonlar, translokasyonlar, gen duplikasyonları, epigenetik değişiklikler ve kromozomal yeniden düzenlemeler nedeniyle, bu genler onkogenlere dönüşmekte ve karsinogenez sürecini başlatmaktadır. En iyi bilinen onkogenlere örnek RAS onkogenidir.

DNA tamir genleri ise, hücre döngüsünde görev yapan ve DNA hasara uğradığında tamir için gerekli proteinleri o bölgeye çekerek, genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışan gen grubunu oluşturmaktadır. Tamir mekanizmasının başarısız olması durumunda ise, hücrenin apoptoz veya nekroz ile yok edilmesini sağlamaktır. En iyi bilinen DNA tamir genine örnek, BRCA (breast cancer) genidir (Baykara 2016).

1.2 Apoptoz, Otofaji ve Nekroz

Biyolojik süreçlerde hücrenin döngü mekanizmalarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Hücre döngüsünde yaşanan bir aksaklık hücrede kontrolsüz çoğalmalara veya kontrollü hücre ölümlerine neden olmaktadır. Kontrollü hücre ölümlerinin en önemlisi olarak bilinen apoptoz, genlerle kontrol edilen, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, kişinin yaşamı boyunca hücre sayısının homeostatik dengesinin devamlılığını sağlayan bir süreçtir. Bu dengenin sağlanması için milyonlarca hücre apoptoza uğramakta, diğer bir deyişle homeostasis gereği her bir mitoz, bir apoptoz olayı ile dengelenmektedir (Maiuri *et al.* 2007).

1. GİRİŞ

Apoptoz; normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin uygun bir şekilde gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasalla indüklenmiş hücre ölümü gibi çeşitli işlemler için hayati bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Apoptoz mekanizmasının yanlış işlemesi, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve diğer pek çok kanser türünün ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Elmore 2007). Hücrenel bir süreç olan apoptozun erken evresinde, biyokimyasal olarak, kromozomal DNA fragmantasyonu, fosfotidilserin lokasyonunda değişiklik ve spesifik proteoliz ile hücre içi substrat parçalanması gerçekleşmektedir. Bunun sonucu olarak da hücre büzülerek boyut olarak küçülmekte, membran asimetrisi kaybolarak sitoplazma yoğunlaşmakta, organeller daha sıkı bir şekilde paketlenmekte ve kromatin kondensasyonundan sonra piknoz meydana gelmektedir (Ouyang *et al.* 2012). Apoptotik cisimler fagosite edildikten sonra intersitisyel dokuya hücrenel bileşenlerini salamadıkları için hiçbir inflamatuvar reaksiyona neden olmamaktadırlar (Elmore 2007).

Apoptozun düzenlenmesinde temel olarak kaspazlar (cystein dependent aspartate specific protease) rol oynamaktadır. Kaspazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasiti bulunduran ve proteinleri aspartik asit rezidülerinden kesen proteazlardır. Apoptoz başlatıcılar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), apoptozu yürütenler (kaspaz 3, 6 ve 7) ve sitokin aktivasyonu yapanlar (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12 ve 14) gibi farklı kaspaz türleri mevcuttur. Kaspazların yanısıra kalsiyum, Bcl-2 ailesi, sitokrom-c, p53 gibi proteinler ile mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organeller de bu süreçte rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi antiapoptotikler (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A-2), apoptotikler (Bax, Bak, Bak/Mtd, Bcl-xs, Puma, Noxa) ve regülatörler (Bad, Bim, Bid, Bmf, Hrk) olmak üzere kendi içerisinde üç gruba ayrılmaktadır.

Antiapoptotik proteinler, mitokondrinin dış membranında, nükleus membranında ve endoplazmik retikulumda bulunurlar ve iyon transportunda görev alırlar. Özellikle hücredeki kalsiyum iyonunun oranını kontrol eden pro-kaspazlar, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c salınımını engelleyerek apoptozu inhibe ederler. Apoptotik ve regülatör Bcl-2 ailesine ait proteinler, sitozolde bulunmaktadır ve bunlar sitokrom-c ve AIF salınımını artırarak apoptozu tetiklemektedir (Adrain and Martin 2001; Spierings *et al.* 2004).

1. GİRİŞ

Apoptoz iki yolla meydana gelmektedir:

1. İntrinsik (mitokondriyal sinyal yolu) apoptoz yolağı,

2. Ekstrinsik (TNF α : tümör nekroz faktörü, TRAIL; TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand ve Fas aracılığı ile) apoptoz yolağı (Nikoletopoulou *et al.* 2013).

İntrinsik apoptoz yolağı; hücre içi sinyaller (DNA hasarı, hücre içi Ca⁺⁺ düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları, UV, kemoterapi, hipoksi gibi hücre içinde strese neden olan etkenler ile hücre içinde yaşayan biyotik etmenler (virüsler)) ile aktive olmakta ve ilk etapta mitokondrideki zar potansiyeli değişmektedir. Gelen bu uyarılara bağlı olarak, regülatör proteinlerden Bid, antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktif hale, apoptotiklerden Bax ve Bak'ı aktif hale getirmektedir. Aktifleşen apoptotik proteinler, mitokondri membranında por oluşumunu tetiklemekte; mitokondride bulunan Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase), Endonükleaz G (Endo-G), kalsiyum, AIF ve sitokrom-c porlardan sitoplazmaya salınmaktadır. Smac, IAF'ı inhibe ederek, apoptozu hızlandırmaktadır. IAF'ın ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve 8'i inaktif hale getirmektedir. Endo-G ise, DNA'yı fragmentlere ayırarak, hücreyi apoptoza götürmektedir. Mitokondriden salınan sitokrom-c, apoptosis protease activating factor- 1 (Apaf-1) ve prokaspaz 9 ile birlikte apoptozom kompleksini oluşturmakta; apoptozom kompleksi, kaspaz 9'u uyarıp, kaspaz 3'ü aktifleştirerek, kaspazla aktifleşen DNaz inhibitör (ICAD) ve kaspazla aktifleşen DNaz (CAD) kompleksindeki ICAD'ı degrade ederek, CAD'ın aktifleşmesini sağlamaktadır. Böylelikle serbest hale geçen CAD, DNA'yı internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti uzunluğunda parçalara ayırarak (DNA fragmentasyonu), hücreyi apoptoza götürmektedir (Wang and Youle 2009).

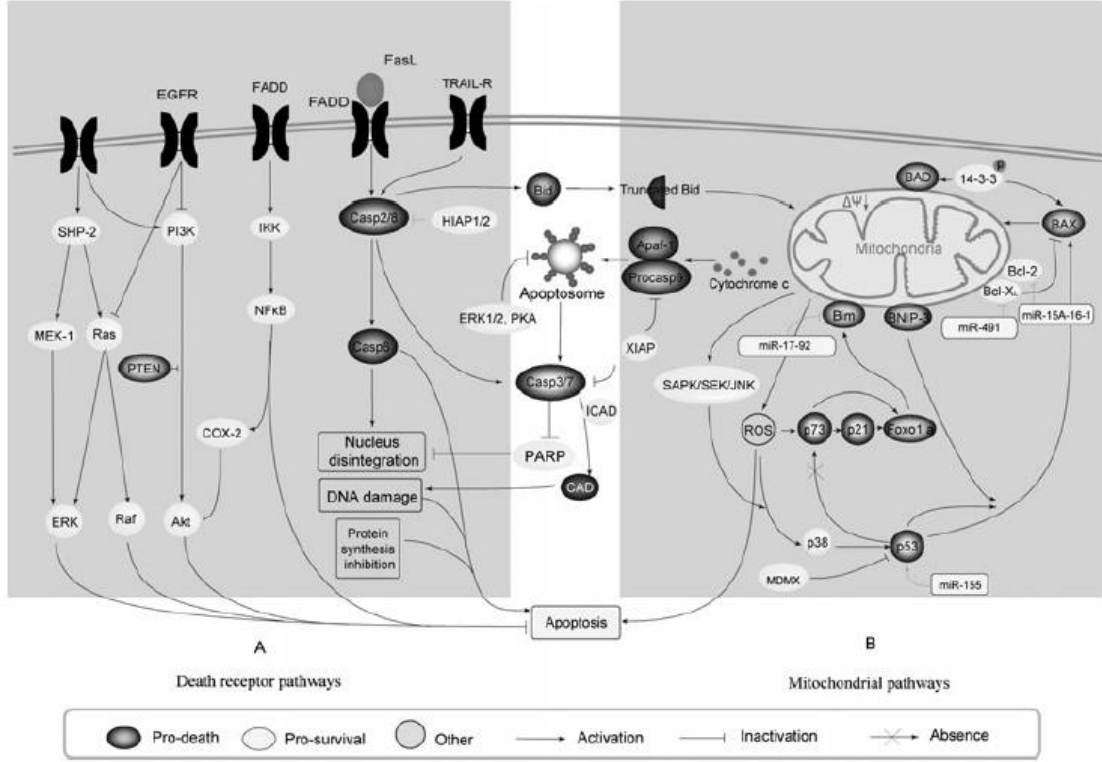
Ekstrinsik apoptoz yolağı, hücre dışı sinyaller (büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)) ile tetiklenmekte ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatılmaktadır. Tümör nekrosiz faktör reseptörü (TNF-R1), fas ligand reseptörü (FLR), ölüm reseptörü (DR3), TRAIL-R1/2 (DR4/5) ve DR6'yı içeren ölüm reseptörleri, ekstrinsik apoptoz yolağını başlatabilmektedir (Sayers 2011). Bu

1. GİRİŞ

reseptörlere uygun ligandların bağlanması ile reseptörler trimerik yapı kazanmakta ve böylelikle kaspaz aracılığı ile hücre ölümü başlatılmış olmaktadır. Fas ligandı FLR'ye bağlandığında FADD (fas-associated death domain) ile birlikte; TNF α , TNFR'ye bağlandığında TRADD (tumor necrosis factor receptor associated death domain) ile birlikte trimerik hale gelmekte ve ardından prokaspazlarla birleşerek DISC (death inducing signaling complex) kompleksi oluşumuna neden olmaktadır. Kompleks oluşumundan sonra prokaspaz 8, aktif kaspaz 8 haline gelmekte ve aktifleşen kaspaz 8, doğrudan prokaspaz 7'yi, aktif kaspaz 7 haline getirdikten sonra apoptoza götürebilmektedir. Bunun yanında aktif kaspaz 7, kaspaz 3'ü aktif hale getirerek ya da intrinsik apoptoz yolağındaki Bid'i keserek kaspaz 9 aracılığıyla yine kaspaz 3 üzerinden, CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olarak da hücreyi apoptoza götürmektedir (Ouyang *et al.* 2012). Bunun yanında, perforin/granzim yolu, granzim B ya da granzim A aracılığı ile apoptoza başlatabilmektedir. Bu yolak, patojenlerle enfekte edilmiş hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili olmaktadır. Sitotoksik T hücrelerinden sentezlenen perforinler, hedef hücre üzerinde por oluşumuna neden olur. Oluşan porlar, hücre içerisine çok hızlı bir şekilde kalsiyum girişine neden olmaktadır. Hücre içerisine giren perforinler, veziküllerden granzim B'nin serbest kalmasına neden olmakta ve hücreyi aktif hale gelen kaspaz 3 aracılığıyla, DNA fragmentasyonu yoluyla apoptoza götürmektedir. Granzim A'da apoptoza uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden sitotoksik T hücrelerinde rol oynamaktadır (Fan *et al.* 2003). Apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan bir başka protein ise p53'tür. DNA hasarı tamir edilemediği zaman, Bax, Noxa ve Puma'yi aktifleştirip, Bcl-2 ve Bcl-xl'yi baskılayarak hücreyi apoptoza götürmektedir. Apoptotik hücrelerin tanınmasında kullanılan bir diğer belirteç de hücre membranında bulunan fosfatidilserin lokasyonudur. Sağlıklı hücrelerde iç membran üzerinde bulunurken, apoptotik hücrelerde dış membranda yer almaktadır.

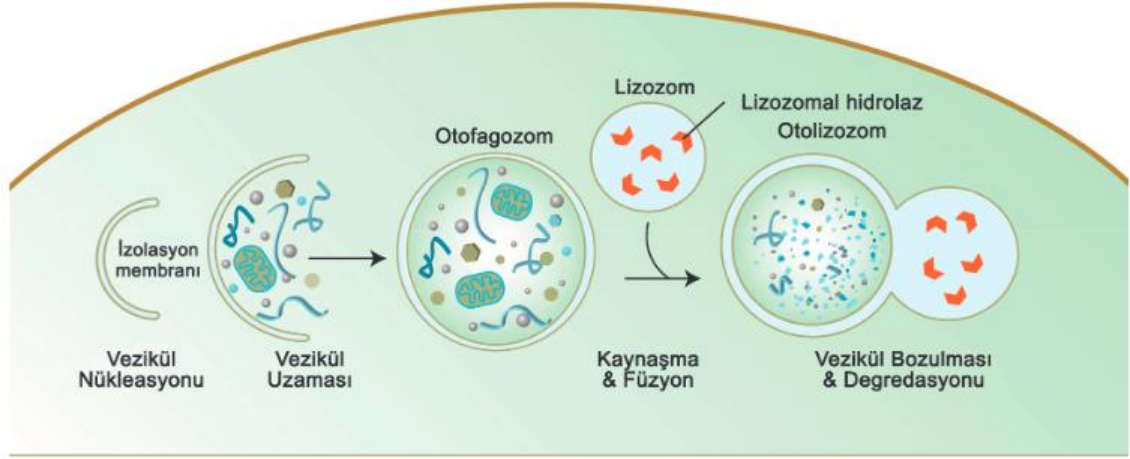
Apoptozda, iyi bilinmeyen ve intrinsik endoplazmik retikulum yolu olarak adlandırılan bir başka yol daha bulunmaktadır. Hipoksi, serbest radikaller veya glikoz açlığı gibi hücresel streslerin bir sonucu olarak, ER zarar görmekte ve yanlış katlanmış proteinlerin oluşumu ile kalsiyum iyonu sitozole salınmaktadır. Kalsiyum iyonları, kaspaz 9'u aktifleştirip kaspaz 3 üzerinden DNA fragmentasyonu aracılığıyla hücreyi apoptoza götürmektedir (Wong 2011).

1. GİRİŞ



Şekil 1.1 Apoptoz Yolağı (Ouyang *et al.* 2012)

Otofajik hücre ölümü, hücrel adaptasyon ve yaşamın devamlılığı için önemli olmakla birlikte, açlık, radyasyon, kemoterapötik ajanlar ve stres koşulları altında, hücrenin kendini yemesi olarak tanımlanmaktadır. Otofaji, hücredeki besin ve enerji ihtiyacı doğrultusunda hızlı bir şekilde aktive edilmektedir. İlk olarak, hücredeki hedef bölgenin etrafında bir membran oluşturulmaktadır. Otofagozom adı verilen çift katlı membranlar, hedef bölgenin içeriğini sitozoldeki diğer kısımlardan ayırmakta, oluşturulan vezikül, lizozom ile kaynaşmakta ve vezikül içeriği lizozomdaki asit hidrolaz enzimleri aracılığı ile degrede edilerek sitoplazmaya salınmaktadır. Böylelikle anabolik ve katabolik hücrel fonksiyonlar dengelenmekte, istenmeyen organeller ortadan kaldırılmaktadır (Yoshida 2017). Otofaji olayında, kromatin kondensasyonu gözlenmekte ancak DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisim oluşumu görülmemektedir.



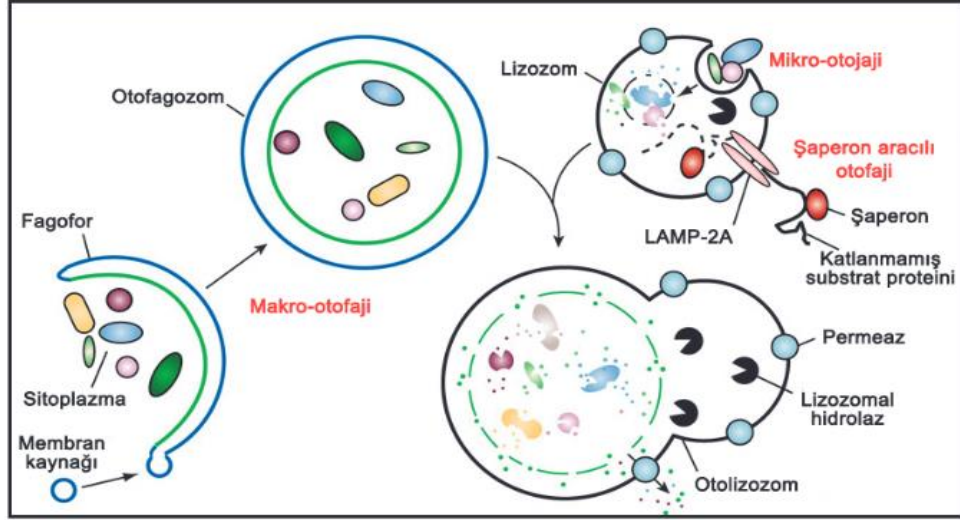
Şekil 1.2. Otofajinin Aşamaları (Karada 2016)

Otofaji üç farklı şekilde meydana gelebilmektedir:

1. Mikro otofaji: Lizozom içerisine hedef molekülün doğrudan alınıp, degrades edilmesiyle meydana gelmektedir.

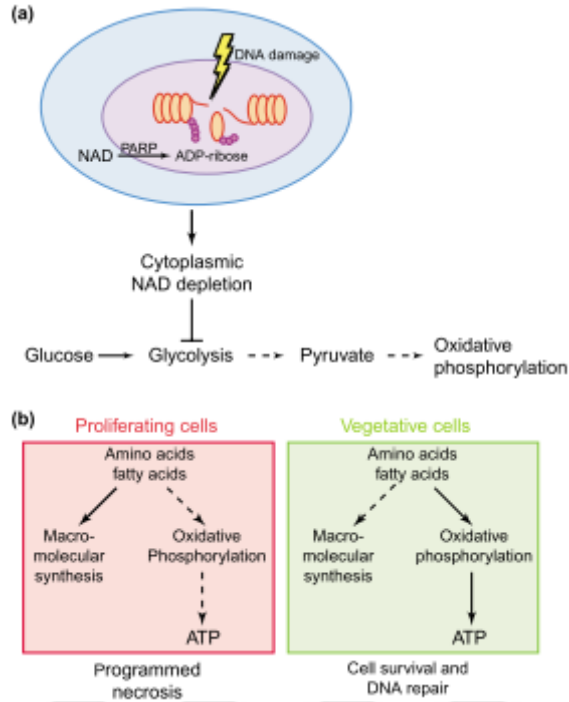
2. Makro otofaji: Daha büyük parçacıkların, organellerin veya proteinlerin, otofagozom içerisine alınıp lizozom ile birleştirildikten sonra degrades edilmesiyle gerçekleşmektedir.

3. Şaperon aracılı otofaji: Hedef molekül bir vezikül ile çevrilmemekte, bunun yerine taşıdığı bir peptid sekansı Hsp73 tarafından tanınıp, lizozomlara taşınmaktadır (Öz Arslan *et al.* 2011).



Şekil 1.3 Otofajinin Farklı Tipleri (Mizushima *et al.* 2008)

Nekroz; rastgele gelişen, stres, hipoksi, toksik maddeler ve ağır metaller nedeniyle ortaya çıkan, genler tarafından kontrol edilemeyen, düzensiz bir süreçtir. Nekroz sırasında hücrelerde şişme, kromatin parçalanması ve kümelenmesi, organel ve plazma membranlarında hasar ve liziz, membran asimetrisinde bozulma ve inflamasyon gözlenmektedir. Bunun yanında, mitokondride reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artmakta, ATP üretimi azalmakta ve kalsiyum kanalları açılmaktadır (Nicotera and Melino 2004; Karada 2016). Nekroz, dışardan gelen çeşitli uyarılar (fiziksel, kimyasal) aracılığıyla başlatılmakta ve ilk aşamada hücrenin iyon dengesi bozulmaktadır. İyon dengesinin bozulması, hücredeki NAD^{+} 'ın nükleer enzim poli ADP-riboz polimeraz (PARP) tarafından indirgenmesine neden olmaktadır. Bu durumda ATP eksikliği ortaya çıkmakta, iyon yetersizliği sonucu hücre sıvı almakta, organeller şişmekte ve ozmotik basınç nedeniyle patlamaktadır. Hücre içeriği tamamen hücreler arası boşluğa salınmakta ve bunun sonucu olarak inflamasyon meydana gelmektedir (Edinger and Thompson 2004).



Şekil 1.4 Nekroz Oluşum Mekanizması (Edinger and Thompson 2004)

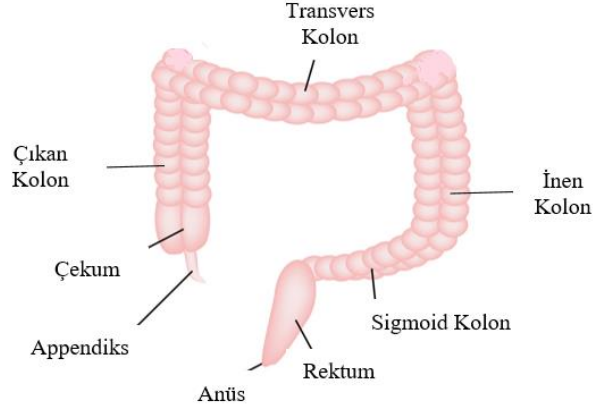
1.3 Kolon Yapısı

Gastrointestinal sisteminin 1-1.5 metre terminali, kolon olarak adlandırılmaktadır. Sırasıyla, çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve en sonda rektum bulunmaktadır (Şekil 1.5.).

Çekum, kalın barsağın ilk bölümüdür; 7.5-8.5 cm çapa sahip en geniş kısmıdır. Sigmoid kolona doğru ilerledikçe, kolon çapı daralır (2.5 cm). Buna bağlı olarak, çekum tümörleri daha büyük olduklarında semptomatik özellik gösterirken, sigmoid kolon tümörleri daha küçükken semptomatik özellik gösterirler. Çekumun ucunda, uzunluğu yaklaşık 9 cm olan, tübüler bir yapı ile sonlanan appendiks bulunmaktadır. Çıkan kolon, çekumdan başlayıp yukarı yönde karaciğer sağ lobuna kadar yükselmekte ve transvers kolon ile devam etmektedir. Ortalama uzunluğu 20 cm'dir. Transvers kolon, yaklaşık 50 cm uzunluğundadır. Karnı sağdan sola geçerek, dalak önünde sol kolon köşesini oluşturup aşağı yönde devam etmektedir. İnen kolon, yaklaşık 25cm'lik kısmı oluşturmakta ve sigmoid kolon ile devam etmektedir. Sigmoid kolon, ortalama 40 cm uzunluğundadır ve inen kolonun devamını oluşturmaktadır. Sigmoid kolondan sonra gelen bölüm rektumu oluşturmaktadır. Rektumun alt kısmında dışarı atılacak

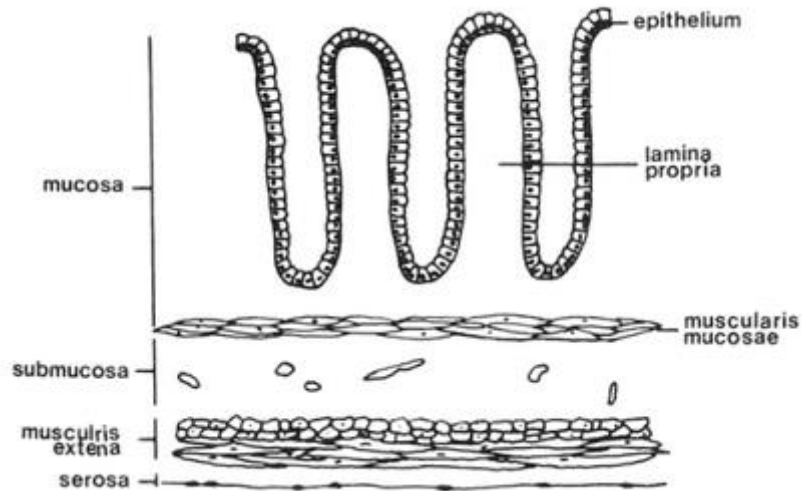
1. GİRİŞ

maddelerin toplandığı “ampulla recti” bulunmaktadır. Kas tabakası çok gelişmiştir ve rektumun dışarı açılan kısmı ise anüsü oluşturmaktadır (Levine and Haggitt 1989).



Şekil 1.5 Sindirim Sistemi (Bustos-Fernández 2013)

Gastrointestinal sistem bazı genel yapısal özelliklere sahiptir. Bunlardan en önemlisi olan lümen, gastrointestinal sistemin içerisinde kanal şeklinde bulunmakta ve 4 farklı tabakadan (içten dışa doğru sırasıyla; mukoza, submukoza kas tabakası ve seroza) oluşan bir duvar ile çevrili bulunmaktadır (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6 Lümen Yapısı (Bustos-Fernández 2013)

Kolon mukozası; yüzeyi ve kripleri kaplayan sütunlu epitelyum, lamina propria ve kas tabakası olan muskularis mukozadan oluşmaktadır. Konak ile lümen ortamı

arasında bir koruyucu olarak rol alan yüzey epitelyumu, emici hücreler ve goblet hücrelerinden oluşmaktadır. Emici hücreler kolonda iyon ve su taşınmasında aktif olarak rol oynamaktadır. Goblet hücreleri ise, mukoza granüllerinin sentezinden, salgılanmasından ve depolanmasından sorumludur. Lamina propria, kan ve lenf damarları açısından zengin bir bağ dokudan oluşmaktadır. Burada bulunan hücreler çoğunlukla konak savunmasında aktif olarak görev yapmaktadır. Lamina propriada, plazma hücreleri (B lenfositler) bulunmaktadır. Eozinofiller, mast hücreleri, miyeloid hücreler, makrofajlar ve fibroblastlar da normal olarak bu kısımda yer almaktadır. Muskulus mukoza ise, kaslardan oluşan, mukozayı submukozadan ayıran bir yapıdır. Mukoza aynı zamanda mukoz membran olarak da adlandırılmaktadır. Submukoza da tıpkı lamina propria gibi kan ve lenf damarları açısından zengin, gevşek bir bağ dokusudur. Ek olarak bir sinir pleksusu (Meissner) içermektedir. Seroza ise, kan, lenf ve yağ dokusu açısından zengin, ince ve gevşek bir bağ doku ile örtülü bulunmaktadır (Levine and Haggitt 1989).

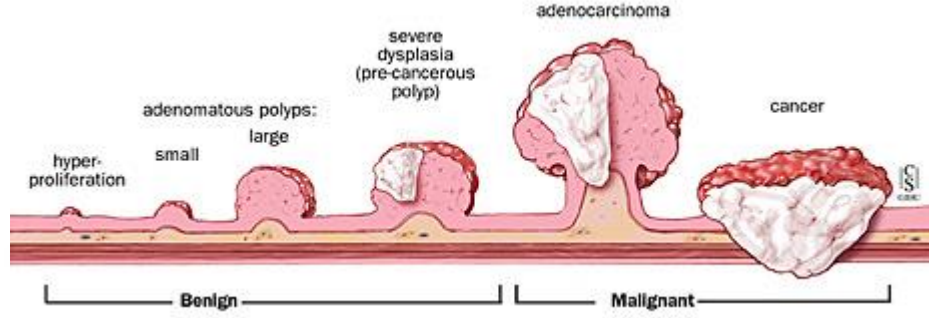
1.4 Kolorektal Kanser ve Moleküler Oluşum Yolağı

Kolorektal kanser ve kanserle ilişkili ölümlerin, dünya genelindeki insidansı hızla artmaktadır (Uhry *et al.* 2013). Kolorektal kanser kadınlarda, akciğer ve meme kanserinden sonraki üçüncü, erkeklerde ise, akciğer ve prostat kanserinden sonraki dördüncü ölüm sebebidir (Antonic *et al.* 2013).

Kolon ve rektumdaki kanserler farklı tiptedirler. Karsinoid tümörler, özelleşmiş hormon üreten hücrelerden gelişirken; gastrointestinal stromal tümörler, kaja adı verilen kolon hücre duvarında bulunan özelleşmiş hücrelerden gelişmektedir. Bu tip tümörler, sindirim sisteminin herhangi bir yerinde bulunabilir ve benign veya malignant özellik gösterebilmektedir. Lenfomalar genellikle lenf nodüllerinde oluşmakta ancak kolonda oluşan türlerinin de mevcut olduğu bilinmektedir. Sarkomalar ise, kemik ve yumuşak dokudan kaynaklanan; ilk olarak kan vesiküllerinde, bağ dokuda ve kolon ve rektum dokusunun hücre duvarında oluşmaktadır. Sarkomalara, kolon ve rektum dokusunda oldukça nadir rastlanmaktadır (Wu *et al.* 2003).

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser ilk olarak, kolon ve rektumun epitel hücrelerinde gelişme göstermektedir. İlk aşama polip oluşumudur. Oluşan polipler pek çok kolorektal kanser için prekürsör olarak kabul edilmektedir. Tümör dokusu invaziv hale geldikten sonra epitel dokunun bazal laminasını geçerek, kas dokuya doğru yayılmakta ve son olarak lenf nodüllerine, karaciğere ve diğer dokulara metastaz yapmaktadır (Wu *et al.* 2003).



Şekil 1.7 Polipten Kanser Gelişimi (Thrumurthy *et al.* 2016)

Kolorektal kanser, kalıtsal (genetik instabilite), inflamatuvar (inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili) veya sporadik olmak üzere 3 temel sınıfa ayrılabilir. Kolorektal kanserlerin %80'den fazlasının sporadik olarak meydana geldiği; %15'inin ise kalıtsal olduğu bilinmektedir (Wu *et al.* 2003).

Kalıtsal kolorektal kanserlerin, genlerdeki mutasyonlar sonucu oluştuğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Herediter non-polyposis kolorektal kanser (HNPCC) ve Ailesel adenomatöz polipozis koli (FAP)'nin bu grupta yer aldığı ve otozomal dominant olarak kalıtıldığı bilinmektedir. HNPCC oluşumunda Lynch I sendromu (Otozomal dominant kalıtım ve erken kanser başlangıcı göstermektedir) ve Lynch II sendromu (Lynch I ile benzer özelliklerin yanında, kolon dışı kanserlere (meme, endometriyum, over ve mide vb.) eğilim göstermektedir) olmak üzere iki sendrom görülmektedir. Bunun yanısıra HNPCC'nin tanımlanabilmesi için Amsterdam kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterlere göre; bir ailedeki en az üç bireyde kolorektal kanser görülmeli; bu üç aile üyesi birbiriyle birinci dereceden akraba olmalı ve en az birisinde 50 yaşından önce kolorektal kanser gelişimi görülmelidir. Aynı ailede en az üst üste iki nesil boyunca kolorektal kanserli bireyler bulunmalı ve kanser oluşumu patolojik olarak net bir şekilde doğrulanmalıdır. HNPCC'nin FAP ile karşılaştırıldığında toplumda beş kat daha fazla görüldüğü ve sporadik kanserli hastalarla kıyaslandığında ise daha genç

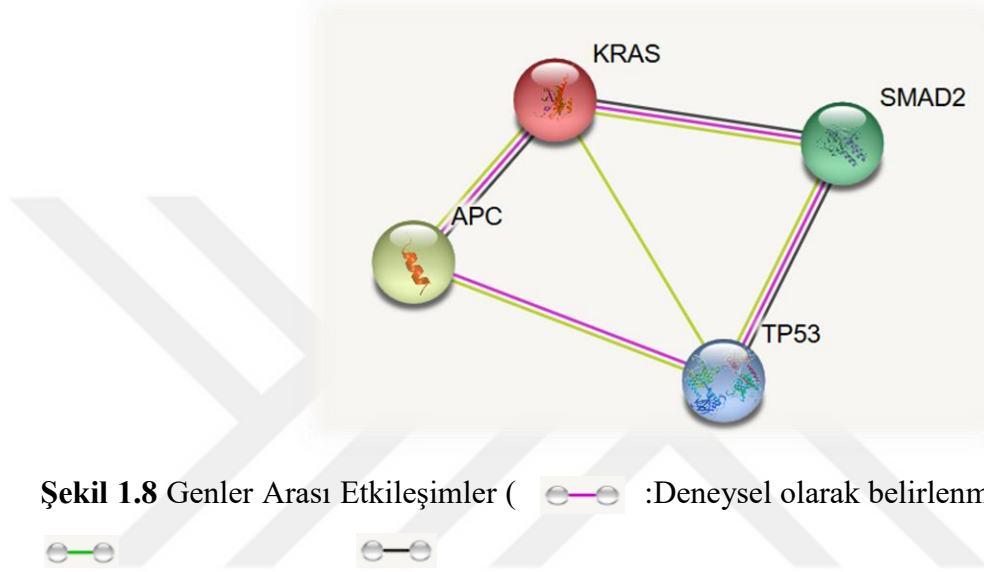
1. GİRİŞ



yaşlarda ortaya çıktığı görülmektedir. FAP ise *APC* (adenomatous polyposis coli) genindeki bir mutasyon sonucu ortaya çıkmakta ve polip oluşumu ile karakterize edilmektedir. Genellikle yirmili yaşlarda görülmektedir. Hastadaki birkaç polip oluşumu FAP hastalığını göstermemekle birlikte, FAP'tan söz edebilmek için en az 100 polip varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu iki genetik hastalığın yanı sıra; Muir-Torre Sendromu, Gardner Sendromu, Turcot Sendromu, Peutz-Jeghers Sendromu ve Cowden Sendromu kolorektal kanserin gelişim gösterdiği genetik temelli hastalıklara örnek oluşturmaktadır (Fenoglio-Preiser *et al.* 1999).

Kronik inflamasyonun, tüm insan kanserlerinin yaklaşık beşte birinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Çevresel hasarlar, diyet, kalıtsal gen polimorfizmleri, enfeksiyonlar ve bağışıklık sistemindeki disfonksiyonlar veya bunların kombinasyonları sonucu ortaya çıkan kronik iltihaplanma, bağışıklık sisteminin vücudu bu tip zararlı uyaranları ortadan kaldırmaya yönelik bir girişimi olarak başlamaktadır. Ancak bu doku yıkımının kronik hale gelmesi ve doku hasarı, karsinogenez olayının başlayıp devamlı hale gelmesine sebep olmaktadır. Bağırsak iltihabının, inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) oluşmasından (Ülseratif kolit ve Chron hastalığı) ve Çölyak hastalığının oluşumundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Uzun süredir devam eden bağırsak iltihabının kolorektal kanser ve ince bağırsak adenokarsinomlarının yanı sıra lenfoma ve otoimmün hastalıklar ile ilişkili olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Westbrook *et al.* 2016). Kolorektal kanser gelişiminin inflamasyon aracılı patogenezindeki ilk basamak kronik inflamasyon ve rejenerasyondur. Rejenerasyon aktivitesindeki süreklilik hiperplastik (hücre sayısının aşırı artışı) doku oluşumuna, devamında ise neoplastik (tümör özelliğine sahip) doku gelişimi ile benign özellikli adenoma oluşumuna neden olmaktadır. Adenoma (salgı bezi yapısında olan veya salgı bezinden gelişen benign özellikli epitelyal tümörler) oluşumu sonucunda ise displazi meydana gelmekte ve bu olgu kolorektal kanser gelişimi ile noktalanmaktadır (Matkowskyj *et al.* 2013). Sporadik kolorektal kanser oluşumunda görülen, *APC* gen mutasyonları, anöploidi, DNA metilasyonu, mikrosatellit kararsızlığı, *KRAS* onkogen aktivasyonu, *DCC* tümör supresör gen mutasyonları ve *p53* fonksiyon kaybı İBH oluşumunda da görülmekte ancak kronik iltihaplanma bu değişikliklerin sırasını ve oluşum sürelerini etkilemektedir (Axelrad *et al.* 2016).

1. GİRİŞ

Sporadik kolorektal kanserler, %85 oranında kromozomal kararsızlık ve %15 oranında ise mikrosatellit kararsızlığından kaynaklanmaktadır. Kromozomal kararsızlık kromozomların anormal bir şekilde segregasyonuna ve dolayısıyla anöplidi oluşumuna neden olmaktadır. Önceki paragrafta anlatılan gen mutasyonları ise sporadik kanserlerde sıklıkla görülen mutasyonlara ve işlev kayıplarına örnek oluşturmaktadır (Matkowskyj *et al.* 2013).



Şekil 1.8 Genler Arası Etkileşimler ( : Komşu gen,  : Ko-ekspresyon) (Szkarczyk *et al.* 2017)

Şekil 1.10'da tez çalışmasında ekspresyon seviyelerine bakılan 4 farklı genin birbiri ile olan ilişkisi gösterilmiştir. Kolorektal kanserin oluşumunda rol oynayan genlerden biri olan *APC* geni, bir tümör süpresör gendir ve 5. kromozomun uzun kolunun 21. segmentinde yer almaktadır (5q21). 15 ekzona sahiptir ve 310 kDa'lık bir protein üretmektedir. *APC* geni ayrıca hücre döngüsünün kontrolü, mikrotübül ve kromozom stabilizasyonu için çok önemlidir. Genin ürünü olan sitoplazmik APC proteini, β -katenin regülasyonundan ve epitel hücresinin homeostasisinin düzenlenmesinden sorumludur. β -kateninin sitoplazmada kadherinler gibi transmembran hücre yüzey adhezyon molekülleri ile bağlantı içerisinde olduğu bilinmektedir. Wnt sinyal yolağında görev yapan APC proteini, sitoplazmada serbest halde bulunan ve serin- threonin kinazlar tarafından fosforillenmiş olan β -katenini degrade ederek, hücre içerisindeki molekül seviyesini düşük düzeyde tutmaktadır. Mutasyon veya promoter bölgesinin metilasyonu sonucu *APC* geninde bir fonksiyon kaybı olduğu zaman, sitoplazmik β -katenin birikmekte ve β -kateninin nukleusa giderek

1. GİRİŞ

MYC geninin transkripsiyon faktörlerine veya T-cell factor /lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) ailesinin transkripsiyon faktörlerine bağlandığı, TCF4 aktivasyonunu sağladığı ve kolonik epitel hücrelerdeki büyümeyi teşvik ederek, TCF4 kaybı ile bağırsak kök hücre popülasyonunda azalmaya yol açtığı bilinmektedir (Ulger Toprak *et al.* 2006; Compare and Nardone 2013) . *APC* geninin ürünü olan Adenomatous polipozis coli proteini; tümör süpresör özellik göstermekte, negatif bir düzenleyici olarak Wnt sinyalleşmesine katılmakta ve hücre korteksindeki mikrotübüllerin ERBB2'ye bağımlı stabilizasyonunda aracı olarak görev yapmaktadır. APC aktivitesi, fosforilasyon durumu ile ilişkili olmakla beraber hepatosit büyüme faktörü kaynaklı hücre göçünde de rol oynamaktadır. Aynı zamanda kolorektal tümör hücrelerinde JNK sinyal yolu ile MMP9 upregülasyonu için de gerekli olduğu bilinmektedir (Szklarczyk *et al.* 2017).

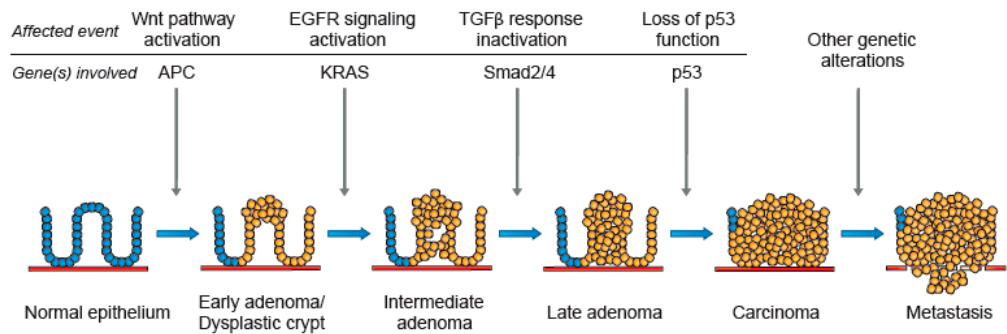
Kolon kanserlerinin %30'unda ise *SMAD2/4* gen mutasyonunun olduğu saptanmıştır. *SMAD2/4*, transforming growth factor β (TGF β) ile ilişkilidir. TGF β , epitel hücrelerdeki anti-proliferatif bir faktördür. Proliferasyon aşamasında, hücre siklusunu durdurmakta; farklılaşmayı indüklemekte ve SMAD sinyal yolağı aracılığıyla da apoptozu teşvik etmektedir. SMAD proteinleri, nukleusun hücre yüzeyine bağlanan TGF β ligandlarından gelen sinyali değiştirerek ve apoptozu tetikleyen genlerin transkripsiyonunu aktif hale getirerek etki göstermektedir. *SMAD2/4* mutasyona uğradığında, hücre proliferasyonu kontrol edilememekte ve tümör oluşumu meydana gelmektedir. *SMAD* geninin kolorektal kanserdeki anti-metastatik rolünün ne kadar önemli olduğu bilinmekle birlikte, *SMAD* genindeki ekspresyon kaybının, kolorektal kanserde, tümör oluşumunu artırdığı ve karaciğere metastaza yol açtığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2010; Samanta and Datta 2012). *SMAD* gen ürünü olan Smad proteini, TGF- β aracılığıyla, pek çok geninin promotör bölgesinde bulunan TRE bölgesine bağlanarak transkripsiyonu aktive etmektedir. *SMAD* geninin kolorektal karsinomada tümör süpresör olarak rol oynadığı bilinmektedir (Szklarczyk *et al.* 2017).

Kolorektal kanserle ilişkili diğer bir gen ise, *KRAS* (kirsten rat sarcoma) onkogenidir. *KRAS* geni, 21 kDa'luk bir protein kodlamaktadır. Bu protein, ekstrasellüler sinyaller tarafından aktif hale getirilmektedir. Adenomalı bir dokuda,

1. GİRİŞ

KRAS onkogeni aktif hale gelirse, adenoma tamamen büyüyebilir. *KRAS* aktivasyonundan sonra meydana gelen adenomalarda, 18. kromozomun uzun kolunda bulunan, tümör supresör gendeki “deleted in colorectal cancer” (*DCC*) mutasyon sonucu oluşan inaktivasyon, adenomanın tamamen ilerlemesine yol açmaktadır. Adenomanın karsinomaya dönüşmesine ise, 17. kromozom üzerinde bulunan *p53* tümör supresör geninin inaktif hale gelmesi neden olmaktadır. *p53* tümör supresör gen mutasyonları kolon kanserinde yaygın olarak görülmekte ve genellikle tümörigenez oluşum aşamasında meydana gelmektedir. Bu bağlamda *p53*, hasarlı DNA'ya sahip hücrelerdeki proliferasyonu sınırlamadan, *APC* ve *RAS* genlerindeki mutasyona bağlı olarak apoptozu indüklemektedir. Apoptoz süreci başlayıp adenomalar karsinomaya dönüştükten sonraki süreçlerde (tümör gelişiminin geç aşamalarında) *p53* geni inaktif hale getirilmektedir (Sinnott and Dunn 1950; de Leon and Roncucci 2000; Johnson and Lewis 2002; Rupnarain *et al.* 2004; Al- Sohaily *et al.* 2012). *KRAS* geninin ürünü olan *KRAS* proteinleri GDP / GTP'ye bağlanan ve GTPaz aktivitesine sahip bir protein grubunu oluşturmaktadır. Bu protein hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta, ZNF304'e bağlı kolorektal kanser (CRC) hücreleri, tümör supresör genlerin transkripsiyonel susturulmasını indükleyerek onkojenik olayların indüklenmesinde görev almaktadır. (Szklarczyk *et al.* 2017).

Hüresel tümör antijeni TP53; birçok tümör türünde bir tümör baskılayıcı görevi görmekte, fizyolojik koşullara ve hücre tipine bağlı olarak proliferasyonun durdurulmasını veya apoptozu tetiklemektedir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, bu işlem için gerekli olan bir dizi genin kontrol edilmesiyle hücre bölünmesini negatif olarak düzenlemeye yarayan bir aktiveleştirici olarak yer almaktadır (Szklarczyk *et al.* 2017).



Şekil 1.9 Kolorektal Kanser Gelişiminin Genetik Modeli (Davies *et al.* 2005)

Kolorektal kansere neden olan ve sporadik kolorektal kanserlerde sıklıkla görülen kromozomal kararsızlık, mikrosatellit kararsızlığı ve CpG adalarındaki epigenetik değişiklikler de kolorektal kanserde oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Tüm kromozom veya kromozom parçası kaybı veya kazanımı, bu yolakta sıklıkla görülmektedir. Mikrosatellitler, kısa nükleotit tekrarlarıdır ve tüm genoma dağılmış halde bulunmaktadır. İçerdikleri tekrarlardan dolayı, bazen replikasyonda hatalara yol açmaktadır. DNA replikasyonu boyunca, yanlış eşleşme onarım mekanizması (MMR, mismatch repair system), hataları tanıyıp yanlış eşleşen bazları onarmaktadır. Ancak mikrosatellit kararsızlığından dolayı, yapılan yanlışlar tespit edilip düzeltilememektedir. Kolorektal kanserde, CpG adalarının metilasyonu da tümör supresör genlerin sessizleşmesine neden olmakta ve kanser oluşumunu teşvik etmektedir (Al- Sohaily *et al.* 2012).

1.5 Kolorektal Kanseri Evreleri

Kolorektal kanserde, kanserin prognozunu etkileyen pek çok faktör yer almaktadır. Bağırsak duvarının kalınlığı, lenf nodüllerine metastaz ve uzak metastaz, kanserin seyrini olumsuz yönde değiştirmektedir. Kolorektal kanserin evrelendirilmesinde 3 farklı sistem kullanılmaktadır: Dukes Sistemi, Astler-Coller Sistemi ve American Joint Commite'nin TNM Sistemi'dir (Akkoca *et al.* 2014).

Dukes Sistemi:

Evre A: Tümör mukoza ile sınırlıdır.

Evre B: Tümör kolon duvarını, lamina propriayı aşmış ve rektuma invazyon yapmıştır, lenf nodüllerine metastaz yoktur.

Evre C: Tümör lenf nodüllerine metastaz yapar.

Astler- Coller Sistemi (Modifiye edilmiş Dukes Sistemi):

Evre A: Tümör mukoza ile sınırlıdır.

Evre B1: Tümör submukoza ile sınırlıdır, lenf nodüllerine metastaz yoktur.

Evre B2: Tümör kas dokusu ile sınırlıdır, lenf nodüllerine metastaz yoktur.

1. GİRİŞ

Evre C1: Tümör bağırsak duvarını aşamaz, lenf nodüllerine metastaz yapar.

Evre C2: Tümör bağırsak duvarını geçer, lenf nodüllerine metastaz yapar.

Evre D: Uzak organ metastazı vardır.

TNM Sistemi:

Primer (Birincil) tümör (T):

TX: Bilinmeyen primer tümör vardır.

T0: Primer tümör yoktur.

Tis: Karsinom *in situ* görülür.

T1: Tümör mukoza ve submukoza ile sınırlıdır.

T2: Tümör lamina propria ile sınırlıdır.

T3: Tümör tüm bağırsak duvarını tutmuştur.

T4: Tümör serozayı aşmış ve çevre dokulara metastaz yapmıştır.

Bölgesel Lenf Nodu (N):

NX: Bilinmeyen lenf nodu vardır

N0: Lenf nodunda metastaz yoktur.

N1: 1-3 lenf nodu tutulumu vardır.

N2: 4 veya daha fazla lenf nodu tutulumu vardır.

N3: Damar boyunca lenf nodu metastazı vardır.

Uzak Metastaz (M):

MX: Bilinmeyen uzak metastaz vardır.

M0: Uzak metastaz yoktur.

M1: Uzak metastaz vardır.

Çizelge 1.1 Kolorektal Kanseri Evreleri (Akkoca *et al.* 2014)

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0

1. GİRİŞ

Evre III	T4	N0	M0
	-	N1	M0
	-	N2	M0
Evre IV	-	-	M1

1.6 Kolorektal Kanseri Tedavisi

Kolorektal kanserin tedavisinde diğeri tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi kanserin hangi evrede olduğu oldukça önemlidir. Kanserin bulunduğu evrenin tespiti için, ilk olarak neoadjuvan (pre-operatif) veya adjuvan tedaviler (post-operatif) uygulanmaktadır. Hastalığın evresi göz önüne alınarak tedavide 4 farklı yaklaşım izlenmektedir. Bunlar: radyasyon terapisi, kemoterapi, cerrahi müdahale ve hedefe yönelik tedavilerdir. Neoadjuvan tedavi; cerrahi müdahale öncesi (radyoterapi, kemoterapi, kemoradyoterapi) tümör boyutunu küçültmek için kullanılmaktadır. Kanseri erken evrede ise, tümörlü dokunun cerrahi yöntem ile çıkarılması, en eski tedavi yöntemlerinden birini oluşturmaktadır. Tümörün morfolojik görünümüne bağlı olarak, eğer kanserin tekrar etme ihtimalinden şüpheleniliyorsa, radyasyon tedavisi ve/veya kemoterapi gibi yardımcı terapiler önerilmektedir. Radyasyon tedavisi, genellikle cerrahi yöntemler ile tümör dokusu çıkarıldıktan sonra, komşu dokularda kalan kalıntılardan tekrar kanserli hücrelerin büyümesini engellemek için kullanılmaktadır. Kemoterapi tedavisinde ise Fluorouracil (5-FU), bevacizumab, cetuximab, panitumumab, leucovorin, irinotekan ve oxaliplatin gibi ilaçlar sistemik etkiye sahip olduğu için kullanılmaktadır. Adjuvan tedavi ise cerrahi müdahale sonrası uygulanan yöntemlerdir. Bu tedavi yöntemi genellikle, cerrahi işlem sonrası kanser hücrelerinin metastazını önlemek ve kalan kanserli hücreleri öldürmek için kullanılmaktadır (Sauer *et al.* 2004). Neoadjuvan kemoradyoterapinin adjuvan tedavi ile kıyaslandığı zaman, rektal kanserlerde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Wolpin *et al.* 2007).

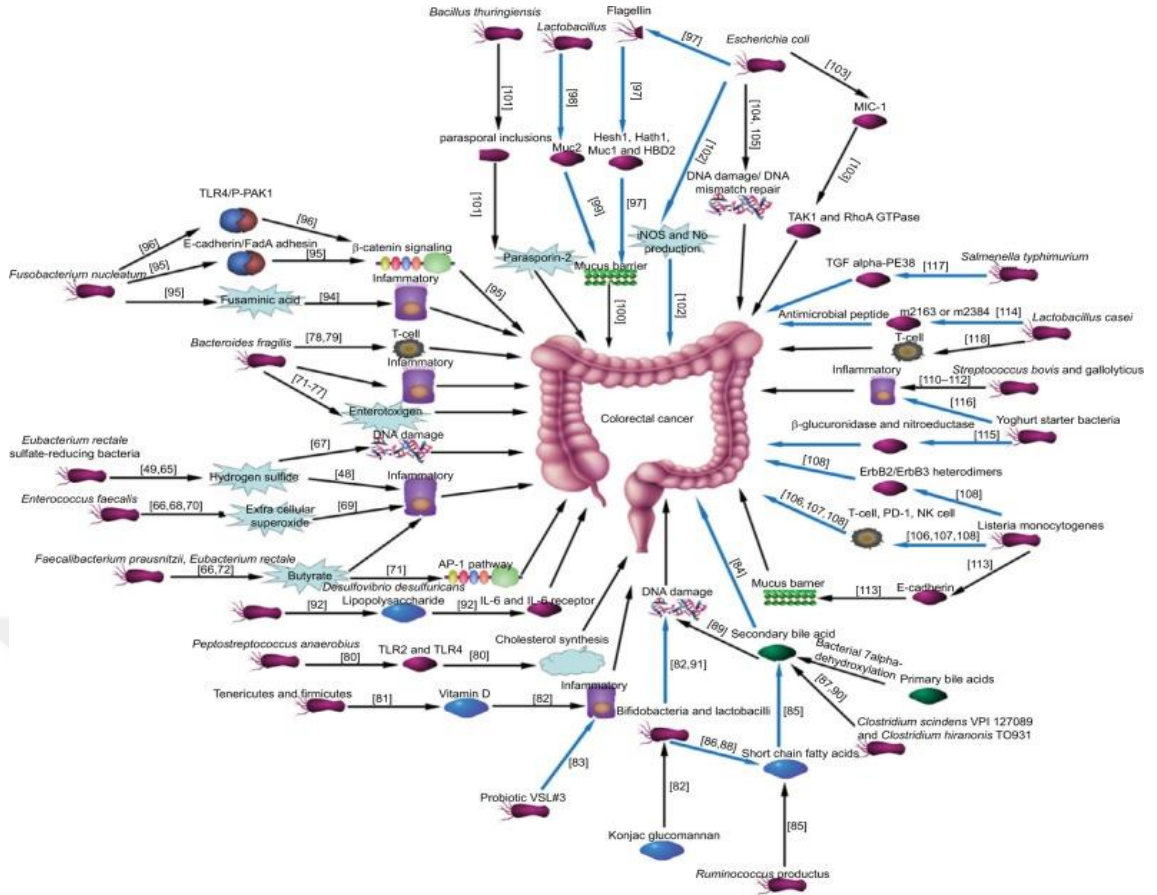
1.7 Bakteri ve Kanseri

İnsan bağırsak mikrobiyotasında yaklaşık 100 trilyon mikroorganizma (bakteriler, virüsler ve funguslar) yaşamaktadır (Ley, Peterson, and Gordon 2006). Bu mikroorganizmalar yaşam stiline, diyetine ve konak organizmaya bağlı olarak kişisel

1. GİRİŞ

farklılıklar göstermektedir. Bağırsak florasında yaşayan bazı bakteri türleri ise konak canlı farklı olsa bile değişmemektedir. Bu bağlamda, insan bağırsak mikrobiyotasında en yaygın bakteriyel organizmaların, Firmicutes (%30-50), Bacteroidetes (%20-40) ve Actinobacteria (%1-10) üyelerinden oluştuğu bilinmektedir. Bağırsak florasında fakültatif anaerob olanlar (*Lactobacillus*, *Enterococci*, *Streptococci* ve *Enterobacteriaceae*) baskın halde bulunurken, zorunlu anaerob olanlar da (*Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptobacterium* ve *Atopobium*) sıklıkla görülmektedir (Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2004). Bağırsak mikroflorasında ortalama 500'den fazla türün bulunduğu ve intestinal simbiyotik bakterilerin yoğun olarak yer aldığı bilinmektedir. Bunun en büyük nedeninin ise evrimsel süreç içerisinde bu gruptaki bakterilerin insan vücuduyla mutualistik bir ilişki kurabilmeyi başaran organizmalar olduğu iddia edilmektedir (Neish 2009). Bağırsaklarda doğal mikrobiyal flora yanında bakteri ve virüs gibi bazı enfeksiyöz etmenlerin de bulunduğu ve bunların çeşitli kanser tipleri ile ilişkilendirildiği de bilinmektedir (Sheikhian, *et al.* 2004). Dokularda bazı mikroorganizma enfeksiyonlarının yoğun olması durumunda kansere yakalanma riskinin arttığı ve mikroplarla kanserin doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. *Helicobacter pylori* ve gastrik kanser; human papilloma virüsü ve servikal kanser; hepatit B virüsü ve karaciğer kanseri buna örnek olarak verilebilir (Warren 2006; Hausen 2009). Bazı bakteri türlerinin kanser için potansiyel bir önem arz ettiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (*Streptococcus bovis*, *H. pylori*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Enterococcus faecalis*) (Peek *et al.* 2002; Gold *et al.* 2004; Wang *et al.* 2012). Bunun yanı sıra özellikle probiyotik özellikte olduğu bilinen bazı türlerin ise kolorektal tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (*Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium longum*) (Rowland *et al.* 1996; McIntosh *et al.* 1999).

1. GİRİŞ



Şekil 1.10 Kolorektal Kanserdeki İntestinal Flora (Han *et al.* 2018)

Bağırsak mikrobiyotasının enfeksiyonlara karşı doğal bir savunma mekanizması oluşturduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bäckhed *et al.* (2005) bağırsak mikrobiyotasının bağırsak epitelindeki yapısal rolünü, germ-free fareler üzerinde göstermiştir. Bu hayvanların mikroorganizmalarla enfeksiyonun da, daha uzun bağırsak villuslarına sahip olduğu, epitel hücrelerindeki yenilenmenin yavaşladığı ve anjiyogenez yeteneğinin azaldığı ortaya konulmuştur (Neish 2009). Bunun yanı sıra bağırsak mikrobiyotasının çeşitli metabolik fonksiyonlara sahip olduğu da bilinmektedir. Örneğin, anaerobik karbonhidrat fermantasyonun da CO₂, H₂ ve CH₄, kısa zincirli yağ asitlerinden bütirat, propiyonat, asetat üretimi yapılmaktadır. Oluşan metabolitler aracılığıyla ise fenolik bileşikler, aminler, amonyak, N-nitroz bileşikler üretilmekte ve üretilen bu ürünler proteolitik fermentasyonda görev almaktadır. Bu bileşikler, gen ekspresyonunu, bağırsak epitel hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını etkilemekte, aynı zamanda vitamin sentezi, iyon absorpsiyonu ve mukus üretimine de aracılık etmektedir (Bäckhed *et al.* 2005; Boleij and Tjalsma 2012). Bağırsakta gerçekleştirilen bu mikrobiyal aktiviteler sonucunda, diyet kaynaklarından elde edilen enerji ve yağ

depolanarak metabolizmaları düzenlenmekte böylelikle hem konağın hem de mikrobiyotanın ortamdaki substratları absorbe etmeleri kolaylaşmaktadır. Ancak proteolitik fermentasyon sonucu üretilen metabolitlerden bazıları konak için toksik özellikler gösterebilmektedir (Simmering *et al.* 2002). Bağırsak mikrobiyotasında yer alan organizmaların toksik ve genotoksik metabolitleri, bağırsak hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak, hücre içerisindeki sinyal iletimini etkilemektedir.

Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*'in (ETBF), üretmiş olduğu fragilisin toksininin kolorektal kanserin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Wu *et al.* 2006). Kanser oluşumunda bakteri tarafından oluşturulan genotoksik etkinin yanında, üretmiş olduğu toksinin bağırsak epitel hücrelerindeki dökülmeyi teşvik ettiği ve gama sekretaz bağımlı, hücre-hücre adhezyonunda rol alan proteinler olan, E kadeninlerde kesime neden olarak süreci tetiklediği rapor edilmiştir (Wu *et al.* 2007). Bu süreçte bağırsak bariyerinin geçirgenliği artmakta ve epitel hücrelerdeki β -katenin/Wnt sinyal iletimini tetiklemektedir. Sinyal iletimindeki değişikliğe bağlı olarak kolorektal kanserdeki proliferasyon ve onkogenik transformasyon da artış görülmektedir (Wu *et al.* 2003). Yapılan başka bir çalışmada bağırsak florasında normalde %0.1 oranında bulunması gereken *B. fragilis*'in, kolorektal kanserli çocuk ve yetişkinlerde %80'lere kadar çıktığı bildirilmektedir (Ulger Toprak *et al.* 2006). Wu *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmada ise, HT29/C1 hücre hattının *B. fragilis* toksini ile muamelesi sonucunda, hücre içi sinyal molekülü olan β -katenin'in nüklear lokalizasyonunu değiştirdiği, β -katenin'in T-hücrelerine bağımlı transkripsiyonel aktivatöre bağlandıktan sonra, *MYC* ve *siklin-D1* transkripsiyon ile translasyonunu indüklediği ve böylelikle hücre proliferasyonu sürekli hale getirdiği gösterilmiştir.

Kolorektal kanserli örneklerden pek çok bakteri izole edilmiş ve bunların kanserle ilişkileri araştırılmıştır. McCoy and Mason (1951), tarafından yapılan bir çalışmada *Streptococcus bovis* ile çekumdaki karsinoma arasında bir ilişki olduğu sonrasında yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir. *S. bovis* ile enfekteli bakteriyemili hastaların feçeslerinde kontrol grubuna göre fazla miktarda *S. bovis*'e rastlanılmış ve bu hastaların %25-80'inde kolorektal kanser gelişimi gözlenmiştir (Gold *et al.* 2004). *S. bovis* ve yüzey antijeninin, bağırsak mukozasında IL-8 üretimini arttırdığı, nitrik oksit ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu tetiklediği ve hücre DNA'sında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Ellmerich *et al.* 2000).

1.8 Kolon Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen Bakteri Türleri

Klebsiella pneumoniae, ağız, deri ve bağırsakların normal florasında bulunan Gram negatif, hareketsiz, laktoz fermente edici özelliğe sahip ve fakültatif anaerobik olan, çubuk şeklinde bir bakteridir (Guo *et al.* 2012). *K. pneumoniae*'nin en önemli virülens faktörü, bakteriyi doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden ve fagositozdan koruyan, ekstrasellüler polisakkarit yapıda olan kapsülüdür. *K. pneumoniae*'nin tanımlanmış en az 79 kapsül tipi bulunmakta ve bu kapsüllerin hastalık şiddeti ile ilişkisinin olduğu bilinmektedir (Hsu *et al.* 2015). Pnömoni etmeni olarak bilinmesine rağmen idrar ve safra yolu enfeksiyonları, cerrahi işlem sonrasındaki enfeksiyonlar ve karaciğer absesine de yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Aynı zamanda etmenin, asemptomatik divertikülit, (Niemann and Wintzer 1995; Jovanović *et al.* 2007) inflamatuvar bağırsak hastalığı (Margalit *et al.* 2004; Wells *et al.* 2005) tubulovillous adenoma, (Lai *et al.* 2006) kolorektal kanser, (Lim and Lim 2004) ve hatta kolon polipektomi ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (Gross *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008). Struve ve Krogfelt (2003) yaptıkları çalışmada, *K. pneumoniae*'nin virulans özelliğinin kapsül ile olan ilişkisini ortaya koymak için *in vitro* ve *in vivo* deneyler gerçekleştirmişlerdir. Kapsül ekspresyonunun, *K. pneumoniae*'nin kapsüle edilmemiş varyantı ile karşılaştırıldığında epitel hücrelerine bağlanma kabiliyetini azalttığını; kapsülün varlığının/yokluğunun gastrointestinal sistemin kolonizasyonu üzerinde hiçbir etkisinin bulunmadığını aksine idrar yolunda ise bu kapsülün önemli bir virülans faktörü olduğunu rapor etmişlerdir.

Kolorektal kanserde rol oynadığı bilinen, kolon biyopsi örneklerinden izole edilen bakterilerden biri de *Escherichia coli*'dir. Yapılan çeşitli çalışmalar, mukozal yüzeylerde bulunan *E. coli* ve kolorektal kanser arasında net bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Swidsinski *et al.* 1998; Martin *et al.* 2004; Arthur *et al.* 2012). *E. coli* insan mikrobiyotasının kommensal bir bakterisidir ve kolaylıkla kültüre alınabilen, Gram negatif, aeroanaerobik bakterileri temsil etmektedir. *E. coli*, multilokus enzim elektroforez paterni (MLEE), DNA'ya dayalı multilokus sekans tiplendirme (MLST) ve tüm genom sekans analizi sonuçlarına göre 4 farklı filogenetik gruba (A, B1, B2 ve D) ayrılmaktadır (Wassenaar 2018). A ve B1 grupları genellikle patojen olmayan ve kommensal olarak yaşayan *E. coli* türlerini temsil ederken, B2 ve D grupları bağırsak ve

1. GİRİŞ

ekstra-intestinal hastalıklarda rol oynayan ve virülensliği yüksek patojen türleri oluşturmaktadır. Patojen *E. coli* tarafından üretilen sitotoksik nekrotizan faktörler, hücre siklusunu inhibe eden faktörler, hücre ölümüne neden olan toksinler ve kolibaktin, konak hücrenin hücre siklusunu çeşitli aşamalarda kontrol etmektedir (Cuevas-Ramos *et al.* 2010) Kolibaktin, *E. coli*'nin pks gen bölgelerinden üretilen bir genotoksindir. Kolibaktin, DNA'da çift zincir kırıklarına, hücre siklusunun durdurulmasına ve megalositoza yol açmaktadır. Kolibaktin ile indüklenen DNA hasarı, kanserli hastalarda görülen lezyonlardaki mutasyonlar ve kromozomal kararsızlıkla ilişkilidir (Wassenaar 2018). Filogenetik B2 grubunda yer alan bazı *E. coli* izolatları, kolorektal kanser için bir risk faktörü olduğu bilinen, kronik bir iltihaplı bağırsak hastalığı olan CD ile ilişkilidir. Bununla birlikte, tüm B2 izolatları için aynı virülans özellik geçerli değildir. (Darfeuille-Michaud *et al.* 1998). Bunun dışında bazı *E. coli* izolatları, kanser hücre lezyonları ve komşu epitel hücreleri üzerinde kolonizasyonu nedeniyle kolorektal kanser ile ilişkilendirilmektedir. Sketel *et al.* (2005) yaptıkları çalışmada, insan intestinal epitel hücre hattı (Caco-2) üzerine enterohaemorajik *E. coli* (EHEC) ve enteropatojenik *E. coli* (EPEC) izolatlarının bir günlük kültürleri 1:30 oranında besiyeri ile seyreltilerek uygulanmış ve NF- κ B ekspresyonunda azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Kolon biyopsi örneklerinden izole edilen bakterilerden bir diğeri ise *Acinetobacter baumannii*'dir. *A. baumannii*, Gram negatif, hareketsiz, fırsatçı bir kokobasil türüdür. (Dijkshoorn and Nemeç 2008). *A. baumannii*'nin gastrointestinal kanalda kolonize olduğu bilinmekle beraber kolonizasyonun nasıl gerçekleştiğiyle ilgili mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir.

A. baumannii izolatları, membran porinlerinin azaltılması, doğal olarak ifade edilen beta-laktamaz ve çeşitli efluks pompaları nedeniyle birçok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir. Antibiyotik direncinde rol oynayan genlerin yatay gen transferi yoluyla aktarılması nedeniyle günümüzde pek çok bakteri türü direnç kazanmış durumdadır. *Acinetobacter* enfeksiyonlarına karşı etkili, oldukça yüksek toksik özelliğe sahip antibiyotiklerden biri olan kolistin, bakterilerde hücre permeabilitesini hedeflemekte ve tedavide son çare olarak kullanılmaktadır (Ketter *et al.* 2018).

1.9 Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Yapılan çalışmada; kolorektal kanserli hastalardan alınan kolon biyopsi örneklerinden bakteri izolasyonları yapılarak, izole edilen bu patojenler ile kolorektal kanser arasında olması muhtemel ilişkinin moleküler boyutta ve gen düzeyinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikrobiyota ve hastalıklar arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, sağlıklı bireyler ile hastalıktan çabuk etkilenen bireylerin özellikle bağırsaklarında yaşayan mikrobiyal topluluğun bileşiminin haritalanması ve karşılaştırılması, bu ilişkinin açığa çıkarılması açısından önemli görülmekte ve bu durum mikrobiyoloji ve tıpta farklı yaklaşımların ele alınmasını gerektirmektedir. Bu araştırma alanı halen başlangıç aşamasında olmasına rağmen, hayvan modelleri ve hastalarda mikrobiyota ile inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (İBH) gelişimi arasında bağlantı olduğu sayısız araştırmada gösterilmiştir. İBH'li bireylerin üstlendiği en büyük risklerden biri, kolorektal kansere olan yüksek duyarlılıktır. Epidemiyoloji çalışmaları, kronik kolitin süresinin ve ciddiyetinin kolorektal kanser için önemli risk faktörleri olduğunu göstermektedir. Mikrobiyotanın, ülseratif kolit ve Crohn hastalığının gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilindiğinden bakteriyel izolatlar ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi aydınlatmak büyük önem arz etmektedir (Bouma and Strober 2003; Itzkowitz and Yio 2004; Rutter *et al.* 2004). İBH ile ilişkili önemli bir risk de kolit ile ilişkili kolorektal kanser (CAC) oluşumudur. Ülseratif kolit ile 30 yıl veya daha fazla etkilenen bireylerde CAC gelişimi riski %7,6 -%8 olarak değerlendirilmiştir (Uronis and Jobin 2009). Mendes *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Bifidobacterium bifidum* gibi bakteri takviyesinin kolorektal kanserli hastaların normal florasında bulunan *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Akkermansia* spp. *Porphyromonadaceae*, *Coriobacteridae*, *Staphylococcaceae* ve *Methanobacteriales* türlerindeki artışı engellediğini ve *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* ve *Treponema* gibi türlerde ise sayısal olarak artışa neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Kolondaki adenomaları ve kanserleri tespit etmek amacıyla kan dolaşımında *Streptococcus gallolyticus*'un tespiti yaklaşık 40 yıldır güçlü bir belirteç olarak kullanılmaktadır. *S. gallolyticus*'un kandaki enfeksiyonu ile kolondaki neoplazinin birlikte görülme sıklığı %1'in altında olmasına rağmen, moleküler olarak bakıldığında, bakteriye ait DNA'nın kolondaki tümör dokusunda ve mukozal dokularda %20-50 oranında varlığı önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir (Boleij and Tjalsma 2013).

Yapılan başka bir çalışmada, *Enterococcus faecalis* izolatlarının DNA hasarını ve genomik dengesizliği indükleyebilen radikal oksijen türlerini üreterek, hücre dışı ürettikleri süperoksit anyonlarının kolorektal kanser başlatıcıları olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Wang *et al.* 2008).

Sağlıklı ve kolorektal kanserli bireylerde bakteriyel kolonizasyonun araştırıldığı çalışmalarda, kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %81'inde *E. coli*'nin izole edildiği rapor edilmiştir. İzole edilen bakterilerin potansiyel olarak ya genotoksik *E. coli* ya da adherent *E. coli* olabileceği düşünülmüş ve potansiyel olarak genotoksik olduğu düşünülen *E. coli*'nin B2 filogrubuna ait olduğu, genomunda taşıdığı *pks* (poliketit sentez adaları) genleri tarafından ürettiği genotoksin ve kolibaktinin DNA'da çift zincir kırıklarına neden olduğu bildirilmiştir. *pks* adası zarar görmüş *E. coli*'nin, konak DNA hasarı üzerine etkisinin, tümör sayısının ve bakteriyel invazyonunun azaldığı da aynı çalışmada rapor edilmiştir (Cuevas-Ramos *et al.* 2010).

Kolorektal kanser ile piyojenik karaciğer apsisi (PLA) arasındaki ilişkinin incelendiği bazı çalışmalarda özellikle *K. pneumoniae* ile enfekte bireylerde pozitif korelasyonun olduğu bilinmektedir (Guo *et al.* 2012). Farklı bakteri türlerinin PLA'ya neden olduğu ve genellikle *E. coli*'nin batı ülkelerde, *K. pneumoniae*'nin ise doğu ülkelerde hastalık etmeni olarak rol oynadığı bilinmektedir (Guo *et al.* 2012). Hsu *et al.* (2008), yıl içerisinde tekrar eden PLA vakalarında *K. pneumoniae*'nin varlığını tespit etmişler, daha ileri araştırmalarda hastanın gizli sigmoid kolon kanseri olduğunu ve kolonik tümörün rezeksiyonundan sonra karaciğer apsisinin yinelenmediğini bildirmişlerdir. Özellikle diyabetli hastalarda, bakteri ile ilişkili karaciğer apsisinin ve bakteriyeminin sıklıkla görüldüğünü raporlamışlardır. Huang *et al.* (2012), ortalama 11 yıl boyunca 2294 hasta üzerinde taramalar yaparak bu hastaların 1194'ünde (%52), *K. pneumoniae* enfeksiyonunun varlığını tespit etmişlerdir. *K. pneumoniae* ile enfekte PLA hastalarının, diğer PLA hastalarına oranla kolorektal kansere yakalanma riskinin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda yapılan başka bir çalışmada da kolorektal kanserli bireylerin yaklaşık %50'sinde *K. pneumoniae*'nin varlığı tespit edilmiştir (Antonic *et al.* 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

K. pneumoniae'nin PLA ve kolorektal kanser yanında, Crohn hastalığı ile de bağlantısının olduğuna yönelik bazı araştırmalar mevcuttur. CD'nin bazı enfeksiyonel etmenler ve bunların tetiklediği immün aracılı doku hasaralarının bir sonucu olarak meydana gelebileceği konusunda genel bir fikir birliği vardır. Özellikle, *Klebsiella* enfeksiyonlarının CD'li hastalarda bağırsak ve eklem dokuları ile ilgili patolojik hasarın başlatılmasında ve sürdürülmesinde kilit bir role sahip olduğu mikrobiyolojik, moleküler ve immünolojik çalışmalar sonucunda belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada CD'li hastaların *K. pneumoniae*'ye karşı antikor sayılarında artışın olduğu ve aynı zamanda bu hastaların gaitalarında da *K. pneumoniae* sayısının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Rashid *et al.* 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise gastrointestinal *K. pneumoniae*'nin invazyon özelliğini ne şekilde gerçekleştirdiği açıklanmıştır. *K. pneumoniae*'nin aktif bakteriyel invazyon ve transselüler bir mekanizma yoluyla intestinal epitelyum boyunca translokasyon yaptığı, *K. pneumoniae* ve intestinal epitel hücreleri arasındaki adhezyon ve etkileşimin, hücresel sinyal transdüksiyon kaskadlarını tetiklediği bildirilmiştir. Rho familyasından GTPases Rho, Cdc42 ve PI3K/Akt yolağının, hücre sitoskeletonunun yeniden düzenlenmesini indüklemek için aktive edildiğini, bu durumda bakterilerin invazyonuna yol açtığı ve gerçekleşen transsellüler geçişle, *K. pneumoniae*'nin bağırsak bariyerine nüfuz ederek sistemik dolaşıma geçtiği ve ekstraintestinal bölgelere erişerek hastalığı başlattığı tespit edilmiştir (Hsu *et al.* 2015).

E. coli'nin adenomalı hastaların biyopsi örneklerinde %62, karsinomalı hastalarda %77 oranında kolonize olduğu; semptomatik biyopsi örneklerinde %12 ve asemptomatik kontrol grubunda ise %3 oranında kolonize olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Swidsinski *et al.* 1998). Raisch *et al.* (2014) yaptıkları bir çalışmada, kolorektal kanserli hastalardan izole edilen virülens izolatların %43, divertikülozlu kontrol grubunda ise %32 oranında B2 grubunda yer alan izolatların bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kolorektal kanserli hastalardan izole edilen *E. coli*'nin %57 oranında farklı bir filogruba ait olabileceğini belirtmişlerdir. Escobar-Paramo *et al.* (2004) yapmış oldukları çalışmada, fast food tarzı beslenen insanların bağırsaklarında B2 tip *E. coli*'nin bulunma olasılığının ve kolorektal kansere yakalanma riskinin arttığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, bağırsak dokularında kronik inflamasyon olan kişilerin *E. coli* kaynaklı kolorektal kansere yakalanma olasılıklarının arttığı da

bilinmektedir. Bu izolatların üretmiş oldukları bazı virülans faktörlerinin, konakta uzun süreli inflamatuvar yanıt oluşumuna neden olduğu ve sonuçta malign özellikteki kolorektal kanserin oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Herrinton *et al.* 2012). B2 tip *E. coli* izolatları ile yapılan çalışmalarda çeşitli epitel hücrelerinin bu izolat ile muamelesi sonucunda hücrelerin uzadığı, hücre siklusunun çeşitli aşamalarında durduğu ve bu izolatın hücreleri senesense ittiği gözlenmiştir (Cuevas-Ramos *et al.* 2010;Wassenaar 2018).

Lee *et al.* (2001), *A. baumannii*'nin epitel hücreleri apoptoza götüren süreci inceledikleri çalışmalarında bakteriyel izolatın 8 saatlik canlı kültürü, kültür filtratı ve formalin ile öldürölmüş üç farklı formu, HeLa hücre hattı üzerine uygulanmış ve kaspaz-3 enzim aktivisindeki değişiklikler tespit edilmiştir. Sonuçlar, kontrol grubuna göre *A. baumannii* enfeksiyonunun HeLa hücre hattı üzerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi aracılığıyla hücreyi apoptoza götürdüğünü göstermiştir (Lee *et al.* 2001).

Krzyminska *et al.* (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* izolatlarının epitel hücreler üzerindeki interaksyonu araştırılmıştır. Çalışmalarında epitel hücrelerdeki sitotoksitenin indüksiyonu için bakteriyel temasın yanı sıra, adhezyon ve invazyonun da gerekli olduğunu göstermişlerdir. Bakteriyel kültür filtratları (1:2- 1:512 aralığındaki konsantrasyonlarda) ile enfekte edilmiş hücrelerde 24 saatlik inkübasyon sonucunda, hücre boyutunun küçölmesi, DNA'nın fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptoz ile karakterize edilen ayırt edici özellikler taramalı elektron mikroskobundan alınan görüntüler ile ortaya çıkarılmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücre popölasyonu ise propidyum iyodür ve akridin turuncusu (100 µg/ml) ile floresan mikroskop altında görünür hale getirilmiştir. Çalışmada 24 saatlik *A. calcoaceticus* ve *A. baumannii* izolatlarına ait kültür filtratlarının hücre hattı ile inkübasyonu sonucunda, hücrelerin %50'sinden fazlasında apoptozun ayırt edici özelliklerini gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Smani *et al.* (2011), kolisitine dirençli ve duyarlı *A. baumannii* izolatlarının, inflamasyon ve oksidatif stres aracılığıyla akciğer hücrelerinin ölümüne neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Smani *et al.* (2015) yaptıkları başka bir çalışmada ise, lizofosfotidil kolinin (LPC) (immün hücrelerin uyarılmasında rol alan, ökaryotik hücrelerdeki fosfolipitin majör bileşenlerindedir) *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için yararlı olup olmadığını *in vivo* deneylerle göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada LPC tedavisinin, akciğerlerde ve dalaktaki bakteriyel popülasyonu azalttığını ve hayvanlarda sağkalım oranını artırdığını rapor etmişlerdir. İlginç bir şekilde, *A. baumannii* ile farelerin enfeksiyonundan sonra ilk 2 saatte serum LPC seviyelerinin azaldığını ve bu azalmanın proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 düzeylerindeki artışla birlikte olduğunu bulmuşlardır.

Zaika *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte olmuş gastrik hücrelerde *TP53* gen ekspresyon seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. İntrasellüler bakteriyel bir patojen olan *Chlamydia trachomatis* ve diğer *Chlamydia* türlerinin de p53 protein degradasyonuna neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (González *et al.* 2014; Siegl *et al.* 2014). Enteropatojen *Shigella flexneri*'nin de p53 inhibisyonuna, güçlü genotoksik strese ve hücre hasara neden olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bergounioux *et al.* 2012). Yapılan başka bir çalışmada da insan gastrik kanser hücre hatları (NU1, AGS ve Kato III) *H. pylori* ile enfekte edilmiş ve *TP53* geninin ekspresyonunda azalmanın tümör oluşumunda rol oynayabileceği yapılan çalışma ile rapor edilmiştir (Wei *et al.* 2010).

Hoffenberg *et al.* (1999) yaptıkları çalışmada, çocuklar üzerinde net bir şekilde çalışılıp tanımlanmamış olan, semptomatik poliplerin klinik spektrumu ve ailesel polipozis sıklığı üzerinde durmuşlardır. Jüvenil polipozis koli, 10 veya daha fazla sayıda polip oluşumuyla karakterize edilen bir hastalık olarak tanımlanmış olup, çalışmada 72 çocuk (0,4-18 yaş), *KRAS* mutasyonları, *TP53* overekspresyonu ve anöploidi açısından araştırılmış ve herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır. Jüvenil polipozis koliye sahip çocuklarda semptomatik polip oluşumu ve aneminin sıklıkla oluştuğu sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez kapsamındaki araştırmalarda kullanılan sağlıklı (normal) insan dermal fibroblast (ATCC® PCS-201-012™) hücre hattı ATCC® hücre kültürü koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmada, Erzurum Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, kolon kanserli hastalardan biyopsi örnekleri alımı “Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” tarafından verilen 15.08.2017 tarihli ve B.30.2.ATA.0.01.00/85 sayılı yazısı ve 10 nolu karar ile onaylanmıştır. Alınan biyopsi örneklerinden izole edilen bakteriyel izolatlar tezin ana materyalini oluşturmaktadır. Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 3.1’de, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarı’nda mevcut olan ve çalışmada kullanılan cihazlar ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Kitler

Kitler	Alındığı Firma
Annexin V FITC Kit	Beckman
Caspase-3 Colorimetric Assay Kit	Biovision
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™
CVDK-8 Kit	Ecotechbiotechnology (Turkey)
DMEM	Sigma-Aldrich® (Germany)
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	Cayman
PureLink Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen™
PureLink PCR Purification Kit	Invitrogen™
RNA İzolasyon Kiti	Invitrogen™
Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems™

Çizelge 3.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihazın Adı	Modeli
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Buzdolabı	Edesa
CO ₂ ’li İnkübatör (115lt)	Esco, Ccl-170b
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-Zhwy-2102c
Derin Dondurucu (-20)	J.P. Selecta
Derin Dondurucu (-86)	Esco, Uus-439b
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M

Çizelge 3.2 (devamı)

Cihazın Adı	Modeli
Elektroforez Tankı	Biorad, Dikey
Elektroforez Tankı	Biorad, Yatay
Güç Kaynağı	Biorad, PowerPac
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, Shr
Isıtıcı-Soğutucu Kuru Blok	Bioer, Ch 202
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikroskop	Zeiss, Prima Star
Otoklav	JSR, Jsac-60
PCR Cihazı	Sensequest
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek, EPOCH
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiscan Go
Sterilizatör	Microtech, Mst 55
Su Banyosu	Daihan
Terazi	Desis, NHB
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3w
UV-Visible Spektrofotometre	Mecasys, Optizen uv/vis
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

3.1.1 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

%10'luk APS çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak 10 ml dH₂O içerisinde çözülmüş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS, 100 ml dH₂O içerisinde çözdürülmüş ve otoklav ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan çözelti kullanılmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Wilson 1997).

%15'lik Ayırma Jeli: 1,42 ml 100, 975 µl 2M Tris (pH: 8.8), 2,5 ml %30 Akrilamid karışımı, 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 APS ve 5 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

%15'lik Yükleme Jeli: 1,8 ml H₂O, 312,5 µl 1M Tris (pH: 6.8), 335 µl %30 Akrilamid karışımı, 25 µl %10 SDS, 25 µl %10 APS ve 2,5 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

10X Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.0 Çözeltisi: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ ve 2,4 g KH₂PO₄ 800 ml distile su içerisinde çözdürülerek. pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandıktan sonra, dH₂O ile hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan PBS çözeltisi otoklavda sterilize edilerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1M Tris (pH:6.8): 121,1 g Tris HCl (mw: 121,1), 750 ml dH₂O içerisinde çözdürülerek pH'sı, HCl ile 6.8'e ayarlandıktan sonra, son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

1X SDS-PAGE Jel Yürütme Tamponu: 3 g Trisma Base, 14,4 g Glisin ve 1 g SDS 1 L dH₂O içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

1X TAE Tamponu: 100 ml 10X TAE tamponu, 900 ml dH₂O içerisine eklenerek hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır (Görmez 2011).

2M Tris (pH:8.8): 250 ml dH₂O içerisinde 96,91 g Tris HCl (mw: 121,1) çözdürülerek pH'sı, HCl ile 8.8'e ayarlanmış ve son hacim 400 ml'ye tamamlanarak otoklavlandıktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

6X yükleme tamponu: 0,025 g bromofenol blue boyası, 1,25 ml %10'luk SDS ve 12,5 ml gliserol ile karıştırıldıktan sonra 6,25 ml steril dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan karışım +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Columbia Blood Agar Base (Oxoid): (Bileşeni (g/L); Special Peptone: 23, Nişasta: 1, Sodium Chloride: 5, Agar: 10) 1 L dH₂O içerisine 39 g besi ortamı ilave edilerek, otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Besi ortamlarının sıcaklığı ~ 50°C'ye ulaştıktan sonra 500 ml'si için (Bileşeni (mg/L); Vancomycin: 5, Trimethoprim: 2,5, Cefsulodin: 2,5, Amphotericin B: 2,5) karışımı 2 ml dH₂O içerisinde

3. MATERYAL ve YÖNTEM

çözdürülerek aseptik koşullarda besi ortamına eklenmiştir. Son olarak, 35 ml “Laked Horse Blood (Thermo)” besi ortamına ilave edilerek steril petrilere dökülmüştür.

Cristensen Urea Agar Base (HiMedia): (Bileşeni (g/L); Peptone: 1, Glikoz:1, Sodium Chloride: 5, Disodium phosphate: 1,2, Monopotassium phosphate: 0,8, Phenol red: 0,012 ve Agar: 15) 1 L dH₂O içerisine hazırlanan besi ortamı ilave edilerek, hazırlanan çözelti otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Sıcaklık ~ 50°C’ye ulaştıktan sonra besi ortamına 50 ml %40’lık Üre solüsyonu aseptik koşullarda eklenerek hazırlanmıştır.

Etidyum bromür çözeltisi: 1 g etidyum bromür, 100 ml dH₂O içerisinde çözdürülerek, 10 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonundan 100 mg alınarak 10 ml distile su içerisinde yeniden çözdürülmüş (0,5 µg/ml) ve karanlık şartlarda, +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel 2006).

PMSF (Fenil Metil Sülfonil Florür): 0,174 g PMSF, 10 ml izopropanol içerisinde çözdürülerek stok solüsyon 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım -20° C’de karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir.

Proteinaz K: 20 mg proteinaz K, 1 ml steril dH₂O içerisinde çözdürülmüş ve hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir (Wilson 1997).

SDS-PAGE Jel Destaining Tamponu: Hacmi 1 L olacak şekilde 100 ml asetik asit, 300 ml etil alkol ve 600 ml dH₂O ilave edilerek hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Jel Staining Tamponu: Hacmi 1 L olacak şekilde hazırlanan SDS-PAGE Jel Destaining Tampona 1 g Coomassie Brilliant Blue R ilave edilerek hazırlanmıştır.

Triptik Soy Agar (TSA): (Bileşeni (g/L); Tripton: 15,0, Soy Pepton: 5,0, Sodyum Klorit: 5,0, Agar: 15,0) Triptic Soy Agar besiyeri 1 L dH₂O içerisine 40 g olacak şekilde ilave edilerek, 121°C’de 15 dk sterilize edilerek hazırlanmıştır.

Trypton Soy Broth (TSB) (Lab M): (Bileşeni (g/L); Trypton (casein digest): 17,0, Soy Pepton: 3, Sodyum Klorit: 5, Dipotasyum hidrojen fosfat: 2,5, Dekstroz: 2,5) 1 L dH₂O içerisine 30 g Trypton Soy Broth karışımı ilave edilerek, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilerek hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kolon Biyopsi Örneklerinden Bakteriyel İzolasyon

Kolon kanserli hastalardan alınan biyopsi örnekleri, %1 glikoz içeren TSB besi ortamına alınarak 37°C’de 3-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci sonunda besi ortamından 100 µl alınarak TSA’ya inokule edilmiştir. İnokulasyon sonucunda besi ortamları 37°C’de aneorobik jar içerisinde mikroaerofil ortam oluşturacak şekilde inkübe edilerek bakteri gelişimleri takip edilmiştir. İzole edilen bakteriler, selektif olarak hazırlanmış içerisinde trimethoprim, sefosporinlerden sefsulodin, vankomisin ve amfoterisin B içeren “Laked Horse Blood (Thermo)” eklenmiş “Columbia Blood Agar Base” içerisinde geliştirilmiştir.

3.2.2 Bakterilerin Tanılanması

İzole edilen bakterilerin tanılanmasında aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır.

3.2.2.1 Bakterilerin Klasik Yöntemlerle Tanılanması

a. Hücre Morfolojisi Testi

Elde edilen izolatların, hücre şekillerinin tespit edilmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapılmıştır. Lam üzerine yayılan taze bakteri kültürleri, havada kurutulduktan sonra, alev yardımıyla lam üzerinde fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, lam üzerine kristal viyole eklenerek, 3-4 dk bekletildikten sonra, boya saf su ile uzaklaştırılarak kurutulmuş ve mikroskop altında inceleme yapılmıştır (Saygılı 1995).

b. Koloni Şekli ve Rengi

Bu yöntemde otoklavda steril hale getirilmiş TSA besiyeri, steril petri kutularına dökülmüştür. Besiyerinin katılaşması beklendikten ve yüzey kuruması sağlandıktan sonra TSB'de büyütülen izolatlardan 0,1 ml alınmış ve %70'lik (v/v) alkolde tutularak sterilize edilmiş olan cam baget yardımıyla, tüm yüzeye homojen bir dağılım gösterecek şekilde yayılmıştır. İzolatlar 37°C'de mikroaerofilik koşullarda inkübe edildikten sonra koloni şekli ve rengi tespit edilmiştir (Michael and Abbot, 2002).

c. Gram Boyama

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarındaki farklılıkların esas alınarak yapıldığı morfolojik tanılamada sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Gram boyama testi için; öze yardımıyla lam üzerine alınan bakteri kültürlerinin üzerine bir iki damla serum fizyolojik ilave edilerek lam üzerine yayma ekim yapılmıştır. Preparatlar lam üzerine fikse edildikten sonra üzerine kristal viyole solüsyonu eklenerek 2 dk bekletilmiştir. Akabinde su ile yıkanarak bağlanmayan boyalar uzaklaştırılmış ve lügol solüsyonu eklenerek 1 dk bekletilmiştir. Yıkama işleminden sonra, dekolorizasyon işlemi için, %96'lık etil alkol uygulanarak 15-20 s bekletilen preparatlar su ile yıkanmış ve son olarak sulu fuksin ile muamele edilerek 2 dk daha bekletilmiştir. Boya uzaklaştırılıp, kurutma işlemi gerçekleştirildikten sonra mikroskopta immersiyon yağı yardımıyla 100X objektifte inceleme yapılmıştır (Morris *et al.* 2018).

d. Oksidaz Testi

Bakterilerin tanılanmasında morfolojik özelliklerin yanı sıra biyokimyasal özelliklere de sıklıkla başvurulmaktadır. Sitokrom sistemi genellikle son elektron alıcısı oksijen olan aerobik organizmalarda bulunmaktadır. Sitokrom sisteminde kilit enzim olarak bilinen, verici bileşiklerin (NADH) elektron alıcılarına (genellikle oksijen) elektron taşınmasını katalize eden, sitokrom oksidaz veya indofenol oksidaz (bir demir içeren hemoprotein) içeren izolatlar oksidaz pozitif olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla uygulanan yöntemde; test reaktifi olarak enzim (oksidaz) için suni bir elektron alıcısı rolünü üstlenen N, N, N', N'-tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorür reaktif olarak kullanılmaktadır. Bu reaktif oksitlendiğinde, renkli bir bileşik olan indofenol

maviyi oluşturduğundan mavi renk oluşumu oksidaz pozitif olarak değerlendirilmektedir. Yöntemin uygulanışında; filtre kağıdı, direkt plaka, swab, emdirilmiş oksidaz test bandı ve test tüpü gibi farklı oksidaz testleri kullanılmaktadır. Çalışmada bu testlerden emdirilmiş oksidaz test bandı metodu tercih edilmiştir. Bu amaçla, 16-24 saatlik taze bakteri kültürleri hazırlanmış ve ticari olarak “Bactident® Oxidase Merck” firmasından satın alınmış disklere emdirilerek ortaya çıkan renk değişimi (koyu mor veya mavi) ile oksidaz varlığı tespit edilmiştir (Piot *et al.* 1982).

e. Üreaz Testi

Üreaz, düşük pH ortamında üreyi parçalayarak amonyağa dönüştüren ve bu esnada ortamın pH'sını alkalileştiren bir enzimdir. Bu enzime sahip olan bakterilerin tespiti amacıyla uygulanan bu testte, Cristensen Urea Agar Base besi ortamında geliştirilen izolatlar ortamda bulunan üreyi parçalayarak besi ortamının rengini 15-20 dk içerisinde sarıdan pembeye dönüştürmektedir. Besi ortamında renk değişimine neden olan izolatlar üreaz pozitif olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla uygulanan bu testte bakteri izolatları Cristensen Urea Agar Base besi ortamına çizgi ekim yapılarak 37°C'de mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiş ve renk değişimine bağlı olarak sonuçlar değerlendirilmiştir (MacFaddin 2000).

f. Katalaz Testi

Katalaz, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayan bir enzimdir. Hidrojen peroksit, bazı bakteriler tarafından, şekerlerin aerobik parçalanmasının oksidatif bir son ürünü olarak oluşmaktadır. Bazı bakteri izolatları katalaz enzimleri aracılığıyla hücrede yüksek oranda bulunan hidrojen peroksitin toksik etkisinden korunmaktadırlar. Bakteri izolatlarının bu enzime sahip olup olmadığını tespit etmek amacıyla uygulanan bu yöntemde; bir test tüpüne bir öze dolusu bakteri kültürü ile onun üzerini örtecek şekilde 0,2 ml, %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi ilave edilmiş ve 10 sn içerisinde kabarcık oluşumu takip edilmiştir. Kabarcık oluşumu gözlenen izolatlar katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Piot *et al.* 1982).

3.2.2.2 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanınması

a. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Bakterileri moleküler olarak tanılama amacıyla ilk olarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Columbia Blood Agar Base besi ortamında geliştirilen bakteriler toplanarak, PBS ile yıkanmış ve santrifüj edilerek, süpernatantı atıldıktan sonra, pellet üzerinden DNA izolasyonu için ticari olarak satın alınan kit protokolüne (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) uygun olarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla;

1. Başlangıçta 2×10^9 hücre olacak şekilde DNA izolasyonuna başlanılmıştır.
2. 180 µl “PureLink™ Genomic Digestion Buffer” içerisinde pellet çözülmüştür.
3. Hücre lizatının üzerine 20 µl “Proteinase K” eklenerek, vortekslenildikten sonra 55° C’de yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonunda lizat üzerine 20 µl “RNase A” eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
5. Karışım üzerine 200 µl “PureLink™ Genomic Lysis/ Binding Buffer” eklenerek homojen bir solüsyon elde edilene kadar vortekslenmiştir.
6. Elde edilen homojen solüsyonun üzerine 200 µl %96-100’lük etil alkol eklenmiş ve 5 s boyunca iyice vortekslenmiştir.
7. Elde edilen homojenat (~ 640 µl), toplama tüpü geçirilmiş, “PureLink™ Spin Column” içerisine aktarılarak, 10.000 g’de 1 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
8. Toplama tüpündeki alt sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, 500 µl “Wash Buffer 1” kolona eklenerek, 10.000 g’de 1 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem “Wash Buffer 2” için de gerçekleştirilmiş ve maksimum hızda 3 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
9. Son aşamada kolon, steril bir toplama tüpüne alınarak, üzerine ~ 100 µl “PureLink™ Genomic Elution Buffer” eklenmiş ve oda sıcaklığındaki 1 dakikalık inkübasyondan sonra maksimum hızda 1 dakikalık santrifüj işlemi sonrasında, kolondaki DNA saf olarak elde edilmiştir.

Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile belirlendikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

b. Bakterilerin 16S rRNA Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

Yapılan DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA örneklerinin 16S rRNA bölgesini çoğaltmak için, forward primer olarak; 27F=5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer olarak; 1391R=5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3' evrensel primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu kurulurken her bir örnek için, 10X PCR Buffer'dan 5 µl; dNTP miksinden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM) 1 µl; forward ve reverse primerlerden 1'er µl; MgCl₂'dan (50 µM) 4 µl; 5 unit/µl *Taq* DNA polimerazdan 0,5 µl ve steril dH₂O'dan 35,5 µl olacak şekilde toplam 47.5 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon tüpüne 2.5 µl template DNA eklenerek toplam hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek, reaksiyon koşulları, 95°C'de 2 dk, 94°C'de 1 dk, 53°C'de 1 dk, 72°C'de 90 s 30 döngü ve final uzaması 72°C'de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Turner *et al.* 1999).

c. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile görüntülenmesi için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 1 g agaroz tartılmış ve 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan karışım mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar kaynatılmıştır. Ardından sıcaklık yaklaşık 50°C'ye geldiğinde içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan etidyum bromürden 3,5 µl eklenmiştir. Hazırlanan jel karışımı, tarakları takılmış olan jel kasetinin içerisine dökülmüş ve agarozun polimerleşmesi için yaklaşık 30 dk beklenmiştir. 30 dk sonunda taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve çıkarılan jel, 1X TAE tamponu ile dolu olan elektforez tankına yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb; 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp) diğer kuyucuklara ise 5 µl PCR ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Jel sistemi güç kaynağına bağlanmış ve 90 voltta 1 saat yürütülmüştür. Jel görüntüleme sistemi yardımıyla, DNA bantları görünür hale getirilmiştir.

d. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması

16S rRNA PCR'ı yapılan örneklerin sekansa gönderilmeden önce saflaştırılması için "PureLink™ PCR Purification Kit" protokolü takip edilmiştir. ~ 50 µl olan PCR ürünlerinin üzerine, hacminin 4 katı kadar "PureLink® Binding Buffer (B2)" eklenmiş ve hazırlanan karışım, "PureLink® Spin Column"a aktarıldıktan sonra, oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, 650 µl "Wash Buffer" kolona eklenmiş ve santrifüj basamağı tekrar edilmiştir. Alt sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, kolonda kalan "Wash Buffer"ı uzaklaştırmak için kolon maksimum hızda 3 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Son aşamada kolon, steril bir toplama tüpüne alınarak, üzerine ~ 50 µl "Elution Buffer" eklenmiş ve oda sıcaklığındaki 1 dakikalık inkübasyondan sonra maksimum hızda 2 dakikalık santrifüj işlemi sonrasında, kolondaki PCR ürünleri saf olarak elde edilmiştir.

e. 16S rRNA Sekans Analizi

16S rRNA gen bölgelerinin baz dizilimlerinin analizi, hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinden ~50 µl alınarak, Oligomer Biyoteknoloji firmasına (Türkiye) gönderilmiş ve firma tarafından gönderilen sekans sonuçları "BioEdit programı" aracılığı ile analiz edilmiştir. Fasta formatına çevrilmiş sekans dizileri anlamlı hale getirildikten sonra, "BLAST programı" aracılığıyla analiz edilmiş ve Gen Bankasındaki dizilerle kıyaslama yapıldıktan sonra, kanserli kolon dokularından izole edilen bakterilerin tür seviyesinde tanısı gerçekleştirilmiştir (Adiguzel *et al.* 2015)

3.2.3 Bakterilerden Kültür Filtratı Eldesi

Bakteri izolatları, tek bir koloni olacak şekilde öze yardımı ile alınarak 100 ml hacminde hazırlanan TSB içerisine inokule edilerek 37°C'de mikroaerofilik ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler maksimum hızda 15 dk boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek, cell-free supernatant: kültür filtratı elde edilmiştir (Dusane *et al.* 2013).

3.2.4 Bakteriyel Protein İzolasyonu

Bakteriyel proteinlerin izolasyonu, Schnaitman metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 1g bakteri soğuk PBS ile üç kez yıkanarak oluşan bakteriyel pellet, EDTA (1 mM/L) ve fenimetilsülfonilflorid (PMSF) (1 mM/L) içeren 10 ml'lik pH'sı 7.8 olan Tris.HCl (0.050 M) içerisinde çözündürülmüştür. Bakteriyel süspansiyon her biri 45 s olacak şekilde 2 dk ara verilerek 8 kez sonike edilmiştir (150 MSE). Sonikasyon sonucunda parçalanmış hücreler, 1.500 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Bakteriyel pellet, 10 ml'lik pH'sı 7.8 olan Tris.HCl (0.050 M) içerisinde yeniden çözündürülerek final konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde DNase ve RNase (Sigma-Aldrich, USA) eklenmiştir. Süspansiyon 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra 150.000 g'de 4°C'de 45 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Oluşan pellet 10 ml hacimdeki %2'lik Sarcosine (Sigma-Aldrich, USA) içinde çözündürülmüş ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak, pellet nazikçe PBS ile yıkanmış ve pH'sı 7.8 olan 1 mM PMSF içeren 1ml PBS içinde yeniden çözündürülmüştür (Sheikhian *et al.* 2004).

3.2.5 Bakteriyel Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen proteinlerin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. 96 kuyucuklu plâtelere, hazırlanan 1X Bradford solüsyonundan 90 µl eklenerek üzerine 10 µl protein örneği ilave edilmiştir. Plâtelere, 10 dk inkübasyona bırakılmış ve ardından 595 nm'de ölçüm alınmıştır. Bovine Serum Albümin (BSA) ile hazırlanan standart grafiği baz alınarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.6 Kültür Filtratı ve Bakteriyel Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi

Kültür filtratı ve total proteinlerin analizi için kullanılan SDS-PAGE'de, %15'lik ayırma ve yükleme jeli kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan kültür filtratı ve protein örnekleri; ayırma jeli için total hacim 5 ml, yükleme jeli için ise 2,5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Ardından yükleme jeli ayırma jelinin üzerine dökülerek polimerleşmesi için 45 dk beklenilmiştir. Hazırlanan kültür filtratlarından 15 µl alınarak 5 µl boya (60 µl laemmler boya +6 µl β-merkaptoetanol) ile karıştırılmış ve 100 °C'de 5 dk denatüre

edildikten sonra buz üzerine alınmıştır. 5 dk'lık inkübasyon süresi sonunda sisteme yüklenerek 75 V'ta yaklaşık 3-4 saat boyunca yürütülmüştür. Tüm örnekler Coomassie blue ile görünür hale getirilmiştir. Aynı yöntem protein örneklerinin analizi için de gerçekleştirilmiştir (Sheikhian *et al.* 2004).

3.2.7 Hücre Kültürü

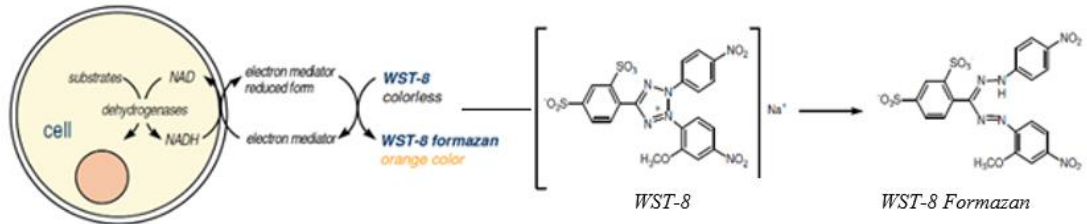
Çalışmada kullanılan sağlıklı fibroblast hücre hattı flasklarda tek katman olacak şekilde %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisinde 37°C'de, pH dengesinin korunması için %5 CO₂ içeren ortamda büyütülmüştür. %70-80 konfluense ulaşan hücreler haftada en az iki kez pasajlanarak çoğaltılmıştır. Flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak, PBS (Phosphate Buffered Saline) ile üç kez yıkanmış ve % 0,1 trypsin/EDTA eklenerek 5 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler flask tabanından tamamen ayrılınca, tripsini inhibe etmek amacıyla besiyeri eklenmiş ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisinde 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve besiyeri ile yeni flaska süspanse edilmiştir.

3.2.8 Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi

WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)- 5-(2,4-disulfophenyl)-2H -tetrazolium, monosodium salt] negatif yüklü bir bileşik olması nedeniyle hücre membranını geçememekte, ortamda bir elektron alıcı molekül varsa indirgenmekte ve suda çözülebilir bir formazan boya üretmektedir. WST-8, hücrelerdeki dehidrojenaz enzimleri ile indirgenerek hücre kültürü ortamında çözünür olan turuncu renkli bir ürün (formazan) oluşturmaktadır (Şekil 3.1). Hücrelerdeki dehidrojenazlar tarafından üretilen formazan boyası miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olduğundan hücre proliferasyonunun direkt bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle WST- 8'in canlı hücreleri saptama hassasiyeti, diğer tetrazolyum tuzları olan MTT, XTT, MTS veya WST-1'den daha yüksektir. Bu amaçla sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanacak optimum kültür filtratı ve protein konsantrasyonunu belirlemek için çalışmada WST-8 hücre proliferasyon testi yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada WST-8 miktar ölçümüne dayanan Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8) kullanılmıştır. Her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platalere sağlıklı fibroblast hücreleri inkübe edilmiş ve hücre kültürü %70-80 konfluense ulaştıktan sonra belirlenen doz konsantrasyonlarında (%6,25, %12,5, %25, %50 ve %100) izole edilmiş bakteriyal kültür filtratları ve (31,25; 62,5; 125; 250 $\mu\text{g/ml}$) proteinler ayrı ayrı kuyucuklara 6 tekrar olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu olarak, herhangi bir madde uygulanmamış hücelere ait kuyucuk kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra her kuyucuğa steril ve karanlık koşullarda kuyucuk hacminin %10'u kadar WST-8 solüsyonu eklenmiş ve kültürler 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 3-4 saat inkübe edildikten sonra, 96 kuyucuklu plate, spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutulmuş ve absorbans değerleri elde edilmiştir. Uygulanan her doz için formüle göre yüzde canlılık ve sitotoksosite değerleri hesaplanarak apoptozun saptaması için uygulanacak deneylerde uygun kültür filtratı ve protein konsantrasyon aralığı belirlenmiştir.



Şekil 3.1 WST-8 ile Formazan Bileşiğinin Oluşumu

3.2.9 Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

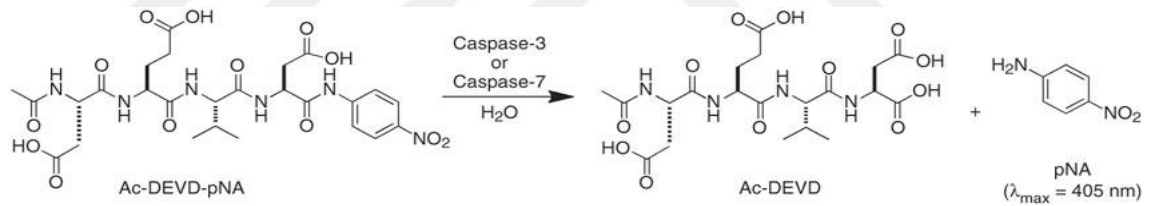
Elde edilen kültür filtratlarının ve izole edilen proteinlerin eritrosit hücrelerine olan etkisini değerlendirmek için hemolitik aktivite testi yapılmıştır. Ticari olarak satın alınmış tam kan örneğinden 4 ml alınmış ve üzerine 8 ml D-PBS (Dulbecco's phosphate- buffered saline) eklenmiştir. Serumdan kırmızı kan hücrelerini ayırmak için 10016 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santifügasyon sonrasında 5 kez steril D-PBS ile yıkanan kırmızı kan hücreleri 40 ml D-PBS ile yeniden dilüe edilmiştir. Dilüe edilen kırmızı kan hücrelerinden 200 μl alınarak üzerine 800 μl belirlenen konsantrasyonlarda (%25, %50 ve %100) izole edilmiş bakteriyal kültür filtratları ve (31,25; 62,5; IC50 $\mu\text{g/ml}$) proteinler eklenmiştir. Hazırlanan süspansiyon kısa süre vortekslenmiş ve oda

3. MATERYAL ve YÖNTEM

sıcaklığında statik konumda 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, örnekler tekrar kısa süre vortekslenmiş ve 10016 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Her bir örnekten alınan 100 µl supernatant, 96 kuyucuklu plakelere aktarılmış ve hemoglobinin maksimum absorbans gösterdiği 577 nm'de ölçüm alınmıştır. Referans dalgaboyu olarak 655 nm kullanılmıştır. 200 µl dilüe edilmiş kırmızı kan hücresi + 800 µl dH₂O pozitif kontrol olarak, 200 µl dilüe edilmiş kırmızı kan hücresi + 800 µl D-PBS ise negatif kontrol olarak kullanılmış ve her bir örnek için 3 tekrar çalışılmıştır.

3.2.10 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması

Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler apoptozun tayininde kullanılan en önemli belirteçlerden birini oluşturmaktadır. Bu metotta DEVD-pNA, kaspaz-3 enzimi için işaretlenmiş bir substrat olarak kullanılmakta ve enzim aktivitesi sonucu kromofor p-nitroanilid (pNA) 'in 405 nm'deki absorbans değerine göre sonuçlar elde edilmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Reaksiyonu

Bu amaçla çalışmada Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kiti (BioVision) kullanılmıştır. Kit prosedürüne uygun olarak 6 kuyucuklu plakelere, her kuyucukta 1x10⁶ sağlıklı fibroblast hücreleri / 2 ml olacak şekilde ekim yapılmış; CVDK-8 analizi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda (%50 ve %100) kültür filtratı ve IC50 (*K. pneumoniae* izolatları için 46 µg/ml, 46 µg/ml, 92 µg/ml, *E. coli* izolatı için 46 µg/ml ve *A. baumannii* izolatı için ise 47 µg/ml) değerinde protein örnekleri hücre hattı üzerine uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonucunda, kuyucuklardaki hücreler tripsin yardımı ile kaldırılmış ve 15 ml'lik falkonlar içerisine toplanmıştır. Hücrelerin alındığı kuyucuklar soğuk 1X'lik PBS ile yıkanmış ve daha önceden toplanan hücreler falkonlara eklenmiştir. Ardından 1000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmış ve pellet 50 µl soğuk "Cell Lysis Buffer" içerisinde çözündürüldükten

sonra steril ependorflara alınarak, 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 10.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek alınan süpernatantlar steril ependorflara aktarılarak üzerlerine 100 µl “Cell Lysis Buffer” eklenmiştir. Total hacmin yarısı, Bradford testi için ayrılmıştır. Her bir örnekten 50 µl alınarak iki tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu platalere aktarılmıştır. Karanlıkta her bir kuyucuğa 50 µl “2X Reaction Buffer” (10 mM Dithiothreitol (DTT) içermeli) ve 5 µl DEVD-pNA eklenerek 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 405 nm’de ölçüm alınmıştır. Protein konsantrasyonunu belirlemek için yönteminde standart olarak BSA kullanılmıştır. 1:25, 1:50 ve 1:100 oranlarında seyreltilerek hazırlanan standart protein örnekleri 25 µl hacimde olacak şekilde 96 kuyucuklu platalere iki tekrarlı olarak ekilmiştir. Bradford reaktifi olarak “Coomassie blue G-250” boyası her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 595 nm’de spektrofotometrede ölçüm alınmıştır.

3.2.11 Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki (MMP) Azalmanın Saptanması

Apoptozun belirlenmesinde, Kaspaz-3 enzim aktivitesini konfirme etmek için, önemli belirteçlerden biri de mitokondriyal enzim aktivitesindeki azalmanın saptanmasıdır. Bu amaçla sitoflorimetrik, lipofilik ve katyonik bir boya olan JC-1 kullanılmaktadır. Yaşayan hücrelerde mitokondri içerisinde birikmekte olan bu boya agregatlar oluşturmakta ve bunun sonucunda kırmızı floresan ışımaya vermektedir. Apoptotik veya ölü hücrelerde boya mitokondriye geçemediğinden sitoplazmada monomer formda kalarak, yeşil floresan ışımaya vermektedir. Yeşil floresanın kırmızı floresana oranı mitokondriyal membran potansiyel oranındaki azalmayı göstermektedir. Bu amaçla çalışmada JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Cayman) kullanılmıştır. Kit prosedürüne uygun olarak 6 kuyucuklu platalere, her kuyucukta 1×10^6 sağlıklı fibroblast hücreleri / 2 ml hücre olacak şekilde ekim yapılarak CVDK-8 analizi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda (%50 ve %100) kültür filtratı ve IC50 değerinde protein örnekleri hücrelerin üzerine uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonucunda, kuyucuklardaki hücreler tripsin yardımı ile kaldırılmış ve 15 ml’lik falkonlar içerisine toplanmıştır. Hücrelerin alındığı kuyucuklar soğuk 1X’lik PBS ile yıkanmış ve daha önceden toplanan hücreler falkonlara eklenmiştir. Ardından 1000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmış ve pellet 300 µl full besiyeri içerisinde çözdürüldükten sonra üzerine 30 µl JC-1 boyası eklenerek pipetaj

yapılmıştır. Hücreler 37°C’de ~30 dk inkübe edildikten sonra 400 g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında süpernatant atılarak pellet 200 µl “Assay Buffer” içerisinde çözdürüldükten sonra tekrar 400 g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu basamak bir kez daha tekrar edilmiş ve son aşamada pellet üzerine 300 µl “Assay Buffer” eklendikten sonra her bir örnekten 100 µl alınarak, siyah 96 kuyucuklu plakelere aktarılarak yeşil floresan için 485 ve 535 nm, kırmızı floresan için 535 ve 595 nm’de spektrofotometrede ölçüm alınmıştır (Reers *et al.* 1991).

3.2.12 Annexin-V Analizi ile Apoptotik Hücre Populasyonunun Saptanması

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem de hücre membranı içerisinde bulunan fosfotidilserin (PS) lokasyonunun belirlenmesidir. Fosfotidilserin sağlıklı hücrelerde membranın iç kısmında yer almakta, apoptotik hücrelerde ise ekstraselüler kısımda bulunmaktadır. Bu durumun belirlenebilmesi için çalışmada “Annexin A5-FITC Kit-Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter)” kit protokolü izlenmiştir. Kit protokolüne uygun olarak 6 kuyucuklu plakelere, her kuyucukta 1×10^6 sağlıklı fibroblast hücreleri /2 ml olacak şekilde ekim yapılmış ve CVDK-8 analizi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda (%50) kültür filtratı ve IC50 değerinde protein örnekleri hücrelere uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonrası, hücreler toplanmış ve iki kez soğuk PBS ile yıkanarak 4°C’de 500 g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak oluşan pellet soğuk “1X Binding Buffer” içerisinde çözdürülmüş ve 100 µl hücre süspansiyonu için, buz üzerinde cam FACS tüpleri içerisine transfer edilmiştir. Her bir örneğin üzerine 5 µl propidyum iyodür (PI) ve 1 µl annexin A5-FITC eklenmiştir. Tüp buz üzerinde 15 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve son olarak 400 µl soğuk “1X Binding Buffer” eklenerek, sonuçlar flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.13 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Sağlıklı fibroblast hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda (%50) kültür filtratı ve IC50 değerinde protein örnekleri inokule edilmiş ve 48 saat sonunda PureLink™ RNA Mini Kiti (Invitrogen™) ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. Protole göre, hücreler oda sıcaklığında 12.000 g’de 2 dk santrifüj edilmiştir. RNA içeren sıvı fazın

hepsi yeni bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarılmış ve oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 s santrifüj edilmiştir. Örneklerin geri kalanı da aynı şekilde kolonlara aktarılarak santrifüj edilmiş ve kolondan geçmeleri sağlanmıştır. Kitin içerisindeki Wash I ve Wash II solüsyonları yıkama işlemleri için kullanılmıştır. Kolondaki örneklere 700 µl Wash I eklenerek 12.000 g'de 15 s santrifüj edildikten sonra 500 µl Wash II eklenerek yeniden 12.000 g'de 15 s santrifüj edilmiştir. Wash II solüsyonuyla yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Tüpün altındaki sıvı uzaklaştırılarak, kolon boş bir şekilde 12.000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Kolonlar toplama tüpünden çıkarılarak, steril ependorf tüpe takılmış ve üzerine 30 µl RNase içermeyen dH₂O eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 12.000 g'de 2 dk santrifüj edilerek RNA örnekleri ependorf tüpte toplanmıştır. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı nanodrop ile ölçülerek RNA miktarı tespit edilmiştir. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla, okunan en düşük RNA değeri standart olarak alınmıştır.

3.2.14 cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

cDNA sentezi için "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti" (Applied Biosystems™) kullanılmış ve üreticinin önerdiği protokol izlenmiştir. Buna göre cDNA sentezi için; 10µl RNA örneği, 2 µl 10X RT random primer, 2 µl 10X RT buffer, 0,8 µl 25X dNTP mix (100mM), 4,2 µl nükleaz içermeyen dH₂O ve son olarak da 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanılmıştır.

Hazırlanan örnekler, termal döngü cihazına yerleştirilerek 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde programlanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Seçilen genlere ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi için revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen genlere ait primerlerin sekansları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3 qRT-PCR’da Kullanılan Primerler

<i>Gen Adı</i>	<i>Forward Primer (5'- 3')</i>	<i>Reverse Primer (5'- 3')</i>
<i>APC</i>	CTGAGCGGCAGAATGAAG	TTGGTTCACAGATGACTTGT
<i>KRAS</i>	TTTTGTCTCCTTTCCACTGC	CCATTTCATACTGGGTCTGC
<i>SMAD</i>	ATTCACGCCGCCAGTTGT	CACTTTTCTTCCTGCCATT
<i>TP53</i>	GAGGATGGGGAGTAGGACAT	ATTCAACAGTGAGGGACAGC
<i>GAPDH</i>	TTCCCAAAGTCCTCCTGTTT	ATGGTGTCTGAGCGATGTG

Real Time-PCR da her bir reaksiyon üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için 2 µl cDNA, 5µl Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™), 2 µl nükleaz içermeyen dH₂O ve 0,5 µl primer olacak şekilde qRT-PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım vortekslendikten sonra, hava kabarcığı kalmaması ve örneklerin tamamamen dibe çökmesi amacıyla spin cihazında yaklaşık 1 dk santrifüj edilmiştir.

Hazır hale gelen örnekler “Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PCR cihazı”na yerleştirilmiş ve reaksiyon koşulları 50°C’de 2 dk, 95°C’de 10 dk x 40 döngü, 95°C’de 15 s ve 60°C’de 1 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada *GAPDH* referans gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır. RT-PCR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır.

3.2.15 İstatistiksel Analizler

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilen istatistiksel analizi, SPSS® versiyon 20.0 ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Kolon Biyopsi Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

Erzurum Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, kolon kanserli hastalardan alınan 10 adet biyopsi örneği PBS ile yıkandıktan sonra %1 glikoz içeren TSB içerisine inokule edilmiştir. Alınan biyopsi örneklerinin sadece 5 tanesinden bakteriyel izolatlar elde edilmiştir. Gelişen organizmaların tamamı sıvı kültürden alınarak TSA besiyerine ekilmiş ve 37°C'de mikroaerofilik koşullarda 1 gün boyunca inkübe edilmiştir. Gelişen bakteri kolonileri incelenerek, morfolojik olarak farklı olanlar belirlenmiş ve akabinde saf kültür elde etmek amacıyla yeni besiyerine ekimleri yapılmıştır. Mikroaerofilik koşullardaki, 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen saf kültürlerin, 500 µl LB broth + 500 µl %30'luk gliserol içeren tüplere alınarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de stok kültürleri hazırlanmıştır.

4.2 Bakterilerin Tanılanması

4.2.1 Bakterilerin Klasik Yöntemlerle Tanılanması

Kolorektal kanserli hastalardan alınan biyopsi örneklerinden izole edilen bakterilerin tanılanması için ilk olarak morfolojik testler yapılmıştır. Bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri (hücre ve koloni şekli, rengi ve gram boyama) yanında biyokimyasal farklılıklarını ortaya koymak amacıyla oksidaz, üreaz ve katalaz testleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

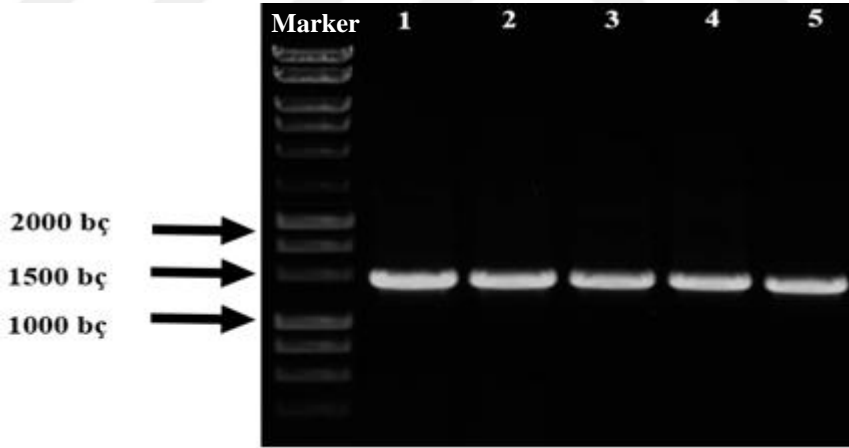
İzolat Kodu	Morfolojik Testler				Biyokimyasal Testler		
	Hücre Morfolojisi	Koloni Şekli	Koloni Rengi	Gram Boyama	Oksidaz Testi	Üreaz Testi	Katalaz Testi
<i>FNK1</i>	Çubuk	Düz	Krem	-	+	+	+
<i>FNK2</i>	Çubuk	Düz	Krem	-	+	+	+
<i>FNK3</i>	Çubuk	Düz	Krem	-	+	+	+
<i>FNK4</i>	Çubuk	Düz	Krem	-	+	-	+
<i>FNK5</i>	Kokobasil	Düz	Krem	-	-	-	+

4.2.2 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanınması

Bakterilerin DNA izolasyonu “PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen” protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA’ların konsantrasyonları FNK1: 89,59 ng/µl; FNK2: 141,4 ng/µl; FNK3: 81,18 ng/µl; FNK4: 289,6 ng/µl ve FNK5: 319 ng/µl olarak tespit edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri, sonraki aşamalarda kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Bakterilerin 16S rRNA Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

Bakteriyel izolatların tanısında kullanılan 16S rRNA bölgeleri universal primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiş ve PCR ürünleri %1 olarak hazırlanan agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.1) (ürünlerin boyu ~1450 baz çifti uzunluğundadır).



Şekil 4.1 İzolatların 16S rRNA Bölgelerinin Elektroforez Görüntüsü

Elektroforezde ayrıştırılan 16S rRNA gen bölgesi ürünleri sekansa gönderilmeden önce “PureLink™ PCR Purification Kit” kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırılan PCR ürünlerinin dizi analizi çift yönlü olarak hizmet alımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler Bioedit Programı ve Blast algoritması (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak GenBank’ta kayıtlı diğer türlerle karşılaştırılmıştır. 16S rRNA bölgelerinin karşılaştırılması sonucunda izolatlardan

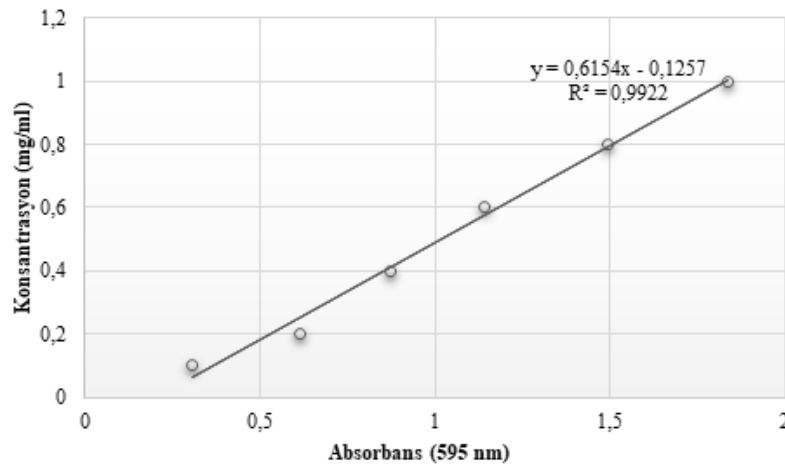
şubelerine ait türlerin varlığı tespit edilmiş olup, dispeptik olmayan hastalarda ise bu izolatlardan sadece *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakteri türlerinin varlığı ortaya konulmuştur. Benzer şekilde, Cremonasi *et al.* (2018)'da kolorektal kanserli hastalardan alınan örneklerden bakteri izolasyonları gerçekleştirmiş ve elde edilen organizmaların 16S rRNA sekans analizi ile Bacteroidetes, Firmicutes ve Proteobakteri şubelerine ait olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla yaptığımız izolasyon sonuçları literatürdeki verileri destekler niteliktedir.

4.3 Bakteriyel Kültür Filtratı Eldesi

Kolon biyopsi örneklerinden izole edilen kültür filtratları, *in vitro* çalışmalarda kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

4.4 Bakteriyel Protein Eldesi

Bakteri izolatlarının total protein izolasyonu Sheikhian *et al.* (2004) tarafından önerilen metod modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinlerin tayini ve konsantrasyonlarının tespiti amacıyla, duyarlılığı yüksek olan Bradford testi kullanılmıştır (Bradford 1976). BSA proteini kullanılarak hazırlanan standart grafikten (Şekil 4.3) yararlanarak protein konsantrasyonları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. İzole edilen ve konsantrasyonları ayarlanan proteinler kullanılmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



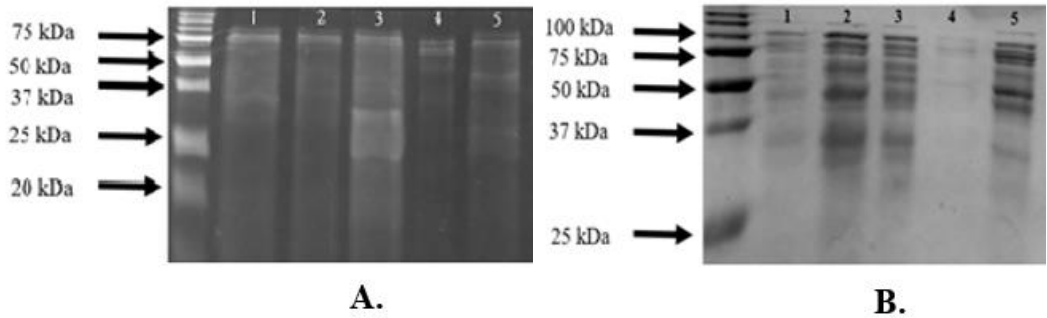
Şekil 4.3 BSA Standart Grafik

Çizelge 4.3 Total Protein Konsantrasyonları

<i>İzolat Adı</i>	Protein Konsantrasyonları (mg/ml)
<i>FNK1</i>	0,535
<i>FNK2</i>	0,797
<i>FNK3</i>	0,652
<i>FNK4</i>	0,142
<i>FNK5</i>	0,687

4.5 Kültür Filtratı ve Bakteriyel Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi

Elde edilen kültür filtratı ve proteinlerin SDS PAGE ile analizi için, %15'lik ayırma ve yükleme jeli kullanılmıştır. Yapılan SDS-PAGE analizleri sonucunda kültür filtratı ve total proteinlere ait bant profillerinin oldukça değişken olduğu görülmüştür. Şekil 4.4'de görüldüğü üzere kültür filtratlarının 20 - 75 kDa aralığında protein bant profiline sahip olduğu, izole edilen proteinlerin ise 25 - 100 kDa arasında bant profilleri sergilediği belirlenmiştir. Şekil 4.4.A'da protein markırından sonra gelen ilk üç sıra *K. pneumoniae*'ye ait kültür filtratı içerisindeki ekstrasellüler proteinleri, Şekil 4.4.B ise total proteinleri göstermektedir. Jel görüntüleri incelendiğinde *K. pneumoniae*'ye ait ekstrasellüler proteinlerin 75 kDa büyüklüğüne sahip olduğu, total protein izolasyon jel görüntülerinde ise, 25-100 kDa arası proteinlerin var olduğu görülmektedir. Jel görüntüsünün 4. sırasında ise 50-100 kDa aralığında *E. coli*'ye ait ekstrasellüler ve bakteriye ait total proteinlerin varlığı görülmektedir. Jel görüntüsünün son sırasında yer alan *A. baumannii*'nin ise, *K. pneumoniae* ile benzer protein profiline sahip olduğu görülmektedir.

**Şekil 4.4** A: Kültür Filtratı SDS-PAGE Profili, B: Total Protein SDS-PAGE Profili

Benedi *et al.* (1989) tarafından yapılan bir çalışmada farklı *K. pneumoniae* izolatlarından dış membran protein izolasyonu gerçekleştirmiş ve proteinlerin 14,5-92 kDa arasında bir profile sahip olduğu bildirilmiştir. *K. pneumoniae*'deki ilaç dirençliliği mekanizmasını araştıran Marques *et al.* (2011), yapmış olduğu çalışmada, ATCC 4353 kodlu *K. pneumoniae*'ye ait proteinleri kontrol olarak kullanarak, tüm sefalosporinlere dirençli başka bir *K. pneumoniae*'ye ait protein profillerini karşılaştırmış ve ilaç dirençliliğinden sorumlu olabilecek porin protein büyüklüğünün 30-43 kDa arasında olabileceği sonucuna varmışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise Brinkworth *et al.* (2015) farklı besiyerlerinde büyütülen *K. pneumoniae*'ye ait protein profillerinin 38-203 kDa arasında olduğunu göstermişlerdir. Perla (2016) yaptığı çalışmada, *K. pneumoniae*'de 66 kDa büyüklüğünde dış zar proteinlerinden olan effluks pompasının aşırı eksprese edildiğini göstermiş ve bu pompanın ilaç dirençliliğine neden olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda *K. pneumoniae* izolatları kolon biyopsi örneklerinden izole edildikten sonra, ilk olarak TSA'da büyütülmüş ardından kolonilerden seçilen tek ve saf bir koloni, çizgi ekim yöntemiyle içerisinde trimethoprim, sefosporinlerden sefsulodin, vankomisin ve amfoterisin B içeren ve "Laked Horse Blood (Thermo)" eklenmiş "Columbia Blood Agar Base" içerisinde geliştirilmiştir. Organizmaların bu selektif besi ortamında sorunsuz bir şekilde geliştiği gözlenmiş ve bu ortamda geliştirilen *K. pneumoniae*'den elde edilen protein profilleri incelendiği zaman, yaklaşık 66 kDa büyüklüğünde protein bant profiline rastlanılmıştır. Perla (2016) yaptığı çalışmada *K. pneumoniae*'den 66 kDa büyüklüğünde dış zar proteinini izole etmiş ve bu proteinin effluks pompasının aşırı ekspresyonu sonucu oluştuğunu ve proteinin organizmanın antibiyotik dirençliliğinden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Literatür bilgisinden ve yapılan deneyden yola çıkılarak elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarının ilaç dirençliliğine sahip olabileceği sonucuna varılabilmektedir.

Ouellet *et al.* (2001) yaptıkları bir çalışmada *E. coli*'den total protein izolasyonu gerçekleştirmişler ve protein bant profillerinin 21-100 kDa arasında değişkenlik gösterdiğini SDS-PAGE analizi ile rapor etmişlerdir. Çalışma kapsamında izole edilen *E. coli* bant profilleri incelendiğinde 50-100 kDa arasında protein örneklerinin varlığı

görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları total protein açısından benzer niteliktedir.

Jyothisri *et al.* (1999) yaptıkları çalışmada OmpAb isimli, monomerik formda bulunan, 40 kDa büyüklüğünde bir porin proteinin *A. baumannii* permeabilitesinde çok önemli bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu proteinin yanı sıra, 33, 36 ve 44 kDa'luk büyüklüğe sahip protein profillerinin de varlığını yaptıkları deneyler sonucunda göstermişleridir. Kwon *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada ise *A. baumannii*'ye ait "dış membran vesikülleri" (OMV) ile ilişkili 132 farklı protein tanımlamışlar ve bu proteinlerin bant profillerinin 14-200 kDa arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Dış zar vesiküllerinin salgılanması, Gram negatif bakterilerin, konakçı hücrelere efektör molekülleri dağıtabilmesi için kullandığı başlıca mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. Tanımlanan 132 proteinden 26 tanesinin dış membranda, 6 tanesinin periplazmik boşlukta, 8 tanesinin iç membranda, 43 tanesinin sitoplazmada ve 49 tanesinin ise lokasyonunun henüz bilinmediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca *A. baumannii*'nin *in vitro* büyüme sırasında OMV'leri salgıladığı ve *A. baumannii*'den türetilen OMV'lerin, birden fazla virülansla ilişkili proteinleri ve patojen ilişkili moleküler patternleri (PAMP) eşzamanlı olarak konakçı hücrelere salgıladığı sonucuna da ulaşmışlardır. Buna göre, *A. baumannii*'den salgılanan OMV'ler, efektör moleküllerin konakçı hücrelere taşınması için sekretuar araçlar olarak hizmet etmektedir. *A. baumannii* izolatından elde ettiğimiz protein bantları incelendiği zaman verilen literatür bilgileri ile benzer bazı profiller sergilediği görülmektedir.

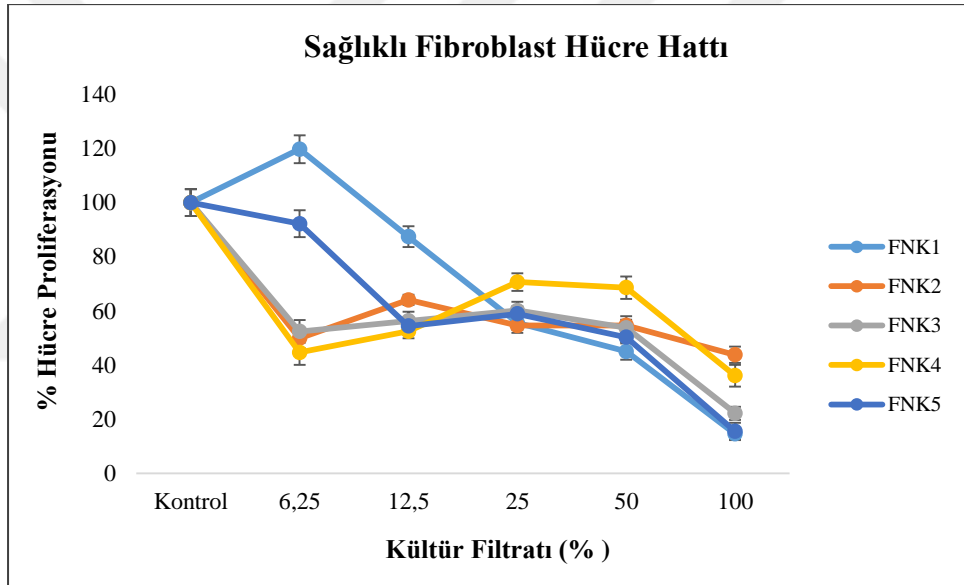
4.6 Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi

Çalışmada kullanılan sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerinde bakterilerin kültür filtratları ve proteinlerinin etkisini tespit etmek amacıyla WST-8 testi uygulanmıştır. Uygulama kültür filtratı ve protein için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Kültür filtratının farklı yüzdelerde (%6,25; %12,5; %25; %50 ve %100) 48 saat süre ile sağlıklı hücre hattına uygulanması neticesinde hücrelerin % canlılık oranları ayrı ayrı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Grafikten de anlaşılacağı üzere %100'lük kültür filtratı uygulaması sonucunda hücrelerin kontrol grubuna kıyasla canlılık oranlarının *K. pneumoniae* izolatları için; % 14,57; % 43,79 ve % 22,19; *E. coli* izolatı için, % 36,07 ve *A.*

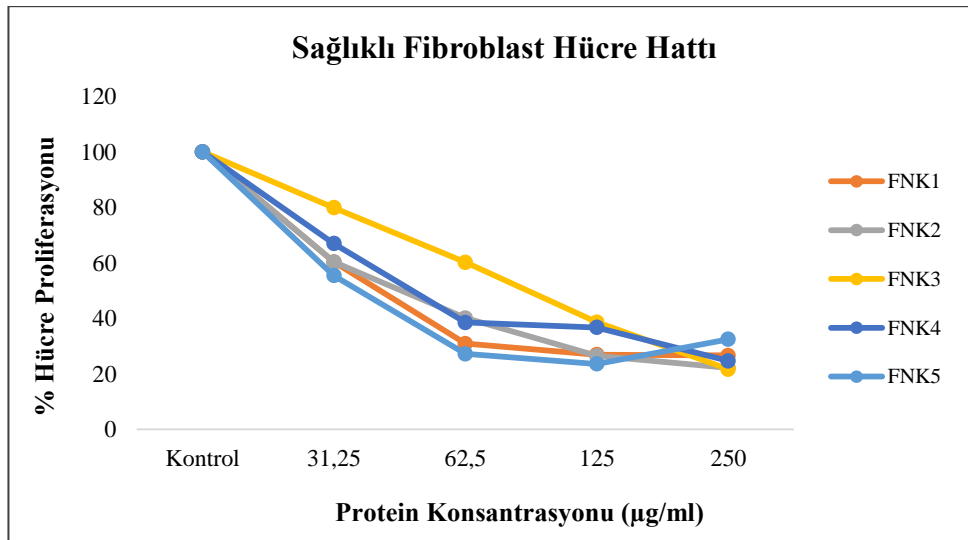
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

baumannii izolatu için ise % 15,53'e kadar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.5.). Bu nedenle sonraki *in vitro* çalışmalarda IC50 değerinde (%50 ve %100) ilk iki dozun uygulanması tercih edilmiştir.

Bakteriyel izolatlardan elde edilen total proteinler ise 31,25; 62,5; 125 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre hattına 48 saat süre ile uygulanmış ve inkübasyon sonucunda IC50 değerleri sırasıyla, *K. pneumoniae* izolatları için 46 µg/ml, 46 µg/ml, 92 µg/ml, *E. coli* izolatu için 46 µg/ml ve *A. baumannii* izolatu için ise 47 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.6.). Bu nedenle sonraki çalışmalar IC50 değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5 Kültür Filtratlarının Sitotoksik Aktivitesi



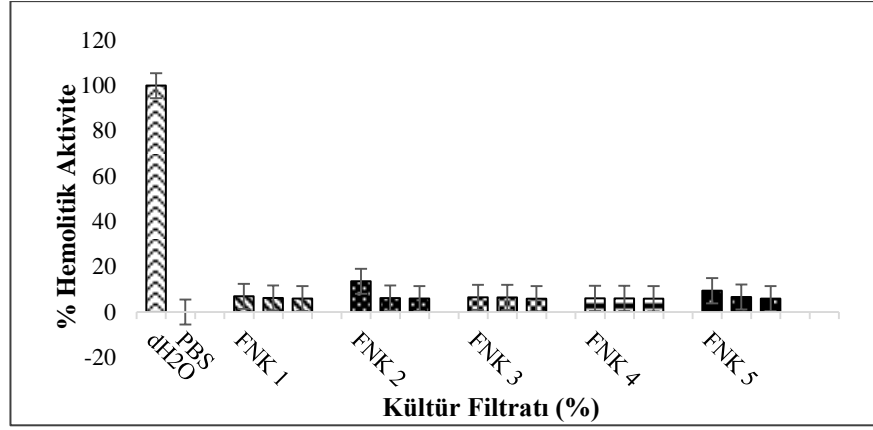
Şekil 4.6 Proteinlerin Sitotoksik Aktivitesi

Yaptığımız deneyin sonuçlarını destekler nitelikteki çalışma Rajalingam *et al.* (2001) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada araştırmacılar, *Chlamydia pneumoniae*'nin *in vitro* koşullardaki etkisini gözlemlemek için larinks kanserinden türevlenen HEp-2 hücre hattını kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre 0,5- 5 5 Multiplicity of Infection (MOI) oranında *C. pneumoniae* ile enfekte edilen hücrelerde, toksik bir etkinin gözlenmediği ancak oranın >10 olması durumunda ise, hücrelerin ölüme gittiği sonucuna varmışlardır. Ölümün hangi yolak üzerinden gerçekleştiği ise, propidyum iyodür (PI) ve annexin-V boyaları ile ortaya konulmuştur. Enfeksiyon oranının ölçülmesi için kullanılan MOI oranının 10 ve 50 olması durumunda, hücredeki canlılığın %41 ve %73 oranlarına kadar gerilediği ve hücrelerin nekroz aracılığıyla ölüme gittiği bildirilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, Phonnok *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada, 394 mikrobiyal ekstraktın 5 farklı kanser hücre hattı (servikal kanser (HeLa), karaciğer kanseri (HepG2), meme kanseri (MCF-7), lösemi (U937), Vero, PBMC) üzerindeki anti-proliferatif etkisini MTT testi ile incelemişlerdir. Elde edilen etanol ekstraktlarından 500 veya 1000 µg/ml uygulanarak, en güçlü büyüme inhibisyonu göstereceği düşünülen 4 izolat (*Candida tropicalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* sp.) seçilerek çalışmaya devam edilmiştir. Ancak *C. tropicalis* ve *A. baumannii*'nin hücrelerdeki büyümeyi inhibe etmediği sonucuna ulaşılmıştır. Hücrelerdeki apoptotik hücre ölümü Hoechst 33342 boyama ile floresan invert mikroskop altında gözlenmiştir. Ardından DNA Ladder testi ile ekstrakt uygulanan (500 µg/ml) hücreler ile kontrol grubu karşılaştırılmış ve elektroforezde smear bir görüntü elde edilmiştir. Ekstrakt uygulandıktan sonra Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler incelenmiş ve Vero ve PBMC hücre hatları dışındaki diğer hücrelerde kaspaz-3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre artış meydana geldiği rapor edilmiştir. Smani *et al.* (2011), *A. baumannii*'ye ait üç farklı izolatın (ATCC 19606, 1327_M, ve 113-16) insan akciğer epitel hücre hattı (A549) üzerindeki hücre canlılığı, apoptoz, serbest radikal oluşumu ve sitokin üretimi gibi özelliklerini azaltmak için, sitoprotektif özellik gösteren rifampin makrosiklik antimikrobiyal ajanının etkisini araştırmışlardır. MIC değerleri belirlenen *A. baumannii* izolatlarının 0.5x, 1x ve 2x MIC değerleri rifampin antibiyotiği varlığı ve yokluğunda hücre hattına uygulanarak MTT testi ile sonuçlar alınmıştır. Rifampin yokluğunda ATCC 19606, 1327_M ve 113-16 izolatları için hücre canlılığı sırasıyla, % 59.57 ± % 15.37, %72.92 ± %1.87 ve %75.88 ± %6.9'e kadar düşerken, rifampin varlığında hücre canlılığının arttığı ve oranların %78.3 ± %6.58, %83.81 ± %6.96 ve %87.88 ± %6.58 olduğu rapor edilmiştir.

Krzywińska *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada, 17 farklı *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* izolatu kullanmışlar ve bu izolatların epitel hücreler (Hep-2) ile olan interaksyonu sonucu %50'sinden fazlasında apoptozun ayırt edici özelliklerini gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Tayabali *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada 7 farklı *Acinetobacter* türü (*baumannii*, Ab; *calcoaceticus*, Ac; *guillouiae*, Ag; *haemolyticus*, Ah; *lwoffii*, Al; *junii*, Aj ve *venetianus*, Av-RAG-1) kullanılmış ve kolonik epitel hücre hattı (HT29) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre hattı üzerinde Av-RAG-1 dışındaki tüm bakteri izolatlarının gelişim gösterdiği gözlenmiştir. Ab ve Ah türlerinin diğer türlere kıyasla en az iki kat daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ah ve Av-RAG-1 türlerinde güçlü hemolitik aktivite görülürken, diğer bakteri türlerinde hemolitik aktivite gözlenmediği rapor edilmiştir. Zhao *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada, *H. pylori*'ye ait kültür filtratı -proteinlerinin insan gastrik epitel hücre hattı (GES-1) ve gastrik kanser hücre hattı (AGS) üzerindeki proliferasyon ve apoptoz etkilerini belirlemek amacıyla, MTT analizi gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonucunda kültür filtratı -proteinlerinin konsantrasyona bağlı bir şekilde GES-1 ve AGS hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, GES-1 için canlılığın %61,4'e AGS için ise %68,7'ye kadar azaldığını göstermişlerdir. Kültür filtratı -proteinlerinin proliferasyonu azalttığı ancak apoptozu indüklemediği de yapılan çalışmada rapor edilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda bakteriyel izolatların büyük bir çoğunluğunun hücre canlılığını önemli derecede azalttığı tespit edilmiş olup bu bağlamda verilerimizin literatür ile uyumlu olduğunu söylemek mümkündür.

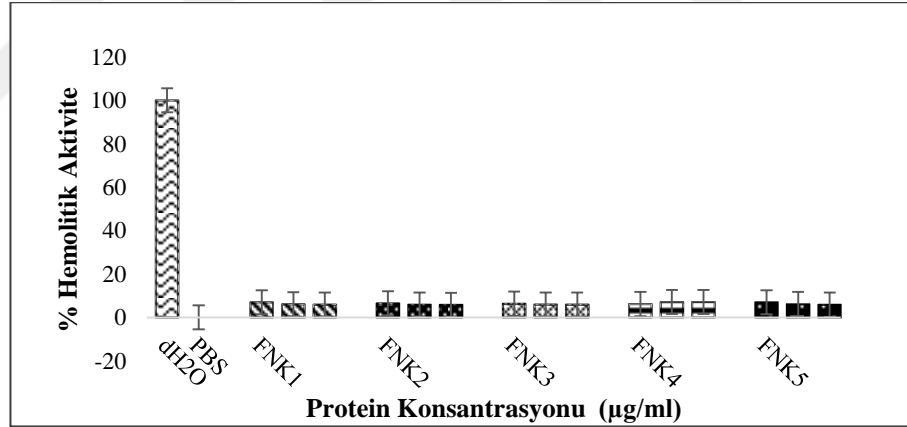
4.7 Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Hemolitik aktivite testleri ticari olarak satın alınan kan örneği ile gerçekleştirilmiş ve 200 µl dilüe edilmiş kırmızı kan hücresi + 800 µl dH₂O pozitif kontrol olarak, 200 µl dilüe edilmiş kırmızı kan hücresi + 800 µl D-PBS ise negatif kontrol olarak kullanılmış ve her bir örnek için 3 tekrar çalışılmıştır. Kültür filtratı ve proteinlere ait hemolitik aktivite grafikleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7 Kültür Filtratlarının Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

Bakterilere ait kültür filtratlarının memeli eritrosit hücreleri üzerine olan etkisini gözlemlemek için sırasıyla %100, %50 ve %25'lik kültür filtratları kan üzerine uygulanmış ve yapılan deneylerin pozitif kontrol ile karşılaştırılması sonucu, elde edilen kültür filtratlarının %100, %50 ve %25'lik dozlarının kanda hemoliz meydana getirmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.8 Proteinlerin Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

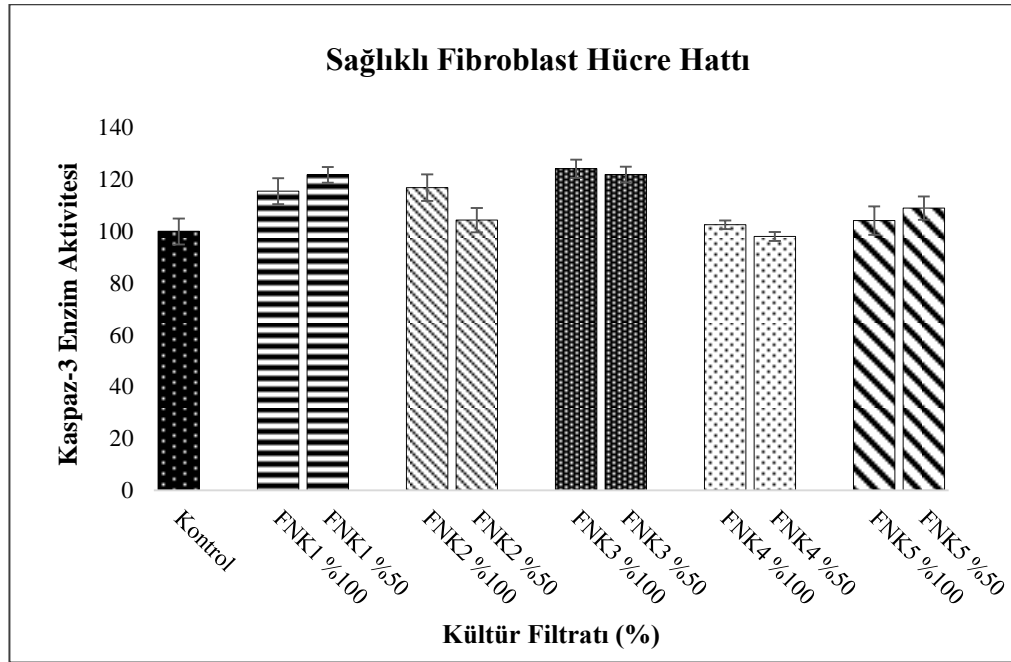
Bakterilere ait proteinlerin memeli eritrosit hücreleri üzerine olan etkisini gözlemlemek için *K. pneumoniae* izolatları için FNK1: (31,25; 46; 62,5) µg/ml, FNK2: (31,25; 46; 62,5) µg/ml, FNK3:(62,5; 92; 125) µg/ml, *E. coli* izolatı için FNK4: (31,25; 46; 62,5) µg/ml ve *A.baumannii* izolatı için ise FNK5: (31,25; 47; 62,5) µg/ml konsantrasyonlarında protein örnekleri uygulanarak, yapılan deneylerin pozitif kontrol ile karşılaştırılması sonucu, elde edilen proteinlerin uygulanan dozlarının kanda hemolize neden olmadığı gösterilmiştir.

Mikroorganizmaların hücrelerde hemolize neden olmadığı yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Tayabali *et al.* 2012). Çalışmamızın bulguları literatürü destekler niteliktedir.

4.8 Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması

Bakterilerden elde edilen kültür filtratı ve proteinlerin, sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmek için, kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler ve mitokondri membran potansiyelindeki değişiklikler (JC-1) iki önemli belirteç olarak kullanılmaktadır.

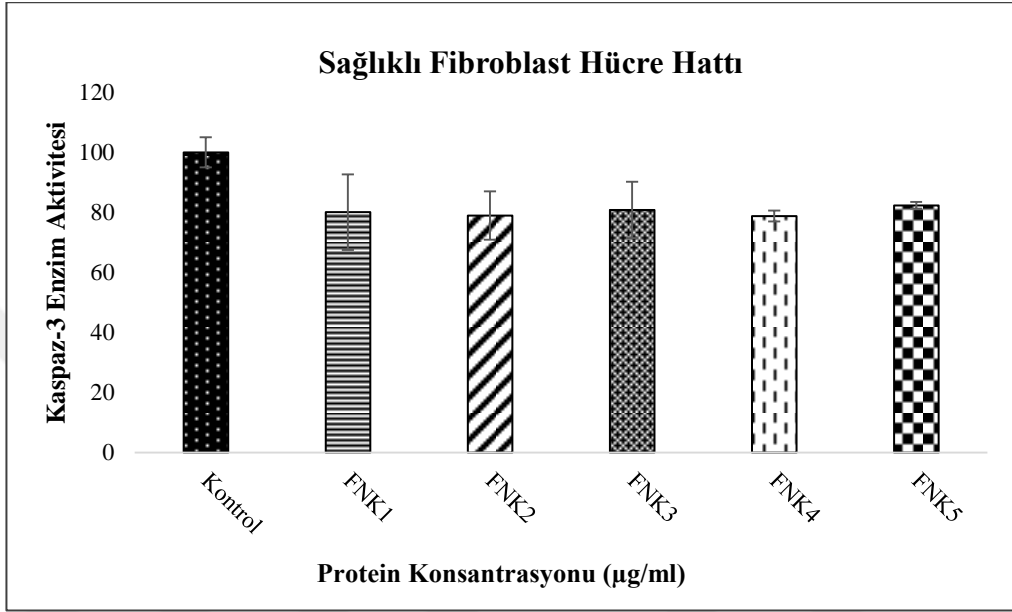
Bakteriyel izolatların kültür filtratları (%100 ve %50) sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerine uygulanmış ve kontrol grubu olarak ise herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler kullanılarak, 48 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, kaspaz-3 enzim aktivitesi sırasıyla, 1,15- ve 1,21- (FNK1), 1,16- ve 1,04- (FNK2), 1,24- ve 1,21- (FNK3), 1,02- (FNK4) ve 1,04- ve 1,08- (FNK5) kat artış ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.9.). Tüm örnekler üç tekrar çalışılmıştır.



Şekil 4.9 Kültür Filtratlarının Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kültür filtratı uygulamasının aksine sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerine IC50 değerlerinde uygulanan proteinlerin 48 saat süreyle muamelesi sonucu, kontrol grubu (hücre+besiyeri) ile kıyaslandığında, kaspaz-3 enzim aktivitesi sırasıyla, 0,80-; 0,78-; 0,80-; 0,78- ve 0,82- kat azalış ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.10.). Tüm örnekler üç tekrar çalışılmıştır.



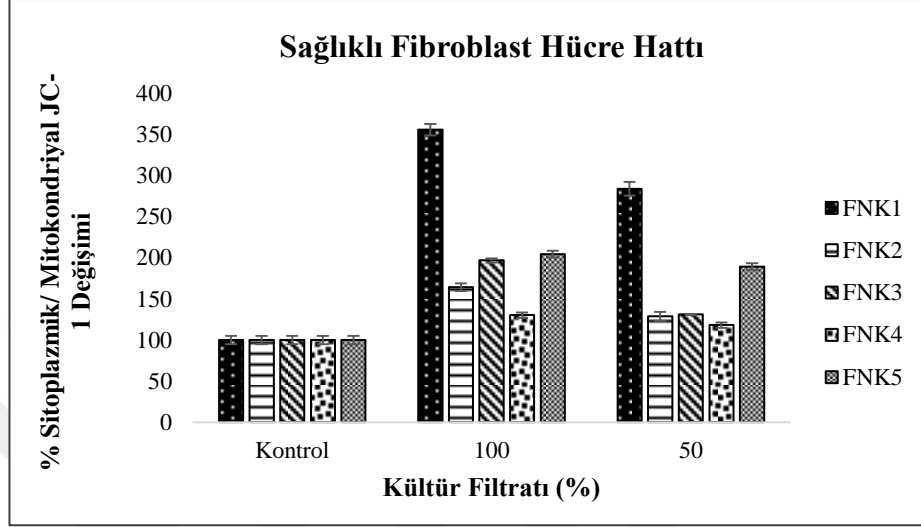
Şekil 4.10 Proteinlerin Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kaspaz-3, hücreleri apoptoza götüren önemli bir enzim olup, bu enzimin kültür filtratlarında artışa neden olurken proteinlerde azalışa neden olması, izole edilen bakterilere ait ekstrasellüler proteinlerin veya besi ortamına salgıladıkları sekonder metabolitlerin bu duruma neden olabileceğini düşündürmektedir.

4.9 Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki (MMP) Azalmanın Saptanması

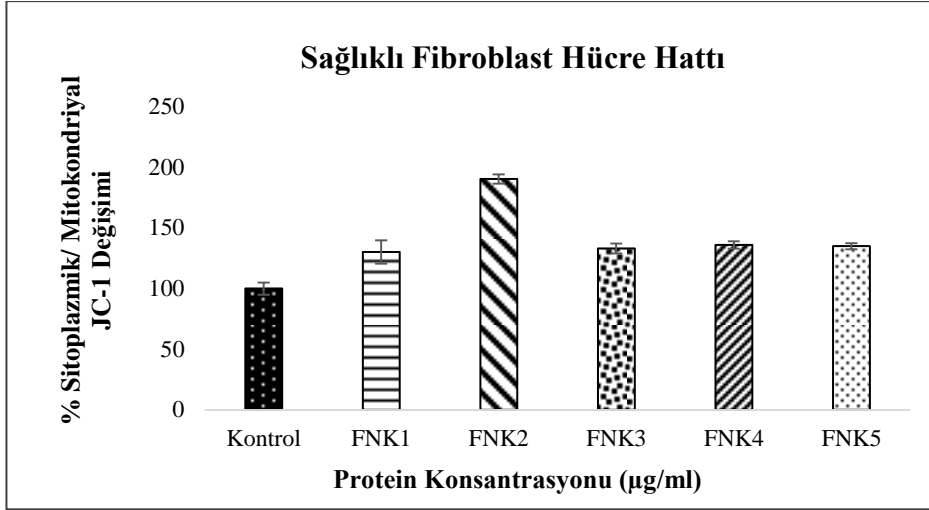
Bakteriyel izolatların kültür filtratı ve proteinlerinin hücre kültür ortamında sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerine olan mitokondriyal membran potansiyelindeki etkilerini belirlemek ve kaspaz-3 enzim aktivitesi sonuçlarını konfirme etmek için JC-1 analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kültür filtratlarına ait %100 ve %50'lik dozlar 48 saat süreyle sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanmış ve sonuçlar florimetrik olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler kullanılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında, %100'lük kültür filtratı uygulanan

hücrelerde sırasıyla 3,56-; 1,64; 1,96-; 1,30- ve 2,04- kat artış görülmüştür (Şekil 4.11). Bu sonuçlar, kaspaz-3 enzim aktivitesi verilerimiz ile uyuşmakta ve bakterilere ait kültür filtratlarının MMP kaybına yol açarak apoptozise neden olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.11 Kültür Filtratlarının Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

Proteinlere ait IC50 dozları (46 µg/ml, 46 µg/ml, 92 µg/ml, 46 µg/ml ve 47 µg/ml) 48 saat süreyle sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanmış ve sonuçlar florimetrik olarak değerlendirilmiştir. Tüm örnekler üç tekrar çalışılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında, IC50 dozları uygulanan hücrelerde sırasıyla 1,30-; 1,90-; 1,33-; 1,35- ve 1,34- kat artış görülmüştür (Şekil 4.12.). Proteinlerin kültür filtratı ile kıyaslandığında daha düşük Kaspaz-3 enzim aktivitesine sahip olduğunu ve mitokondriyal membran potansiyelinde ise daha az kayba neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, proteinlerin sağlıklı fibroblast hücre hattını, apoptoz dışında başka bir yolak ile ölüme götürdüğünü göstermektedir.



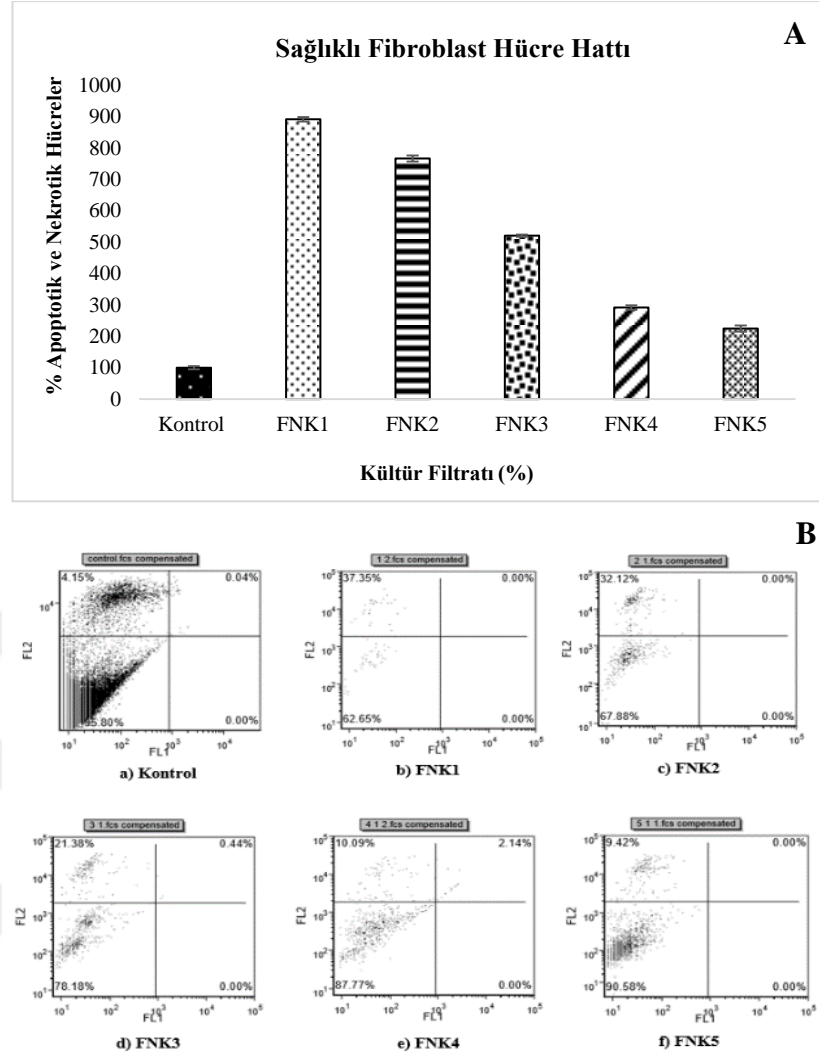
Şekil 4.12 Proteinlerin Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

Brasseur *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada, Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* 4R2 izolatına ait parasporin-2Aa1 proteininin (37 kDa) insan hepatosit kanser hücre hattı (HepG2), insan prostat kanser hücre hattı (PC-3), insan epitel kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (Caco-2), insan epitel serviks adenokarsinoma hücre hattı (HeLa), insan uterus endometriyum adenokarsinoma hücre hattı (Hec-1A ve KLE), insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MDA-MB231), insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7), insan non-tümörigenik epitel hücreleri (MCF-10A), insan epitel ovaryum adenokarsinoma hücre hattı (OVCAR-3) ve insan epitel ovaryum adenokarsinoma hücre hattı (SKOV-3) üzerindeki apoptotik etkilerini belirlemişlerdir. İzole edilen parasporin-2Aa1 proteininin kanser hücre hatları üzerinde, morfolojik değişikliklere neden olduğunu; kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivitesini artırarak apoptoz yolağını aktif hale getirdiğini rapor etmişlerdir. Propidyum iyodür ve annexin-V kullanılarak yapılan flow sitometri ölçümleri de apoptoz yolağının aktif hale geldiğini konfirme etmektedir. Bunun yanı sıra, apoptotik yolda rol oynadığı bilinen AKT, XIAP ve ERK1/2 gibi genlerin ekspresyonlarının inhibe edildiği ve tümör süpresör gen olan PAR-4 gen ekspresyonunun ise, protein uygulaması sonucu indüklendiğini ortaya koymuşlardır.

4.10 Annexin-V Analizi ile Apoptotik Hücre Populasyonunun Saptanması

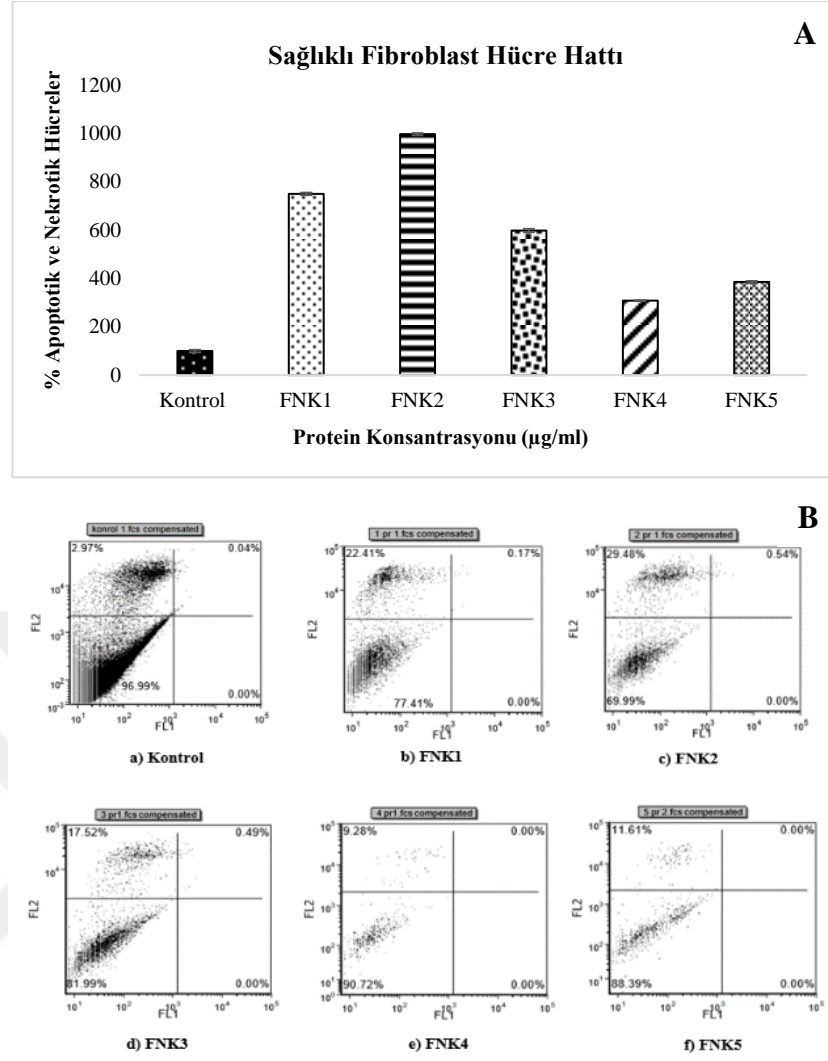
Uygulanan kültür filtratı ve proteinlerin, sağlıklı hücreleri hangi yolağı kullanarak ölüme götürdüğü ise Annexin-V analizi ile flow sitometri cihazı kullanılarak

belirlenmiştir. Bakterilerden elde edilen kültür filtratları (%50) ve proteinler (IC50) sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanmış, ardından apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonları belirlenmiştir. Daha nceki yapılan deneylerde kültür filtratlarına ait ilk iki doz (%100 ve %50) sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanmıştır ancak bu deney için yalnızca %50'lik doz tercih edilmiştir. Çünkü %100'lk uygulanan doz sonucunda yeterli hücre sayısına ulaŐılamamıŐtır. Kontrol grubu olarak, önceki deneylerde olduğu gibi, herhangi bir uygulama yapılmamış olan hücreler (hücre + besiyeri) kullanılmış ve tüm örnekler  tekrar çalışılmıştır. İzolatlara ait kültür filtratlarının uygulanması sonucu apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4.12'de gösterilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarına ait kültür filtratları sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerine uygulandığında, kontrol grubuna göre apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarında sırasıyla 8,9-; 7,6- ve 5,2- kat artışın meydana geldiği gözlenmiştir. Bu durum *E. coli* izolatu için 2,9-; *A. baumannii* izolatu için ise 2,2 kat olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.13 A. Kültür Filtratlarının % Apoptotik ve Nekrotik Hücre Populasyonu Üzerine Etkisi B. Flow Sitometri Analizi

İzolatlara ait protein örneklerinin IC50 değerlerinin hücre kültürüne uygulanması sonucunda ise, *K. pneumoniae* izolatlarına ait proteinler apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarında sırasıyla 7,5-; 9,9- ve 5,9- kat artışa neden olurken, *E. coli* izolatına ait protein için bu artış 3-; *A. baumannii*'den izole edilen protein için ise 3,8- kat olarak ortaya konulmuştur (Şekil 4.14).

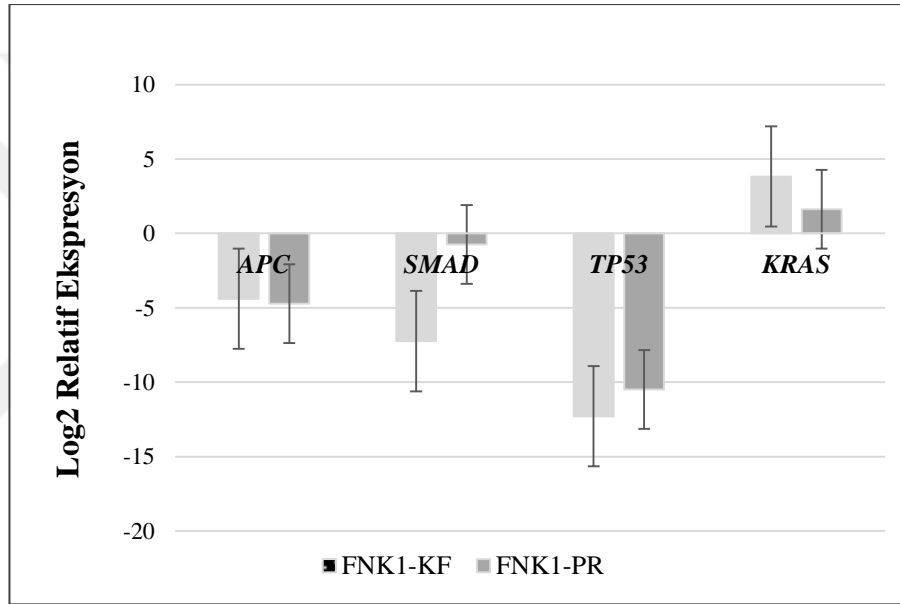


Şekil 4.14 A. Proteinlerin % Apoptotik ve Nekrotik Hücre Populasyonu Üzerine Etkisi
B. Flow Sitometri Analizi

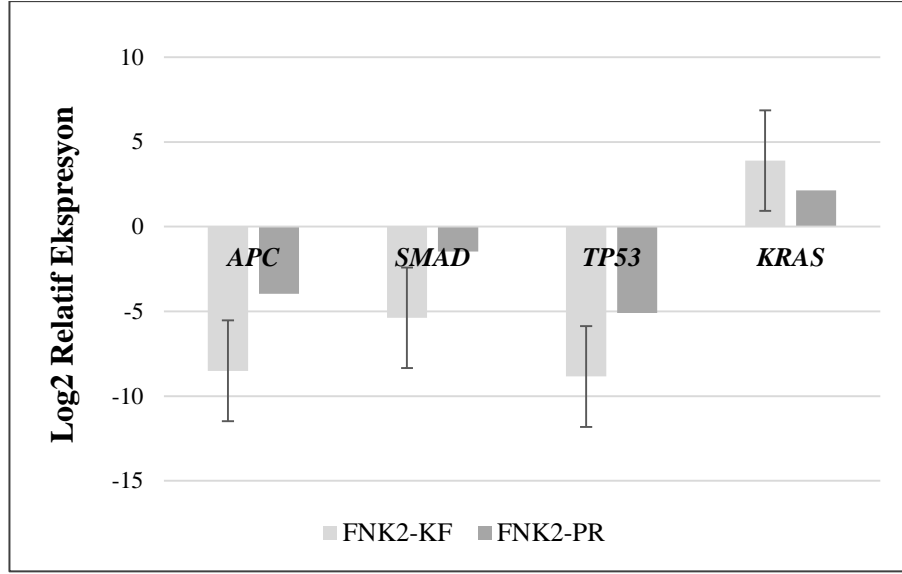
4.11 cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Yapılan literatür taraması sonucunda, kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan 4 adet gen seçilmiş ve bu genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu amaçla sağlıklı fibroblast hücre hattına, bakterilerden elde edilen kültür filtratlarının %50'lik konsantrasyonları ve proteinlerin IC50 değerleri verilerek 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen hücrelerden RNA izolasyonları yapılarak ters transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA'ları sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri; *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* genlerine ait spesifik primerler aracılığı ile qRT-PCR ile çoğaltılmıştır. Bakteriyel izolatlara ait gen ekspresyon seviyesindeki farklılıklar ayrı ayrı grafik çizimleri ile gösterilmiştir.

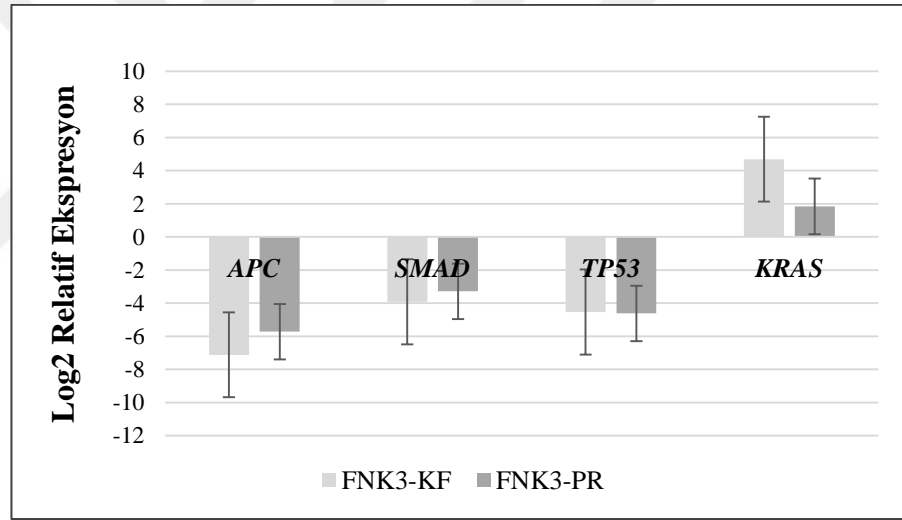
K. pneumoniae izolatlarına ait kültür filtratı ve proteinler sağlıklı fibroblast hücre hattına verildikten sonra gerçekleştirilen qRT-PCR sonucunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında *APC*, *SMAD* ve *TP53* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken, *KRAS* gen ekspresyonunda ise anlamlı bir azalış saptanmıştır ($P < 0,05$). Kültür filtratı ve proteinlerin kendi aralarında karşılaştırılması yapıldığında ise, *K. pneumoniae*'ye kültür filtratlarının, proteinlere kıyasla gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna göre daha fazla etkilediği görülmektedir (Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Ayrıca aynı tür olarak tanılanan farklı izolatlar arasında ufakta olsa farklılıkların olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.15 *K. pneumoniae*'ye (FNK1) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* Ekspresyonu Üzerine Etkisi

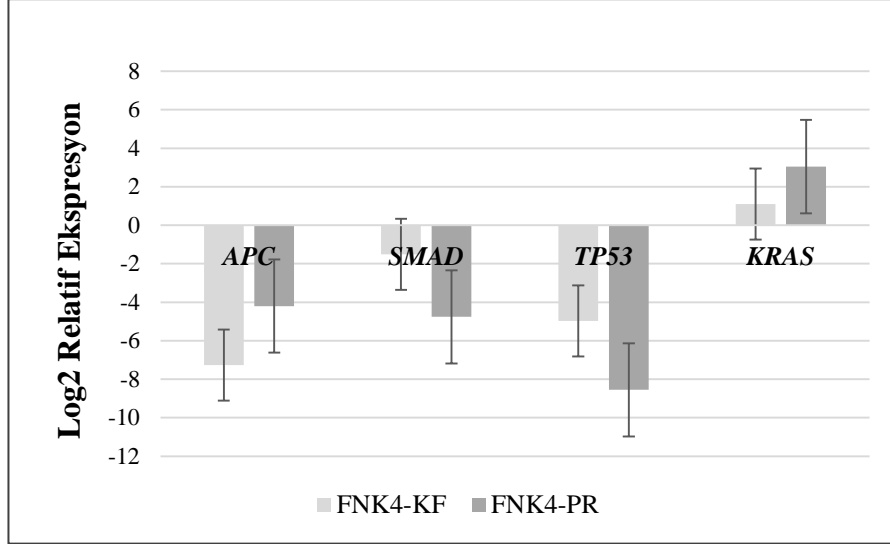


Şekil 4.16 *K. pneumoniae*'ye (FNK2) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* Ekspresyonu Üzerine Etkisi



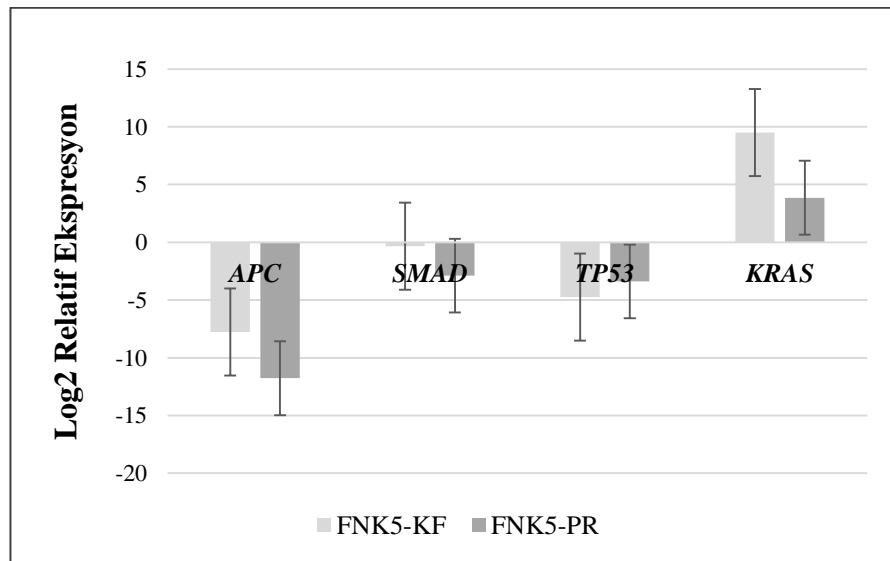
Şekil 4.17 *K. pneumoniae*'ye (FNK3) Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* Ekspresyonu Üzerine Etkisi

E. coli izolatına ait kültür filtratı ve proteinler sağlıklı fibroblast hücre hattına verildikten sonra gerçekleştirilen qRT-PCR sonucunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında *APC*, *SMAD* ve *TP53* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken, *KRAS* gen ekspresyonunda ise anlamlı bir azalış saptanmıştır ($P < 0,05$). Kültür filtratı ve proteinlerin kendi aralarında karşılaştırılması yapıldığında ise, *E. coli*'ye ait kültür filtratının, yalnızca *APC* geni için yüksek ekspresyona sahip olduğunu, diğer genler için ise protein uygulamasının gen ekspresyon düzeylerini daha fazla artırdığı saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *E. coli*'ye Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* Ekspresyonu Üzerine Etkisi

A. baumannii izolatına ait kültür filtratı ve protein sağlıklı fibroblast hücre hattına verildikten sonra gerçekleştirilen qRT-PCR sonucunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında *APC*, *SMAD* ve *TP53* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken, *KRAS* gen ekspresyonunda ise anlamlı bir azalış saptanmıştır ($P < 0,05$). Kültür filtratı ve proteinlerin kendi aralarında karşılaştırılması yapıldığında ise, *A. baumannii*'ye ait kültür filtratının *TP53* ve *KRAS* genlerinin ekspresyonunu protein uygulamasına kıyasla daha fazla artırdığı, protein uygulamasının ise *APC* ve *SMAD* genlerinin ekspresyon seviyelerini daha fazla artırdığı görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 *A. baumannii*'ye Ait Kültür Filtratı ve Protein Uygulamasının *APC*, *SMAD*, *TP53* ve *KRAS* Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Total protein ve kültür filtratlarının hücre hattı üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, tümör süpresör genlerin anlatımında azalmaya, *KRAS* onkogeninin anlatımında ise artışa neden olduğu, böylelikle sağlıklı hücreleri ölüme götürdüğü gözlenmiştir. Sinnott and Dunn (1950); de Leon and Roncucci (2000); Johnson and Lewis (2002); Rupnarain *et al.* (2004); Al- Sohaily *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmalarda adenomalı bir dokuda, *KRAS* onkogeninin aktif hale gelmesi sonucunda adenomanın tamamen büyüyebileceği ve *KRAS* aktivasyonundan sonra meydana gelen adenomalarda, 18. kromozomun uzun kolunda bulunan, tümör supresör gendeki “deleted in colorectal cancer” (*DCC*) mutasyon sonucu oluşan inaktivasyon sonucunda ise adenomanın tamamen ilerleği bildirilmiştir. Adenomanın karsinomaya dönüşmesinde ise, 17. kromozom üzerinde bulunan *p53* tümör süpresör geninin mutasyon sonucu inaktif hale gelerek, hücrede tümörigenez oluşumuna neden olduğu, bu bağlamda *p53*, hasarlı DNA’ya sahip hücrelerdeki proliferasyonu sınırlamadan, *APC* ve *KRAS* genlerindeki mutasyona bağlı olarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Zhang *et al.* (2010) ve Samanta and Datta (2012) tarafından yapılan çalışmalarda ise, *SMAD* genindeki herhangi bir mutasyonun hücre proliferasyonunu artırdığı ve hücrede tümör oluşumuna neden olduğu, Ülger Toprak *et al.* (2006) ve Compare and Nardone (2013) yaptıkları çalışmada ise, mutasyon veya promoter bölgesinin metilasyonu sonucu *APC* geninde bir fonksiyon kaybı olduğu zaman, sitoplazmik β -kateninin biriktiği ve β -kateninin nukleusa giderek *MYC* geninin transkripsiyon faktörlerine veya T-cell factor /lymphoid enhancer factor (*TCF/LEF*) ailesinin transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, *TCF4* aktivasyonunu sağladığı ve kolonik epitel hücrelerdeki büyümeyi teşvik ederek kanserleşmeye neden olduğu bildirilmiştir. Tüm bu literatür bilgileri göz önüne alındığında, tez çalışmasında ekspresyon seviyeleri incelenen genlerin literatür ile örtüştüğü görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında;

- Kolon kanserli biyopsi örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda 3 *K. pneumoniae*, 1 *A. baumannii* ve 1 *E. coli* izole edilmiştir.
- Bakterilerin kültür filtratları ve proteinleri izole edilerek SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiş ve literatür verileriyle karşılaştırılmıştır. Bant profilleri incelendiğinde *K. pneumoniae*'ye ait ekstrasellüler proteinlerin 75 kDa büyüklüğüne sahip olduğu, total protein izolasyon jel görüntülerinde ise, 25-100 kDa arası proteinlerin var olduğu gösterilmiştir. *E. coli*'ye ait ekstrasellüler ve total proteinlerin varlığı ise 50-100 kDa aralığında görülmektedir. *A. baumannii*'nin ise, *K. pneumoniae* ile benzer protein profiline sahip olduğu görülmektedir.
- Bakterilerden izole edilen kültür filtratları ve proteinlerin ko-kültür ortamında sağlıklı fibroblast hücre hatlarına olan etkileri WST-8, hemoliz testi, Kaspaz-3, JC-1 ve Annexin- V analizleri ile değerlendirilmiş ve yapılan analizler sonucunda tüm izolatların kültür filtratları ve proteinlerinin sağlıklı hücreleri özellikle inflamasyon, nekroz ve apoptoz yoluyla ölüme götürdüğü sonucuna varılmıştır.
- Bakterilerden izole edilen kültür filtratları ve proteinlerin sağlıklı fibroblast hücre hattının gen ekspresyonuna olan etkisi qRT-PCR yöntemi ile incelenmiş ve hücrelerde *TP53*, *SMAD* ve *APC* gibi tümör supresör genlerin ekspresyonunda azalma, *KRAS* onkogeninin anlatımında ise kontrole göre artış gözlenmiştir. Literatür taraması yapıldığında tez çalışmasında kullanılan izolatlar ve onların kültür filtratı ve proteinleri ile ilgili hücre kültürü çalışmalarına rastlanılmamıştır.

Kanser multifaktöriyel bir hastalık olup oluşumunda pek çok yolağın önemli olduğu bilinmektedir. Kanser oluşumunda pek çok faktör yanında enfeksiyonel etmenlerden bazılarının da etkili olduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu bağlamda çalışmada, kolorektal kanser oluşumuna neden olabilecek bakterilerin tespiti amacıyla bakteriyel izolasyonlar yapılmış ve bunların kültür filtratları ya da

proteinlerinin etkisi araştırılmıştır. Bakterilerin üretmiş olduğu protein ya da metabolik atıklarının kolorektal kanser ile ilişkili olabilecek gen seviyesindeki etkileri değerlendirilmiş ve ilk kez kolorektal kanserli dokulardan izole edilen bakteriler ile arasındaki ilişki moleküler düzeyde incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde kolorektal kanser ile mücadelede sadece kanser değil enfeksiyonel etmenlere yönelik de ortak tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, hatta kansere neden olması muhtemel bu etmenlerle mücadelenin, kansere yakalanmamış kişilerde de uygulanması açısından literatüre yeni veriler kazandırmıştır. Tedavide çok yönlü yaklaşımların kullanılması ve kanser ile enfeksiyonel etmenlere karşı profilaktik tedbirlerin alınması ülkemiz ve dünya genelinde hem sağlık hem de ekonomik anlamda önemli kazanç sağlayabilecektir.

Daha ileriki çalışmalarda ise, bakterilerden izole edilen proteinler ve kültür filtratları içerisinde yer alan moleküller tek tek izole edilip hücre hattına uygulanarak, spesifik olarak hangi hücresel bileşenin hangi yoldan sorumlu olduğu araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Adiguzel, A., Nadaroglu, H. and Adiguzel, G. 2015. Purification and Characterization of [Formula: See Text]-Mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and Its Applications in Some Fruit Juices. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8):5292–98.
- Adrain, C. and Seamus J. M. 2001. The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed by the Cytochrome *Seas*. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6):390–97.
- Akkoca, A. N., Yanık, S., Özdemir, Z. T., Cihan, F. G., Sayar, S., Cincin, T. G., Çam, A. and Özer, C. 2014. TNM and Modified Dukes Staging along with the Demographic Characteristics of Patients with Colorectal Carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(9):2828–35.
- Al- Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen- Corish, M. and Warusavitarne, J. 2012. Molecular Pathways in Colorectal Cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(9):1423–31.
- Antonic, V., Stojadinovic, A., Kester, K. E., Weina, P. J., Björn L. D., Brücher, M., Protic, M., Avital, I. and Izadjoo, M. 2013. Significance of Infectious Agents in Colorectal Cancer Development. *Journal of Cancer*, 4(3):227.
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T. J., Campbell, B. J., Turki, A., Dogan, B. and Rogers, A. B. 2012. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science*, 338(6103):120–23.
- Axelrad, J. E., Lichtiger, S. and Yajnik, V. 2016. Inflammatory Bowel Disease and Cancer: The Role of Inflammation, Immunosuppression, and Cancer Treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 22(20):4794–4801.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. and Gordon, J. I. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717):1915–20.
- Baykara, O. 2016. Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3):154–65.
- Bergounioux, J., Elisee, R., Prunier, A. L., Donnadieu, F., Sperandio, B., Sansonetti, P. and Arbibe, L. 2012. Calpain Activation by the *Shigella flexneri* Effector *VirA* Regulates Key Steps in the Formation and Life of the Bacterium's Epithelial Niche. *Cell Host & Microbe*, 11(3):240–52.
- Blackadar, C. B. 2016. Historical Review of the Causes of Cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1):54.
- Boleij, A. and Tjalsma, H. 2012. Gut Bacteria in Health and Disease: A Survey on the Interface between Intestinal Microbiology and Colorectal Cancer. *Biological Reviews*, 87(3):701–30.
- Boleij, A. and Tjalsma, H. 2013. The Itinerary of *Streptococcus Gallolyticus* Infection in Patients with Colonic Malignant Disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(8):719–24.
- Bouma, G. and Strober, W. 2003. The Immunological and Genetic Basis of

- Inflammatory Bowel Disease. *Nature Reviews Immunology*, 3(7):521.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-54.
- Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4):992 LP-993.
- Bustos-Fernández, L. 2013. *Colon: Structure and Function*, Springer Science & Business Media.
- Compare, D. and Nardone, G. 2013. The Bacteria-Hypothesis of Colorectal Cancer: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 3(1):44-53.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E. and Nougayrède, J. P. 2010. *Escherichia coli* Induces DNA Damage in vivo and Triggers Genomic Instability in Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 107(25):11537-42.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A. L., Barnich, N., Marie-Bringer, M. A., Swidsinski, A., Beaugerie, L. and Colombel, J. F. 2004. High Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 127(2):412-21.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Martino, P. D., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A. and Colombel, J. F. 1998. Presence of Adherent *Escherichia coli* Strains in Ileal Mucosa of Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 115(6):1405-13.
- Davies, R. J., Miller, R. and Coleman, N. 2005. Colorectal Cancer Screening: Prospects for Molecular Stool Analysis. *Nature Reviews Cancer* 5(3):199.
- Dijkshoorn, L. and Nemec, A. 2008. The Diversity of the Genus *Acinetobacter*. *Acinetobacter, Molecular Biology*, 2:1-34.
- Dusane, D. H., Damare, S. R., Nancharaiah, Y. V., Ramaiah, N., Vayalam, Venugopalan, P., Kumar, A. R. and Zinjarde, S. S. 2013. Disruption of Microbial Biofilms by an Extracellular Protein Isolated from Epibiotic Tropical Marine Strain of *Bacillus licheniformis* PLoS One, 8(5):e64501.
- Edinger, A. L. and Thompson, C. B. 2004. Death by Design: Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6):663-69.
- Ellmerich, S., Schöller, M., Duranton, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J. P. and Raul, F. 2000. Promotion of Intestinal Carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*, 21(4):753-56.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495-516.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. 2003. Tumor Suppressor NM23-H1 Is a Granzyme A-Activated DNase during CTL-Mediated Apoptosis, and the Nucleosome Assembly Protein Set Is Its Inhibitor. *Cell*, 112(5):659-72.
- Fenoglio-Preiser, C. M., Noffsinger, A. E., Stemmermann, G. N., Lantz, P. E., Listrom, M. B. and Rilke, F. O. 1999. *Carcinomas and Other Epithelial and Neuroendocrine*

- Tumors of the Large Intestine. *Gastrointestinal Pathology an Atlas and Text*. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 909–1068.
- Gold, J. S., Bayar, S. and Salem, R. R. 2004. Association of *Streptococcus bovis* Bacteremia with Colonic Neoplasia and Extracolonic Malignancy. *Archives of Surgery*, 139(7):760–65.
- González, E., Rother, M. Kerr, M.C., Al-Zeer, M. A., Abu-Lubad, M., Kessler, M., Brinkmann, V., Loewer, A. and Meyer, T. F. 2014. Chlamydia Infection Depends on a Functional MDM2-P53 Axis. *Nature Communications*, 5:5201.
- Gross, R.G., Reiter, B. and Korsten, M.A. 2008. Pyogenic Liver Abscess Complicating Colonoscopic Polypectomy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 67(4):767–68.
- Guo, Y., Cen, Z., Zou, Y., Fang, X., Li, T., Wang, J., Chang, D., Su, L., Liu, Y. and Chen, Y. 2012. Whole-Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Strain LCT-KP214. *Journal of Bacteriology*, 194(12):3281.
- Han, S., Gao, J., Zhou, Q., Liu, S., Wen, C. and Yang, X. 2018. Role of Intestinal Flora in Colorectal Cancer from the Metabolite Perspective: A Systematic Review. *Cancer Management and Research*, 10:199–206.
- Zur Hausen, H. 2009. The Search for Infectious Causes of Human Cancers: Where and Why. *Virology*, 392(1):1–10.
- Hoffenberg, E. J., Sauaia, A., Maltzman, T., Knoll, K., Ahnen, D. J. J. 1999. Symptomatic colonic polyps in childhood: not so benign. *Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 28(2):175-81 (1999).
- Hsu, C. R., Pan, Y. J., Liu, J. Y., Chen, C. T., Lin, T. L. and Wang, J. T. 2015. *Klebsiella pneumoniae* Translocates across the Intestinal Epithelium via Rho GTPase-and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Cell Invasion. *Infection and Immunity*, 83(2):769–79.
- Huang, W. K., Chang, J. W. C., See, L. C., Tu, H. T., Chen, J. S., Liaw, C. C., Lin, Y. C. and Yang, T. S. 2012. Higher Rate of Colorectal Cancer among Patients with Pyogenic Liver Abscess with *Klebsiella pneumoniae* than Those without: An 11-Year Follow-up Study. *Colorectal Disease*, 14(12):794–801.
- Itzkowitz, S. H. and Yio, X. 2004. Inflammation and Cancer IV. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Role of Inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1):G7–17.
- Johnson, A. and Lewis, J. 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th Ed. New York: Garland Science.
- Jovanović, P., Zerem, E. and Zildzić, M. 2007. Management of Liver Abscess Formed after Asymptomatic Sigmoid Diverticulitis. *Medicinski Arhiv*, 61(2):117–18.
- Karada, A. 2016. Otofaji : Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15:19–26.
- Ketter, P. M., Yu, J. J., Guentzel, M. N., May, H. C., Gupta, R., Eppinger, M., Klose, K. E., Seshu, J., Chambers, J. P., Cap, A. P. and Arulanandam, B. P. 2018. Crossm *Acinetobacter baumannii* Gastrointestinal Colonization Is Facilitated by Secretory IgA Which Is Reductively Dissociated by Bacterial Thioredoxin A. 9(4):1–14.
- Lai, H. C., Chan, C. Y., Peng, C. Y., Chen, C. B. and Huang, W. H. 2006. Pyogenic Liver Abscess Associated with Large Colonic Tubulovillous Adenoma. *World*

- Journal of Gastroenterology: WJG, 12(6):990.
- Lee, J. C., Oh, J. Y., Kim, K. S., Jeong, Y. W., Park, J. C. and Cho, J. W. 2001. Apoptotic Cell Death Induced by *Acinetobacter baumannii* in Epithelial Cells through Caspase-3 Activation. *Apms*, 109(10):679–84.
- Lee, J. K., Kum, J. and Ghosh, P. 2008. Nonmetastatic Cancer of the Colon Associated with Pyogenic Liver Abscess. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(3):798.
- De Leon, M. P. and Roncucci, L. 2000. The Cause of Colorectal Cancer. *Digestive and Liver Disease*, 32(5):426–39.
- Levine, D. S. and Haggitt, R. C. 1989. Normal Histology of the Colon. *The American Journal of Surgical Pathology*, 13(11):966–84.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. and Gordon, J. I. 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, 124(4):837–48.
- Lim, W. C. and Lim, C. C. 2004. Silent Colorectal Carcinoma and Pyogenic Liver Abscess. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(8):945–46.
- MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. Baltimore (Md.) : Williams and Wilkins.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. 2007. Self-Eating and Self-Killing: Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9):741–52.
- Margalit, M., Elinav, H., Ilan, Y. and Shalit, M. 2004. Liver Abscess in Inflammatory Bowel Disease: Report of Two Cases and Review of the Literature. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(12):1338–42.
- Martin, H. M., Campbell, B. J., Hart, C. A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H. F. and Rhodes, J. M. 2004. Enhanced *Escherichia coli* Adherence and Invasion in Crohn's Disease and Colon Cancer 1. *Gastroenterology*, 127(1):80–93.
- Matkowskyj, K. A., Chen, Z. E., Rao, M. S. and Yang, G. Y. 2013. Dysplastic Lesions in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Pathogenesis to Morphology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(3):338–50.
- McIntosh, G. H., Royle, P. J. and Playne, M. J. 1999. A Probiotic Strain of *L. acidophilus* Reduces DMH-Induced Large Intestinal Tumors in Male Sprague-Dawley Rats. *Nutrition and Cancer*, 35(2):153–59.
- Michael, J. J. and Abbott, S. L. 2002. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *J. Clin. Microbiol*, 40:1887-1891.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D. J. 2008. NIH Public Access. *Nature*, 451(7182):1069–75.
- Morris, G. B., Ridgway, E. J. and Suvarna, S. K. 2018. Traditional Stains and Modern Techniques for Demonstrating Microorganisms in Histology. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book*, 254.
- Neish, A. S. 2009. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*, 136(1):65–80.
- Nicotera, P. and Melino, G. 2004. Regulation of the Apoptosis-Necrosis Switch.

- Oncogene, 23(16 REV. ISS. 2):2757–65.
- Niemann, H. and Wintzer, G. 1995. Formation of a Liver Abscess as the First Manifestation of Concealed Perforated Sigmoid Diverticulitis. *Leber, Magen, Darm*, 25(1):35–37.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. and Tavernarakis, N. 2013. Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12):3448–59.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B. and Bao, J. K. 2012. Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6):487–98.
- Oz-Arslan, D., Korkmaz, G. and Gozuacik, D. 2011. Otofaji : Bir Hücresel Stres Yanıtı .*Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4):184–94.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A. and Michalopoulos, I. 2015. Human Cancer Databases (Review). *Oncology Reports*, 33(1):3–18.
- Peek, J. R., Richard, M. and Blaser, M. J. 2002. Helicobacter pylori and Gastrointestinal Tract Adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer*, 2(1):28.
- Piot, P., Dyck, E. A., Totten, P. A. and Holmes, K. K. 1982. Identification of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Rashid, T., Ebringer, A. and Wilson, C. 2013. The Role of Klebsiella in Crohn's Disease with a Potential for the Use of Antimicrobial Measures. *International Journal of Rheumatology* 2013.
- Reers, M., Smith, T. W. and Chen, L. B. 1991. J-Aggregate Formation of a Carbocyanine as a Quantitative Fluorescent Indicator of Membrane Potential. *Biochemistry*, 30(18):4480–86.
- Rowland, I. R., Bearne, C.A., Fischer, R. and Pool-Zobel, B. L. 1996. The Effect of Lactulose on DNA Damage Induced by DMH in the Colon of Human Flora-associated Rats.
- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S. and Bhoola, K. 2004. Colon Cancer: Genomics and Apoptotic Events. *Biological Chemistry*, 385(6):449–64.
- Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., Williams, C., Price, A., Talbot, I. and Forbes, A. 2004. Severity of Inflammation Is a Risk Factor for Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis *Gastroenterology*, 126(2):451–59.
- Samanta, D. and Datta, P. K. 2012. Alterations in the Smad Pathway in Human Cancers. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17:1281–93.
- Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E. and Hess, C. F. 2004. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(17):1731–40.
- Sayers, T. J. 2011. Targeting the Extrinsic Apoptosis Signaling Pathway for Cancer Therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8):1173–80.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.

- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. and von Mering, C. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.*, Jan; 45:D362-68.
- Sheikhian, A., Hassan, Z. M., Mustafaie, A., Shokri, F., Malekzadeh, R. and Siavoshi, F. 2004. Extraction of the Outer Membrane Proteins of *H. pylori* and Evaluation of Their Presence in Stool of the Infected Individuals. *Iranian Biomedical Journal*, 8(2):83-88.
- Siegl, C., Prusty, B. K., Karunakaran, K., Wischhusen, J. and Rudel, T. 2014. Tumor Suppressor P53 Alters Host Cell Metabolism to Limit Chlamydia trachomatis Infection. *Cell Reports*, 9(3):918-29.
- Simmering, R., Pforte, H., Jacobasch, G. and Blaut, M. 2002. The Growth of the Flavonoid-Degrading Intestinal Bacterium, *Eubacterium ramulus*, Is Stimulated by Dietary Flavonoids in vivo. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(3):243-48.
- Sinnott, E.W. and Dunn, L. C. 1950. *Principles of Genetics*. McGraw-Hill: New York.
- Spierings, D.C., De Vries, E. G., Vellenga, E., Fiona A., Heuvel, V. D., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H. and Jong, J. D. 2004. Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(6):821-31.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J. and Lochs, H. 1998. Association between Intraepithelial *Escherichia coli* and Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 115(2):281-86.
- Tayabali, A. F., Nguyen, K. C., Shwed, P. S., Crosthwait, J., Coleman, G. and Seligy, V. L. 2012. Comparison of the Virulence Potential of *Acinetobacter* Strains from Clinical and Environmental Sources. *PLoS ONE*, 7(5).
- Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S., Gilbert, C. E., Ross, P. and Haji, A. 2016. Colorectal Adenocarcinoma: Risks, Prevention and Diagnosis. *Bmj*, 354:i3590.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J. and Sokol, D. 2004. Commensal Bacteria (Normal Microflora), Mucosal Immunity and Chronic Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Immunology Letters*, 93(2-3):97-108.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. and Palmer, J. D. 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4):327-38.
- Uhry, Z., Belot, A., Colonna, M., Bossard, N., Rogel, A., Iwaz, J., Mitton, N., Grosclaude, P. and Remontet, L. 2013. National Cancer Incidence Is Estimated Using the Incidence/Mortality Ratio in Countries with Local Incidence Data: Is This Estimation Correct? *Cancer Epidemiology*, 37(3):270-77.
- Ulger Toprak, N., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T. and Soyletir, G. 2006. A Possible Role of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin in the Aetiology of Colorectal Cancer. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(8):782-86.
- Uronis, J. M. and Jobin, C. 2009. Microbes and Colorectal Cancer: Is There a Relationship? *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 16(4):22-24.

- Varricchio, C. G. 2004. *A Cancer Source Book for Nurses*. Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Wang, C. and Youle, R. J. 2009. HHS Public Access. *Annu Rev Genet*, 43:95–118.
- Wang, X., Allen, T. D., May, R. J., Lightfoot, S., Houchen, C. W. and Huycke, M. M. 2008. *Enterococcus faecalis* Induces Aneuploidy and Tetraploidy in Colonic Epithelial Cells through a Bystander Effect. *Cancer Research*, 68(23):9909–17.
- Wang, X., Yang, Y., Moore, D. R., Nimmo, S. L., Lightfoot, S. A. and Huycke, M. M. 2012. 4-Hydroxy-2-Nonenal Mediates Genotoxicity and Bystander Effects Caused by *Enterococcus faecalis*-infected Macrophages. *Gastroenterology*, 142(3):543–51.
- Warren, J. R. 2006. *Helicobacter: The Ease and Difficulty of a New Discovery* (Nobel Lecture). *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 1(7):672–85.
- Wassenaar, T. M. 2018. *E. coli* and Colorectal Cancer: A Complex Relationship That Deserves a Critical Mindset. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5):619–32.
- Wei, J., Nagy, T. A., Vilgelm, A., Zaika, E., Ogden, S. R., Romerogallo, J., Piauelo, M. B., Correa, P., Washington, M. K., Elrifai, W., Peek, R. M. and Zaika, A. 2010. Regulation of P53 Tumor Suppressor by *Helicobacter pylori* in Gastric Epithelial Cells. *Gastroenterology*, 139(4):1333–1343.e4.
- Wells, C. D., Balan, V. and Smilack, J. D. 2005. Pyogenic Liver Abscess after Colonoscopy in a Patient with Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(12):A24.
- Westbrook, A.M., Szakmary, A. and Schiestl, R. H. 2016. Mouse Models of Intestinal Inflammation and Cancer. *Archives of Toxicology*, 90(9):2109–30.
- Wolpin, B. M., Meyerhardt, J. A., Mamon, H. J. and Mayer, R. J. 2007. Adjuvant Treatment of Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(3):168–85.
- Wong, R. S. Y. 2011. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1):87.
- Wu, S., Morin, P. J., Maouyo, D. and Sears, C. L. 2003. *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Induces C-Myc Expression and Cellular Proliferation. *Gastroenterology*, 124(2):392–400.
- Wu, S., Rhee, K. J., Zhang, M., Franco, A. and Sears, C. L. 2007. *Bacteroides fragilis* Toxin Stimulates Intestinal Epithelial Cell Shedding and γ -Secretase-Dependent E-Cadherin Cleavage. *Journal of Cell Science*, 120(11):1944–52.
- Wu, S., Shin, J., Zhang, G., Cohen, M., Franco, A. and Sears, C. L. 2006. The *Bacteroides fragilis* Toxin Binds to a Specific Intestinal Epithelial Cell Receptor. *Infection and Immunity*, 74(9):5382–90.
- Yoshida, G. J. 2017. Therapeutic Strategies of Drug Repositioning Targeting Autophagy to Induce Cancer Cell Death: From Pathophysiology to Treatment. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1):67.
- Zhang, B., Halder, S. K., Kashikar, N.D., Cho, Y. J., Datta, A., Gorden, D. L. and Datta, P. L. 2010. Antimetastatic Role of Smad4 Signaling in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(3):969–80.



EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/45
Konu : Etik Kurul Kararı

08.09.2017

Sayın: Doç.Dr.Arzu GÖRMEZ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz "Helicobacter pylori'nin insan kolon kanseri patagenezindeki rolünün invitro ve invivo karakterizasyonu" isimli bilimsel çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Hamidullah ÜYANIK
Etik Kurul Başkan V.

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı



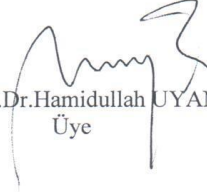
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU

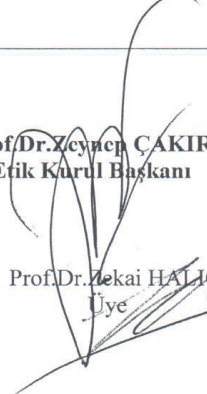


KARAR


ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Arzu GÖRMEZ	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	“ <i>Helicobacter pylori</i> ’nin insan kolon kanseri patogenezindeki rolünün <i>invitro</i> ve <i>invivo</i> karakterizasyonu”	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 3 Karar No: 10	Tarih: 15.08.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu’ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

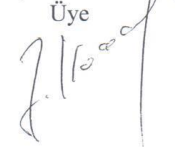

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye



Prof.Dr.Hamidullah UYANIK
Üye


Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı


Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye


Yrd.Doç.Dr.İlker İNCE
Üye


Yrd.Doç.Dr.Zahide KOŞAN
Üye


Yrd.Doç.Dr.Binali HIRINCI
Üye


Emrah MELETLİOĞLU
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Fatma Necmiye KACI
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 17/ 01/ 1988
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 0536 582 1884
e-mail : necmiye.kaci@erzurum.edu.tr-necmiyekaci@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2012
Lise	Çorum Atatürk Lisesi	2006

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Erzurum Teknik Üniversitesi, 2014- Halen

Yayınlar (SCI, SCI-Expanded) (Yayın yılları dikkate alınmalıdır)*

Ünlü M, Kiraz Y, Kacı FN*, Ozcan MA, Baran Y. Multidrug Resistance In Chronic Myeloid Leukemia. Turkish Journal of Biology, 2014, 38(6); 806-816.

Hakemli Dergiler (Yayın yılları dikkate alınmalıdır)

Ulusal Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

Fatma Necmiye KACI, Arzu GÖRMEZ, Bünyamin ÖZGERİŞ. Pikolinik asit türevi 3-benzoil piridin'in antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi. 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 2017, Antalya, Turkey (Poster Sunum).

Fatma Necmiye KACI, Yusuf BARAN. Bortezomib ve Metilstatın Farklı Multipl Myeloma Hücre Hatlarındaki Etkilerinin Gen Seviyesinde İncelenmesi, 2016, Aydın, Turkey (Poster Sunumu)

Uluslararası Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

Fatma Necmiye KACI, Arzu Görmez, Tuba YETİM. Cytotoxic Effect of Ni Doped ZNO Samples on Human Primary Glioblastoma Cell Line. VI. International Conference of Molecular Medicine, 2017, Istanbul, Turkey (Sözlü Sunum).

Fatma Necmiye KACI, Arzu Görmez, Tuba YETİM. Antibacterial Effect of Ni Doped ZnO Thin Films. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences, 2017, Antalya (Sözlü Sunum).

Ahmet ÜNAL, Fatma Necmiye KACI, Muhammed Yasin ÇODUR, Arzu GÖRMEZ. Effect of Bacteria on Asphalt Peeling Tests. International Advanced Researches and Engineering Congress-2017, Osmaniye (Sözlü Sunum).

Fatma Necmiye Kaci, Tuba Yetim, Arzu Gormez. The Synergistic Effect of Light Intensity and Sound Power on Disinfection. 5th MacroTrend Conference on Health and Medicine: Paris 2017, (Sözlü Sunum).

Fatma Necmiye KACI, Esin DADASOGLU, Fatih DADASOGLU, Arzu GORMEZ. The Antibacterial Activity of Essential Oils Extracted from Origanum rotundifolium, Salvia hydrangea and Thymus sipyleus. 5th MacroTrend Conference on Health and Medicine: Paris 2017, (Sözlü Sunum).

Fatma Necmiye KACI, Yusuf BARAN. Bortezomib ve Metilstat İnhibitörünün Farklı Multipl Myeloma Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkileri, II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, 2015, Kayseri (Poster Sunumu)

* Tezle ilgili varsa yayın eklenerek belirtilmelidir.