

**VAJEN KAYNAKLI LAKTOBASİL SUŞLARININ HeLa KANSER HÜCRE
HATTI ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN MOLEKÜLER
DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Tolga SUNGUR

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Aralık 2014

Tolga SUNGUR tarafından hazırlanan "VAJEN KAYNAKLI LAKTOBASİL SUŞLARININ HeLa KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan : Prof. Dr. Emir CANSUNAR

Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Kadri Zafer KARAER

Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 29/12/2014

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

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Tolga Sungur

29.12.2014

VAJEN KAYNAKLI LAKTOBASİL SUŞLARININ HeLa KANSER HÜCRE HATTI
ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE

ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Tolga SUNGUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2014

ÖZET

Son yıllarda probiyotik kültürler antikanser çalışmalarında bir alternatif olarak gösterilmektedir. Çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndaki sağlıklı insan vajen kaynaklı bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bakterilerin canlı hücre ve ekzopolisakkaritlerinin (EPS), insan serviks kanser hücreleri olan HeLa kanser hücre hattına antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Hücre hattında canlı hücrelerin EPS'lerden daha etkin antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En iyi antiproliferatif etki, *Lactobacillus gasseri* H15 suşunun canlı hücrelerinden (% 77 hücre ölümü) elde edilmiştir. Suşların kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri $37 \pm 0,0$ - $217 \pm 2,0$ mg/L arasında belirlenmiştir. EPS çalışmalarında liyofilize toz halindeki EPS'ler kullanılmıştır. *L. gasseri*'nin beş farklı suşunun epitel yüzeye tutunma yetenekleri; adezyon yüzdesi ve adezyon indeksi olarak belirlenmiştir. En yüksek adezyon yüzdesi (% 90) ve indeksi (% 59) *L. gasseri* G10 suşunda görülmüştür. Bakteri canlı hücrelerinin EPS'lerden daha etkin apoptotik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En iyi apoptotik etki *L. gasseri* H14 suşunda görülmüştür (4,79- zenginleştirme faktörü). Bakterilerin ve EPS'lerin apoptotik indeksleri arasında en yüksek apoptotik indeks (% 57) G10 suşunda görülmüştür. Bakterilerin canlı hücre ve EPS'lerin, HeLa hücresine kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada, sadece H15 ve R2 suşları kaspaz 9 (OD 0,07) ve H14 suşu kaspaz 3 (OD 0,07) gösterdiği tespit edildi. EPS'ler arasında ise yalnız H15 EPS'si kaspaz 3 aktivitesi (OD 0,07) gösterdi. Bakteri kültürleri ve EPS örneklerinin (400 µg/ml) HeLa hücresine apoptotik etkisi, kaspaz 3 ve 9 gen ifade düzeyleri ile moleküler olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda apoptoz yolağında önemli rol alan kaspaz 3 ve 9 aracılığıyla apoptozun gerçekleşmediği; başka yolağa ya da genler aracılığı ile apoptozun gerçekleşebileceği değerlendirilmiştir. EPS'nin doğal, stabil ve uygulama kolaylığı nedeniyle, kanser tedavisi/korunmasında ilaç sanayisinin tercih edebileceği bir kaynak olabilmeye mümkündür.

Bilim Kodu : 203.1.023
Anahtar Kelimeler : Laktik asit bakterisi, ekzopolisakkarit (EPS), antiproliferatif, apoptoz, apoptotik indeks, adezyon, kaspaz 3, kaspaz 9, HeLa hücre hattı, Gerçek Zamanlı PZR
Sayfa Adedi : 112
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLIM

THE MOLECULAR INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT OF
VAGINAL ORIGINATED LACTOBACILLI ON THE HUMAN CERVICAL CANCER
CELL LINE

(Ph. D. Thesis)

Tolga SUNGUR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE

December 2014

ABSTRACT

Although probiotic cultures are shown as an alternative to anticancer studies in recent years. This study uses obtained from a healthy vaginal culture at Gazi University, Department of Biology, Biotechnology Laboratory Culture Collection. We investigated the antiproliferative effect of live cells and exopolysaccharide (EPS) of the bacteria on the human cervical cancer cell line (HeLa). Live cells were more effective than EPS in terms of antiproliferative activity on cell line. The best antiproliferative effect is observed for *Lactobacillus gasseri* stain H15 (77% cell death) in living cells. EPS production capacity of the strains in the culture medium is determined as 37 ± 0.0 to 217 ± 2.0 mg/L. Lyophilized powder of EPS were used, in EPS studies. Different five *L. gasseri* strains, which highly synthesize EPS, adsorption capabilities are determined on epithelial as adhesion percentage and adhesion index. The high adhesion percentage (90%) and the index (59%) was observed in *L. gasseri* stain G10. Live cells were more effective than EPS in terms of apoptotic activity on HeLa cells. The best apoptotic effects are observed in *L. gasseri* H14 (4.79- enrichment factor). The highest apoptotic index (57%) is *L. gasseri* G10 between EPS and live cells. We investigate the caspase 3 and caspase 9 activity of EPS and living cells of the bacteria on HeLa cells. The study showed that H15 ve R2 strains had caspase 9 activity (OD 0,07) and H14 bacteria stain had caspase 3 activity (OD 0,07). Only, EPS from H15 stain had caspase 3 activity (OD 0,07). We evaluated apoptotic effect of bacterial cultures and EPS samples (400 µg/ml) on HeLa cancer cells, caspase 3 and caspase 9 gene expression levels were assessed by molecular. We evaluated that apoptosis does not occur an important role in the apoptosis pathway areas via Caspase 3 and 9 genes. It may occur by other pathways or gene. EPS may also be preferred as a source of cancer treatment/protection in pharmaceutical industry because it is natural, stable and easy to implement.

Science code : 203.1.023

Key words : Lactic acid bacteria, exopolysaccharide (EPS), antiproliferative, apoptosis, apoptotic index, adhesion, caspase 3, caspase 9, HeLa cell line, Real Time PCR

Page number : 112

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Prof. Dr. Belma ASLIM'a, laboratuvarında görevli tüm çalışma arkadaşlarıma özellikle Özge TARANÇI'ya, her zaman yardım ve desteğini gördüğüm Doç. Dr. Çağatay Karaaslan'a, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme ve sevgili eşim Neval SUNGUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Kanser.....	5
2.1.1. Kanser ve genetik yapısı.....	5
2.1.2. Kanser oluşumunda rol alan genler	7
2.1.3. Serviks kanseri.....	8
2.1.4. Kanser tedavisi için uygulanan yöntemler	11
2.2. Kanserde Hücresel ve Moleküler Düzeyde Apoptoz Mekanizması.....	12
2.2.1. Apoptozun moleküler mekanizması.....	13
2.3. Probiyotik Bakteriler	19
2.4. Laktik Asit Bakterileri	21
2.4.1. Laktik asit bakterilerinin kontrol mekanizması.....	22
2.4.2. <i>Lactobacillus sp.</i> ve vajinal mikroflora.....	25
2.4.3. Laktobasillerin vajinal florada etkili olan özellikleri.....	27

Sayfa

2.5. Probiyotiklerde EPS'nin Yapısı ve Klinik Uygulamalardaki Yeri	30
2.5.1. EPS'nin yapısı	30
2.5.2. EPS'nin klinik uygulamalardaki yeri	32
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve tampon çözeltiler	36
3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları.....	37
3.2. Metot	37
3.2.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin hazırlanması	37
3.2.2. Bakterilerin muhafazası	37
3.2.3. Laktik asit bakterilerinin moleküler tanımlamaları.....	37
3.2.4. Çalışmada kullanılan insan servikal karsinoma hücre hattının (HeLa) hazırlanması	38
3.2.5. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu ve liyofilizasyonu.....	38
3.2.6. Laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerinin belirlenmesi.....	41
3.2.7. Laktik asit bakterilerinin adezyon yeteneğinin belirlenmesi	42
3.2.8. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi	43
3.2.9. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etkinin belirlenmesi.....	44
3.2.10. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa hücresi üzerine apoptotik indekslerinin belirlenmesi	45
3.2.11. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi	45
3.2.12. Bakteri kültürlerinin HeLa hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi	46

3.2.13. İstatiksel analizler.....	49
4. DENEYSEL BULGULAR	51
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	51
4.2. Laktik Asit Bakterilerin Moleküler Tanımlama Sonuçları	53
4.3. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerin Kültür Ortamında Bakterilerin EPS Üretme Kapasiteleri.....	54
4.4. Bakterilerin Adezyon Yeteneklerinin Belirlenmesi	56
4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antiproliferatif Etkisi.....	58
4.6. EPS'lerin Antiproliferatif Etkisi.....	60
4.7. Laktik Asit Bakteri Kültürlerinin Apoptotik Etkisi.....	61
4.8. EPS'lerin Apoptotik Etkisi.....	62
4.9. Kültürlerin ve Kültür Suşlarının Ürettiği EPS'lerin Apoptotik İndeksi.....	64
4.10. Bakteri Kültürleri ve Kültür Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitesi	67
4.11. Bakteri Kültürleri ve Kültür Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Gen Ekspresyon Düzeyleri	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER...	85
KAYNAKLAR	89
EKLER.....	105
EK-1	106
ÖZGEÇMİŞ	111

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Gıdada ve farmasötik ürünlerde probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sağlıklı insan vajeninden izole edilmiş bakterilerin tür adları ve kodları	35
Çizelge 3.2. MRS sıvı besiyeri içeriğindeki maddeler	36
Çizelge 3.3. PBS tamponunda yer alan maddeler	36
Çizelge 3.4. Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan PPIA ve kaspaz 3 geninin primer dizileri	48
Çizelge 4.1. 16S rRNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri	54
Çizelge 4.2. Kültür koleksiyonundan seçilen bakteri türlerinin kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri.....	55
Çizelge 4.3. EPS üretimi yüksek suşlardan elde edilen liyofilize EPS miktarları.....	55
Çizelge 4.4. Yüksek EPS üretimine sahip bakteri suşlarının HeLa hücreleri üzerine tutunma kapasiteleri.....	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Servikste tümör dokusu	5
Şekil 2.2. Serviks kanseri oluşum aşamaları.....	6
Şekil 2.3. HeLa (ATCC [®] CCL-2 [™]) kanser hücre hattının mikroskopik görüntüsü.....	10
Şekil 2.4. Bir hücrede hücre ölümünün aşamaları	13
Şekil 2.5. Hücre ölüm reseptörlerinden bazılarının apoptozdaki rolü	14
Şekil 2.6. Apoptozda mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri	16
Şekil 2.7. Mitokondri aracılığı ile kaspaz aktivasyonu ,.....	18
Şekil 2.8. Apoptotik yollar: ekstrinsik ve intrinsik yollar.....	18
Şekil 2.9. Laktobasillerin mikroskopik görüntüsü.....	26
Şekil 3.1. Glikoz standartına göre hazırlanan standart eğrisi.....	42
Şekil 4.1. Canlı bakteri hücrelerinin HeLa hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisi.....	59
Şekil 4.2. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi.....	61
Şekil 4.3. Canlı bakteri hücrelerinin HeLa kanser hücre hattında Cell Death Detection Elisa ^{PLUS} ile belirlenen apoptotik etkinin sonuçları	62
Şekil 4.4. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa kanser hücre hattında Cell Death Detection Elisa ^{PLUS} ile belirlenen apoptotik etkinin sonuçları	63
Şekil 4.5. Canlı bakteri kültürlerinin HeLa hücreleri üzerine % apoptotik indeksi	64
Şekil 4.6. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücreleri üzerine % apoptotik indeksi.....	65
Şekil 4.7. Suşların canlı hücrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitesi	68
Şekil 4.8. Suşların canlı hücrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 3 aktivitesi	69

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücresi üzerine kaspaz 3 aktivitesi	70
Şekil 4.10. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücresi üzerine kaspaz 9 aktivitesi	70
Şekil 4.11. Bakteri kültürleri ve kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin kaspaz 3 gen ifade düzeyleri.....	71
Şekil 4.12. Bakteri kültürleri ve kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin kaspaz 9 gen ifade düzeyleri.....	72

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmada bakteri türlerinin liyofilizesi için kullanılan evaporatör	39
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı	40
Resim 3.3. Liyofilizasyon işlemi sonrası toz haline getirilen vial içindeki EPS'ler.....	40
Resim 3.4. Çalışmada kullanılan mikropalak okuyucu	44
Resim 4.1. <i>L. gasseri</i> (R2) türünün ışık mikroskobundaki morfolojisi	51
Resim 4.2. <i>L. plantarum</i> (G4) türünün ışık mikroskobundaki morfolojisi	52
Resim 4.3. <i>L. crispatus</i> (A2) türünün ışık mikroskobundaki morfolojisi.....	52
Resim 4.4. Laktobasil izolatlarının (<i>L. gasseri</i> (R4)) universal primer ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin PCR ürünü.....	53
Resim 4.5. HeLa hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü	57
Resim 4.6. En düşük adezyon indeksi ve yüzdesine sahip R2 suşunun hücreye tutunma görüntüsü	57
Resim 4.7. En yüksek adezyon indeksi ve yüzdesine sahip G10 suşunun hücreye tutunma görüntüsü	58
Resim 4.8. Mikroplaklarda bulunan kanser hücrelerinin WST-1 kiti ile canlılığın tespiti.....	59
Resim 4.9. Hoechst 33342 boyası ile boyanan kanser hücrelerinin floresan mikroskobu ile görüntüsü	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
cfu/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gram
g/L	Gram/litre
g/mL	Gram/mililitre
Gr (+)	Gram pozitif
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
K ₂ HPO ₄	Di potasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat
Mn ²⁺	+2 değerlikli mangan
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin
MnSO ₄ .4H ₂ O	Manganez sülfat
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogram/mililitre
nm	Nanometre
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Devir sayısı
sp	Tür

Simgeler**Açıklama**

spp	Türler
subsp	Alttür
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar**Açıklama**

ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
API	Analitik profil indeksi
APAF-1	Apoptoz aktive edici faktör
ATP	Adenozin trifosfat
BH	Bcl-2 ailesine ait olan tüm proteinlerde homoloji ünitesi
BV	Bakteriyel vajinozis
CAD	Kaspaz aktiviteedici DNase
CPS	Kapsüler polisakkaritler
DC	Dendritik hücreler
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Dünya Tarım Örgütü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HSV	Herpes Simplex Virus
IG	İmmünglobulin
IL	İnterlökin
KZYA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG

Kısaltmalar	Açıklama
LPS	Lipopolisakkarit
MC	M Hücreleri
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PBMC	Periferel kan mononükleer hücreleri
MQ	Makrofaj
MRS	De man rogosa and sharp broth
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate buffered saline
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TCA	Trikloroasetikasit
Th1	T yardımcı-1
Th2	T yardımcı-2
TL	T-lenfosit
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TNFR	Tümör nekroz faktörü reseptör
TRAIL	TNF - Related Apoptosis - Inducing Ligand
Treg	Düzenleyici T hücresi
Tsg	Tümör süpresör gen
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	Tetrazolium tuzu

1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada mortalite ve morbidite oranları bakımından önde gelen sağlık sorunu olup, ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde kanser görülme sıklığının her 100 000 kişide 229 olduğu açıklanmıştır (Arıca ve diğerleri, 2011). Sigara dumanında bulunan kimyasal ve karsinojenik ajanlar, radyasyon ve güneş ışığından gelen zararlı ultraviyole ışınlar gibi etmenlerin yanı sıra vitaminler, mineraller ve antioksidan molekülleri içeren besinlerin yetersiz tüketilmesi ile hücrelerin zararlı moleküllere ve serbest radikallere karşı koruyucu, detoksifiye edici sistemlerinin ve savunma mekanizmalarının zayıflaması sonucu oluşan hücresel hasar da kanser gelişimini tetiklemektedir (Dönmez, Cankurtaran, Diken ve Günendi, 2010; Doll ve Peto, 1981).

Kanserin tedavisine yönelik yapılan pek çok klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile alternatif ilaçların ve tedavi yöntemlerinin ortaya konulmasının önemi vurgulanmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi, cerrahi tedavi ve hormon terapisi gibi tedavi yöntemleri, tedaviye bağlı olarak kanser hastası üzerinde ağır yan etkiler göstermektedir. Bundan dolayıdır ki tedavi sonucunun başarı olasılığı düşük olmakta ve başka yöntemlere arayışların arttığı görülmektedir (Tekin, Kaya ve Özbek Yazıcı, 2012). Yapılan çalışmalar laktik asit bakterilerinin kanserojen maddelere karşı önemli bir savunma birliği içinde olduğunu, bunun yanında sağlıklı kişilerin vajen florasında bulunarak patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyolojik bir bariyer olarak görev aldığını göstermektedir (Charteris, Kelly, Morelli ve Collins, 1999).

Vajen florasında yer alan laktobasillerin vajinanın doğal dengesinin korunmasında ve patojenlerin yerleşmesinin engellenmesinde önemli rol oynadıkları araştırmalarda bildirilmiştir. Vajinayı patojenlerin kolonizasyonundan, epitele yapışmalarını engelleyerek ya da üremelerini inhibe eden maddeler salgılayarak koruduğuna inanılmaktadır (Redondo Lopez, Cook ve Sobel, 1990; Prasad, Gill, Smart ve Gopal, 1998). Gerek bakteri hücrelerinin gerekse metabolitlerinin ve EPS'lerinin moleküler düzeydeki antiproliferatif etkisi ile kanser araştırmalarında kullanılabilme olanaklarının araştırılması üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmektedir. Bu sebeple çalışmada öncelikle insan servikal

kanser hücreleri olan HeLa kanser hücre hattında vajinal kaynaklı laktobasillerin (canlı hücre ve EPS), antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Apoptoz, organizmada normal hücre büyümesi ve homeostazisi için gerekli bir süreçtir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, bu dengenin bozulması sonucu apoptozun kontrolünde oluşan anormalliklerin, kanser başta olmak üzere birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (Gökçe, Yılmaz, Gürbüz, Konaç ve Ekmekçi, 2011; Mcphie ve diğerleri, 2003). Bu nedenle apoptozu indükleyici ajanların ideal kanser ilaçları olması umut edilmektedir.

Çalışmada, vajen izolatlarına ait farklı suşların canlı hücreleri ve kültürlerden elde edilen EPS'lerin HeLa hücreleri üzerinde antiproliferatif, apoptotik etkileri ve belirlenen apoptozun kaspaz 3 ve 9 genlerinin ekspresyon düzeyinde tespiti, ayrıca EPS'nin ve muhtemel probiyotik kültürlerin kanser hücrelerine adezyondaki rolü amaçlanmıştır. Vajinal antikanser ajanı olarak probiyotik canlı kültürleri ile bu kültürlerden elde edilen EPS'lerin mukayeseli olarak araştırılması da çalışmanın bir diğer amacıdır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda araştırmamızda;

1) Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, insan vajen kaynaklı bakteri kültürlerinden, daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış, 16S rRNA'larına göre tam tanımlaması gerçekleştirilmiş, 10 suşun (*L. crispatus* A2, *L. plantarum* G4, *L. gasseri* H10, *L. gasseri* G10, *L. gasseri* R4, *L. gasseri* R2, *L. gasseri* S1, *L. gasseri* H5 ve *L. gasseri* H15) seçilmesi,

2) Bakteri kolonizasyonunda ve hücre yüzeyine tutunmada rolü olduğu düşünülen EPS'nin her bir suş tarafından üretim kapasitesi kültür ortamında belirlenerek; yüksek, düşük EPS üretimine sahip suşların belirlenmesi ve denemelerde kullanılacak EPS'lerin yüksek EPS üreticisi suşlardan saflaştırılarak, liyofilize hale getirilmesi,

3) Yüksek EPS üreticisi olarak seçilen suşların canlı hücrelerinin HeLa hücre hattındaki tutunma yeteneğinin belirlenmesi ve EPS üretim kapasitelerinin hücre adezyonuna etkisinin ortaya konması,

4) HeLa kanser hücre hattında suşların canlı hücrelerinin ve EPS'lerinin antiproliferatif etkisinin araştırılması, bu etkide canlı hücre ve EPS'lerden hangisinin daha etkili olduğunun ortaya çıkarılması,

5) HeLa kanser hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi yüksek suşların canlı hücrelerinin ve EPS üreticisi yüksek suşlardan elde edilen EPS'lerin kanser hücresi üzerine apoptotik etkisinin belirlenmesi ve aynı zamanda apoptotik etkinin morfolojik olarak değerlendirilmesi,

6) Antiproliferatif etkisi yüksek suşların canlı hücrelerinin ve suşlardan elde edilen EPS'lerin (400 µg/ml) kanser hücresi üzerine kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi,

7) Çalışmada apoptotik etki gösteren suşların canlı hücrelerinin ve suşlardan elde edilen EPS'lerin Gerçek Zamanlı PZR ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi tez çalışmasının hedeflerini oluşturmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin doğal insan ve vajen florasındaki olumlu etkileri ve endüstriyel kullanımda giderek artan değeri nedeniyle, üstün probiyotik özelliklere sahip suşların detaylı tanısı üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Uymaz, 2010). Günümüzde hem daha güvenilir ve hem de daha ekonomik olması nedeniyle probiyotik biyoteknolojisine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Çalışmamızda kullanılan suşların, kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemesi ve antikanser ajanlarda önemli olabilecek mekanizmaların ortaya konulması, bu suşların klinik preparatlarda kullanılması bakımından önemli olacaktır. Ayrıca, kanserden koruyucu etkisi son yıllarda sıkça gündeme gelen probiyotik kültürlerin hangi özelliği ile etkin olacağının bilinmesi de, daha etkin koruyucu ajan olarak kullanımı açısından önemli bir avantaj sağlayacaktır. Aynı zamanda probiyotik bakteri kullanımının, bakterinin canlı kalma ve stabilitesi açısından oluşabilecek olumsuzlukları gidermek için, probiyotik bakterilerden elde edilen ve etkinliği çeşitli literatürlerde belirlenen ekzopolisakkaritlerin antikanser ajan olarak kullanılabilirliği belirlenmiş olacaktır. Canlı bakteri kullanımı yerine depolama ve uygulama açısından daha uygun, probiyotik kaynaklı ekzopolisakkaritlerle koruyucu veya tedavi edici destek materyalleri geliştirmek mümkün olabilecektir. Hem probiyotik hem de probiyotik

kaynaklı EPS'nin etki mekanizması tam olarak ortaya konmuş olacağından, ilaç olarak kullanım oranı ve etkinliğini daha fazla artırmak mümkün olabilecektir. EPS gibi probiyotik kaynaklı polimerlerin etkin dozunun ayarlanması, canlı bakteri kullanımına göre daha kolay olması nedeniyle, probiyotiğe göre bir diğer tercih sebebi olabilecektir.

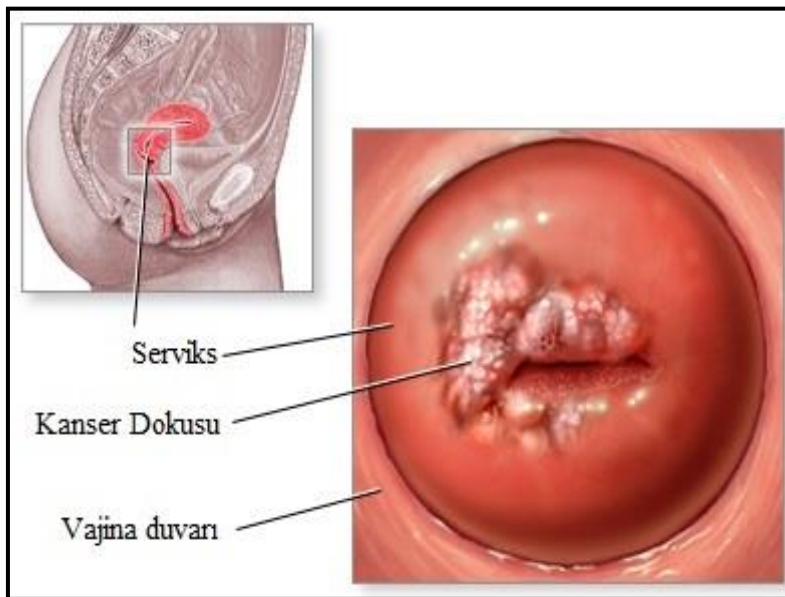
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

2.1.1. Kanser ve genetik yapısı

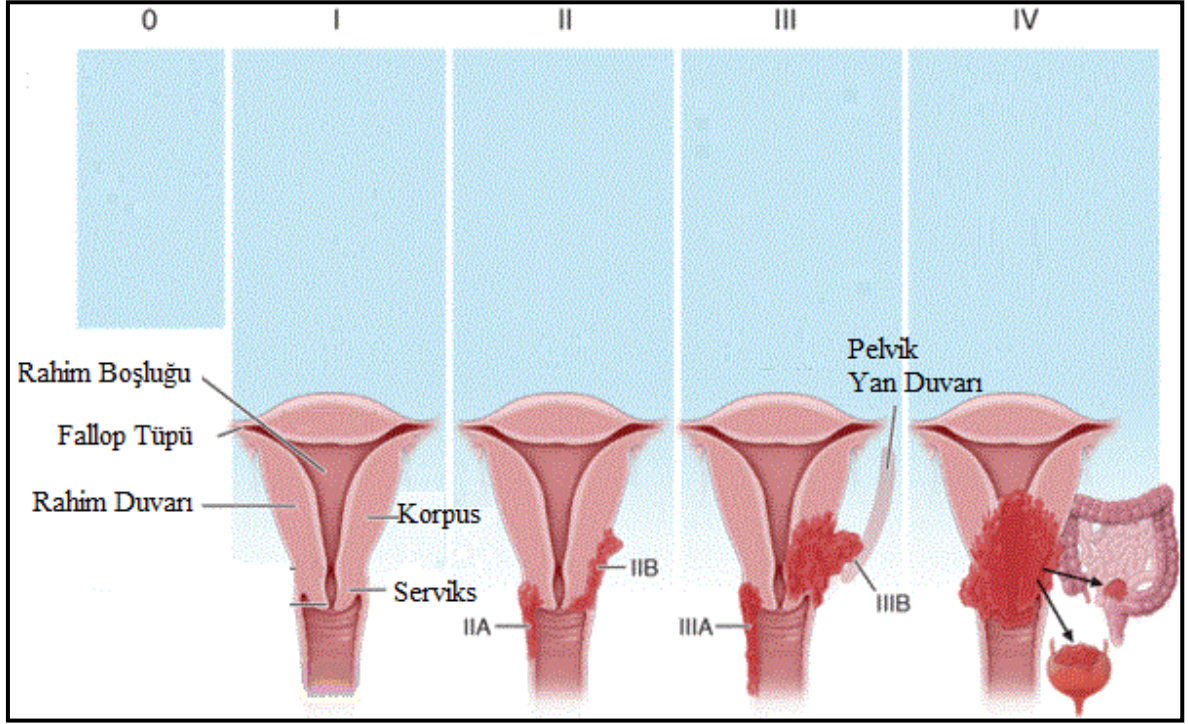
Kanser, çevresel faktörlerin etkisi ile hücrelerin, DNA'sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler sonucu kontrolsüz olarak bölünmeye başlamasıdır. Kontrolsüz hücre çoğalması kanser ifadesi için ana özelliktir; kontakt inhibisyondan kaçabilme, bölünebilmek için dış sinyallere gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme ise hücre kültürlerindeki diğer özellikleri olarak sayılabilir (Akbulut ve Akbulut, 2005; 23).

Bir tümör dokusunun kanser olabilmesi için malign (kötü huylu) özellik göstermesi, başka bir ifade ile kontrolsüz çoğalması, komşu dokulara veya yakın-uzak mesafelere yayılabilme (metastaz; herhangi bir organdaki kanser hücrelerinin vücudun başka bölgelere sıçraması) özelliğine sahip olması gerekmektedir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanser değildir ve bu durumda, benign (iyi huylu) tümör olarak adlandırılır (Nussbaum, McInnes, Willard ve Boerkoel, 2005).



Şekil 2.1. Servikte tümör dokusu (<http://www.nlm.nih.gov>)

Pek çok kanser türünde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşup ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açarlar (Pritchard ve Grady, 2011). Tüm kanserlerin ortak özelliği mutasyonların gen ifadesinde meydana getirdiği değişimden kaynaklı olmasıdır. Kanser türlerinde mutasyonlar, somatik hücrelerde meydana gelir ve oluşan bu mutasyonlar üreme hücreleri ile gelecek nesillere aktarılamaz. Fakat kanser olgularının sadece % 1'inde, eşey kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu da, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Öner, 2003). Kanser oluşumu başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar çoğalarak bir artış gösterir ve kanseri yaygınlaştırır. Tüm bu olaylar zinciri şematik olarak Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Serviks kanseri oluşum aşamaları (<https://cancercervical.wikispaces.com>)

Hanahan ve Weinberg (2000) kanserin 6 önemli niteliğini açıklamışlardır:

a) Büyüme sinyal otonomisi: Bölünebilmek için büyüme faktörlerinin dışında başka bir sinyale ihtiyaç duyan normal hücrelere karşı kanser hücreleri büyüme faktör sinyaline bağımlı değildir. Çünkü büyüme faktör yolağında oluşan mutasyon, kontrolsüz büyümeye sebep olur.

- b) Büyüme inhibitör sinyallerinden kaçınma: Homeostaziyi devam ettirmek için normal hücreler inhibitör sinyallerine yanıt verirler; kanser hücreleri, oluşan mutasyonlar inhibitör yollarını engellediği için büyüme inhibitör sinyallerine yanıt vermez.
- c) Apoptotik hücre ölümlerinden kaçınma: Apoptoz mekanizması aracılığı ile normal hücreler uzaklaştırılır, kanser hücreleri ise apoptotik sinyalden kaçınırlar.
- d) Sınırsız replikasyon potansiyeli: Normal hücreler yaşlandıktan sonra, hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma düzeneğine sahiptirler. Bu hücresel sayaç her DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kromozom uçlarının kısalmasını belirler (telomerler). Kanser hücrelerinde telomeraz uzunluğu korunur. Telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur.
- e) Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu): Besin ve oksijen desteği için normal hücreler kan damarlarına bağıdırlar, fakat olgun bir insanda dolaşım sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, yeni kan damarlarının gelişmesi tümör yaşamı ve büyümesi için gereklidir. Anjiyogenik değişimin aktive edilebilmesi anjiyogenik uyarıcılar ve inhibitörler arasındaki dengenin değiştirilmesi ile sağlanabilir.
- f) İnvazyon ve metastaz: Normal hücreler, vücut içerisinde yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler. Ancak vücudun diğer kısımlarına hareket eden kanser hücreleri, kanser ölümlerinin en büyük nedenidir. Mutasyonlar, invazyona neden olan enzimlerin aktivitesini, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler adezyonu sağlayan molekülleri değiştirir.

2.1.2. Kanser oluşumunda rol alan genler

Kansere neden olan genler, onkogenler ve tümör süpresör genler olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Onkogenler

Normal hücrelerde hücre bölünmesini kontrollü bir şekilde gerçekleştiren protoonkogenlerde mutasyon meydana gelirse kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan onkogenler oluşur. Onkogenler, mutasyona uğramış genlerdir. Onkogenlerin protein ürünleri yüksek miktarda üretilir ve böylece tümör formunun başlatılması için dominant tavır sergiler (Fışkın, 2002). Onkogenler; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptörlerinin üretimini arttırarak, apoptozu baskılayarak kansere neden olmaktadır (Croce, 2008).

Tümör süpresör genler

Anti onkogen olarak da adlandırılan tümör süpresör genler, normalde hücre bölünmesini baskılayan bir grup genlerdir. Tümör süpresör genlerin her iki allelinde meydana gelecek normal işlev kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur (Pazarbaşı ve Kasap, 2003). Pro veya antiapoptotik proteinler, hücre siklusu kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri tümör süpresör genlere örnek olarak verilebilir. En iyi bilinen ve en çok üzerinde çalışılan tümör baskılayıcı gen p53 genidir (Kopnin, 2000). Tümör süpresör gen p53; DNA hasarı, hipoksi (dokularda oksijen oranının azalması) ve sıcaklık şoku gibi çeşitli koşullar tarafından aktive edilebilir. Hasar görmüş hücrelerde p53, büyümenin önlenmesinde önemli rol oynar. p53, hücre siklusunun durmasında ya da apoptozun indüksiyonunda rol alan çeşitli genlerin (Bax, apoptoz aktive edici faktör - APAF-1, kaspaz 9 ve Fas gibi) transkripsiyonunu düzenler (Miyashita ve Reed, 1995; Soengas ve diğerleri, 1999; Owen Schaub ve diğerleri, 1995; Sheikh ve diğerleri, 1998). Hücrede DNA hasarı, p53 ekspresyonunu artırır ve hücre döngüsünün G1'de durdurulmasına yol açarak S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan hasarlı DNA'ya sahip hücrenin çoğalması engellenir. Tümör süpresör gen kategorisinde yer alan DNA tamir genleri; baz kesip çıkarma, hasarın direkt geriye döndürülmesi, yanlış eşleştirme onarımı, nükleotid kesip çıkarma, homolog rekombinasyon gibi aktivitelere sahip olup hücre döngüsü süresince oluşan mutasyonların onarılmasını sağlamaktadırlar (Lahtz ve Pfeifer, 2011).

2.1.3. Serviks kanseri

Serviks kanseri, dünya üzerinde, her iki dakikada bir kadının ölümüne neden olan ve değişik ülkelerde yapılan çalışmalara göre kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucu serviks kanserinin görülme sıklığı 100 000 de 3,96 olduğu bulunmuştur (Arvas, 2007). Vücudumuzun üreme sisteminin önemli bir organı olan vajina; rektum, mesane ve üretra arasında bulunmaktadır. Vajina, uterusu vücudun dışına bağlayan yaklaşık 7-10 cm uzunluğunda bir tüptür. Vajinal duvar üç tabakadan oluşmaktadır. Bunlar epitelyal tabaka, orta kas tabakası ve dış fibröz tabakadır ve yeterli elastiklik için üst üste katlanmıştır (Brannon Peppas, 1993; Valenta, 2005). Vajinal epitelyum, müsinin doğrudan salgılandığı bir yer olmamasına rağmen ince

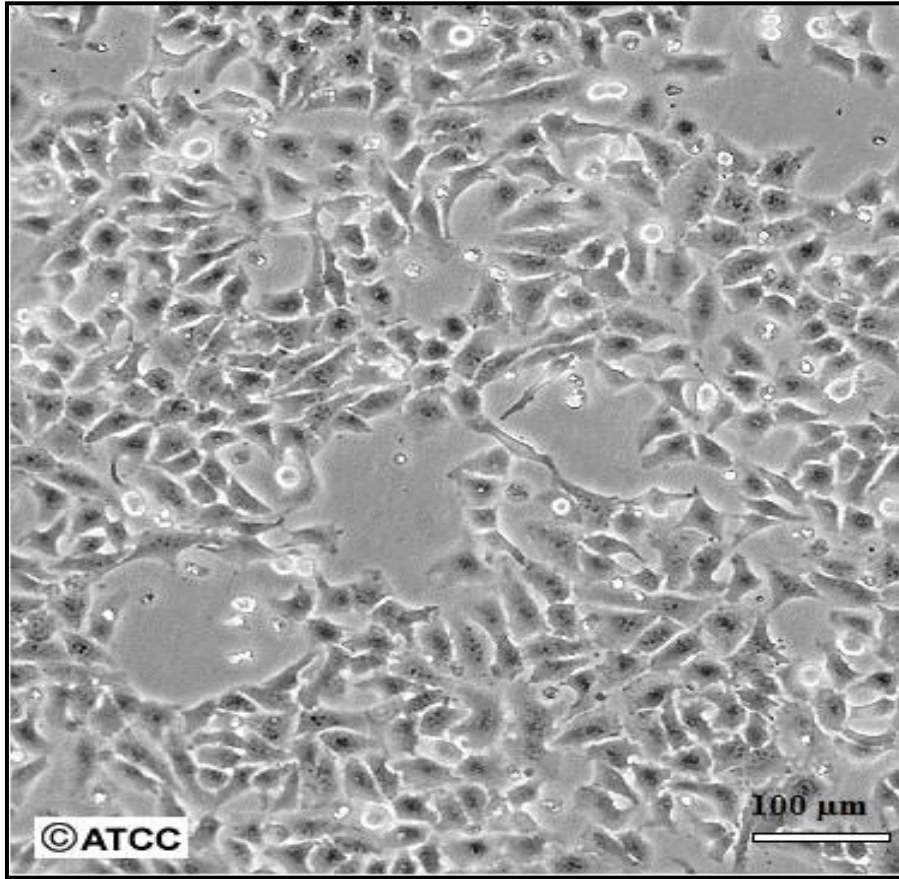
bir sıvı film tabakası ile kaplanmış olup genelde mukozal bir yüzey olarak tanımlanmaktadır (Vermani ve Garg, 2000).

Normal vajina florası koliformlar, difteroidler, aerobik gram pozitif koklar ve diğer potansiyel patojen bakterileri de içeren geniş bir mikroorganizma çeşitliliğine sahiptir (Vallor, Antonio, Hawes ve Hillier, 2001). Vajinal mikroflorada en baskın mikroorganizmalar, Laktobasillerdir. Florayı oluşturan diğer mikroorganizmalar ise; bakteroides, peptokoklar, *S. epidermitis*, korinobakteriler, peptostreptokoklar, B ve D grubu streptokoklar, *E. coli* ve eubakteriumlar' dır. *Candida albicans* ise vajen florasında düşük miktarlarda bulunur. Ayrıca florada *Gardnerella vaginalis* ve *Trichomonas vaginalis* de bulunmaktadır. *Neisseria gonorrhoeae*, HSV (Herpes Simplex Virus) ve HPV (İnsan Papilloma Virüsü) vajen florasında bulunmaz (Balcı ve Çapar, 2005).

Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda serviks kanser gelişiminde HPV, ana etken olarak gösterilmektedir. HPV, 72 kapsomerden oluşan zarfsız ve çift katlı bir DNA virüsüdür. Virüs partikülü ısıya dayanıklı olup DNA içeriği 5,2 milyon daltondur ve 8000 baz çiftinden oluşmaktadır (Arvas, 2007). 200 tip HPV sınıflandırılmıştır. Genital HPV'ler malign tümör indüklemeye potansiyeline göre, yüksek riskli tip, olası yüksek riskli tip ve düşük riskli tip olarak sınıflara ayrılmışlardır (Duenas Gonzalez ve diğerleri, 2005). Düşük onkojenik risk grubundaki HPV tipleri, servikal lezyon ve genital siğillerden sorumludur. Yüksek riskli HPV tipleri ise, servikal kanserlerin ve onun öncüsü olarak kabul edilen prekanseröz, skuamöz intraepitelyal lezyonların % 99,7'sinde saptanmaktadır (Somer, 2009; Trottier ve Franco, 2006). HPV'ler, insanda primer olarak epitel hücreleri ve mukozayı enfekte etmekte; deri ve mukozalarda bazal tabakalardan başlayarak sıklıkla servikal transformasyon zonunda (vajina ve serviks epitel hücrelerinin birbiri ile birleştiği yer) çeşitli lezyonlar oluşturmaktadır. Düşük riskli HPV tipleri (özellikle HPV-6 ve HPV-11), genital siğiller ve lezyonlara neden olurken, yüksek riskli HPV tipleri; servikal, vajinal, anal karsinomayı da içine alan çeşitli kanserlerin gelişiminde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynayabilmektedir (Kanbur ve Çapık, 2011). Serviks kanserine neden olan faktörler arasında düşük sosyoekonomik düzey, sigara, ırk, erken yaşta cinsel ilişki, çok sayıda cinsel eş, doğum sayısının fazlalığı yer almaktadır (Güner ve Taşkıran, 2007; Akhan, 2007; Eren, 2007).

Serviks kanser hücre hattı

1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri Baltimore’da servikal kanser nedeni ile takip edilen Afrika kökenli Amerikalı bir kanser hastasının kanser dokularının laboratuvarında kültürü yapılmıştır. Henrietta Lack adındaki bu kanser hastası kanserin metastaz yapması sonucu hayatını kaybetmiştir, ancak laboratuvarında kültürü yapılan kanser hücrelerinin adı hastanın ad ve soyadının harfleri olan “HeLa” adı serviks kanser hücre hattı olarak isimlendirilmiştir. Bu kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri, antikanserojenik çalışmalar başta olmak üzere birçok çalışmada sıklıkla tercih edilmektedir. İnsan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücre hattı (Şekil 2.3) köken olarak epitel bir hücredir. Bu kanser hücreleri yüzeye tutunarak gelişmektedirler (Rahbari ve diğerleri, 2009; Batts, 2010).



Şekil 2.3. HeLa (ATCC® CCL-2™) kanser hücre hattının mikroskopik görüntüsü
(<http://www.lgcstandards-atcc.org>)

2.1.4. Kanser tedavisi için uygulanan yöntemler

Kanser tedavisi için uygulanan yöntemler; cerrahi, radyoterapi, ilaç (kemoterapi) ve immünoterapidir (Komaki ve diğerleri, 2012). Kanser tedavisinde kullanılan mevcut kanser ilaçlarının birçok yan etkisi olmakla birlikte en önemli problemlerden birisi, bu ilaçların kanser hücreleri üzerine öldürücü etkilerinin yanında sağlıklı hücrelere de öldürücü etki göstermeleridir. Bu yüzden kanser ilaçları, hızlı bölünme durumunda olan sağlıklı hücreler için önemli risk oluşturmaktadır (Di Leva, Briskin ve Croce, 2012). Kanser ilaçla tedavisinde tümör biyolojisi ve tümör-ilaç etkileşmesi, ilacın farmakolojisi, ilaca dirençlilik ve hasta ile ilgili faktörler başarı şansını kısıtlayan faktörlerdendir (Koontongkaew, 2013).

Kanserde ilaç tedavisinin yanı sıra radyoterapi ile tedavi, cerrahi tedaviye oranla daha başarılı sonuçların alındığı bir yöntem olmasına rağmen, iyonize radyasyonun tüm formlarının belli koşullar altında kansere neden olabilmesi nedeniyle her zaman bazı kısıtlamalara açıktır. Kanser oluşumunda, vücudun bağışıklık sisteminde görülen zayıflamanın da etken olmasından yola çıkarak, özellikle vücudun kendi koruma mekanizmasını stimüle ederek, cerrahi, radyoterapi ya da kemoterapi ile tedavi sonrası vücutta kalabilecek az sayıdaki kanser hücresinin tahrip edilebileceği gösterilmiştir (Chabner ve Longo, 2011; Wolchok ve diğerleri, 2009). Kemoterapi, cerrahi tedavi ve radyoterapinin belirli yan etkilerinin bulunması ve başarı şansının düşük olması sebebiyle hastalar, tamamlayıcı ve alternatif uygulamaları tercih etmektedirler (Molassiotis ve diğerleri, 2005). Tamamlayıcı ve alternatif tedavileri, Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi henüz tıbbın bir parçası olarak kabul edilmeyen sağlık bakım sistemleri, ürünleri ve uygulamaları olarak tanımlamaktadır (Ades ve Yarbro, 2000). Alternatif tedaviler, Amerikan Kanser Birliği ve Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından hastalığın geleneksel tedavisinin yerine kullanılan uygulamalar şeklinde tanımlanmakta; Tamamlayıcı tedaviler ise, modern tıp ile birlikte kullanılan tedavileri tamamlayıcı yaklaşımlar olarak ifade edilmektedir. Alternatif ve tamamlayıcı tedavi ile ilgili yapılan çalışmalardan biri, 13 ülkede 26 araştırmada incelenmiştir. Bu çalışmaya göre kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığının % 7 ile % 64 arasında; ortalama % 31,4 oranında değiştiği bulunmuştur (Ernst ve Cassileth, 1998). Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 14 Avrupa ülkesinde, kanser hastalarında tamamlayıcı

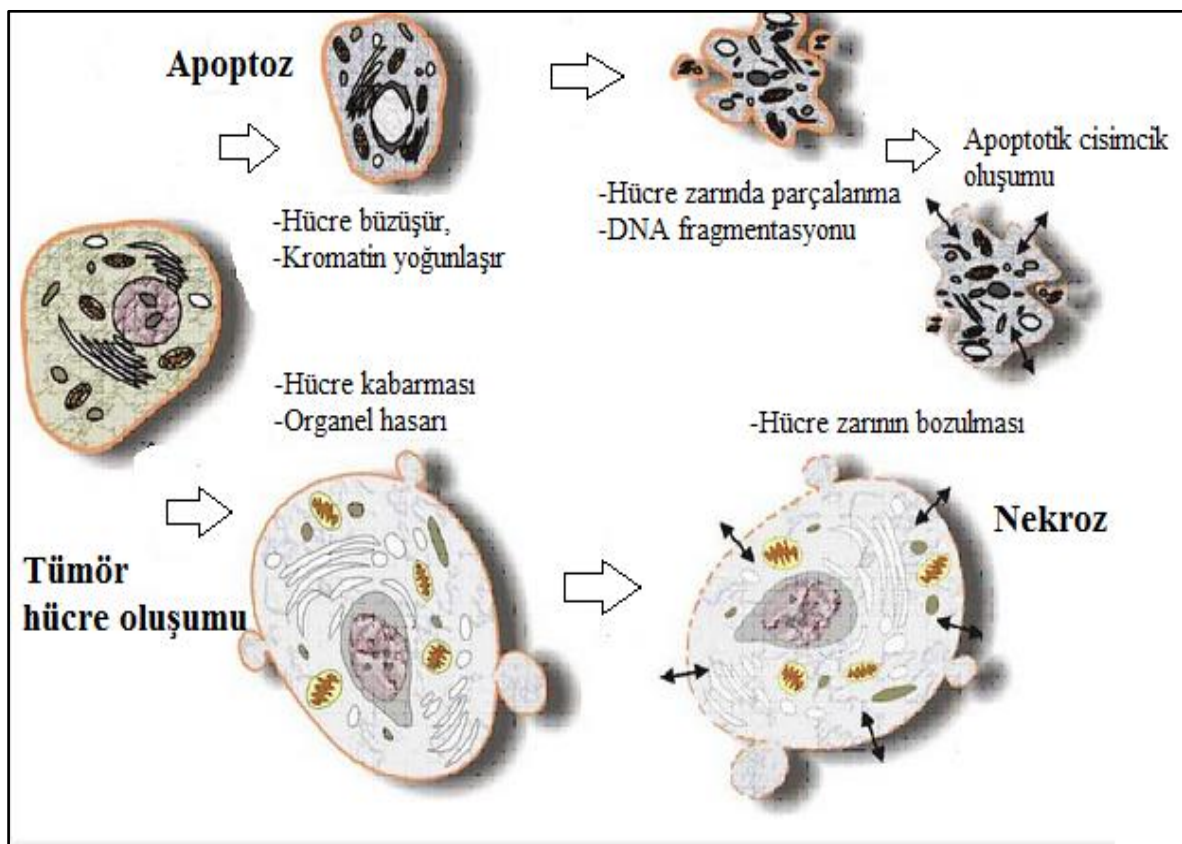
ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığı incelenmiştir. Bu çalışmada, kanser hastalarının tamamlayıcı ve alternatif tedavileri kullanma oranı % 36 olarak (% 15 - 73 aralıklarında) bulunmuştur (Molassiotis ve diğerleri, 2005).

2.2. Kanserde Hücresel ve Moleküler Düzeyde Apoptoz Mekanizması

Canlı bir organizmada hücre ölümünün iki tipi görülür: apoptoz ve nekroz (Sankari, Masthan, Babu, Bhattacharjee ve Elumala, 2012) (Şekil 2.4). Nekroz (kontrolsüz hücre ölümü), hücrenin şişmesi ve hızlı dejenerasyona uğradığı patolojik bir ölüm çeşidi olarak tanımlanır (Cabadak, 2008; Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002). Nekroz mekanizması şu şekilde gerçekleşmektedir: dışarıdan alınan fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik maddeler vb.) hücrenin iyon dengesini bozar ve DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim olan PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) enzimi, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kaybına neden olur. Bunun sonucunda gerçekleşen adenosin trifosfat (ATP) eksikliği, iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece hücre sıvı alması ile organeller şişer ve plazma membran bütünlüğü bozulur, oluşan osmotik basınç nedeni ile hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yangı (enflamasyon, iltihaplanma) olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işareti olarak görülmektedir (Golstein ve diğerleri, 2007; Nicotera ve Melino, 2004).

Nekrozdan farklı olarak kontrollü bir süreç olan apoptoz ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie (1972) tarafından fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur (Thompson, 1994). Apoptotik hücre sayısı, kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur. Normal hücreler, eğer radyasyon ve antikanser ilaçlar gibi fizyolojik olmayan stres çeşitlerine maruz kalırsa ölüm için programlanır (Fanidi, Harrington ve Evan, 1992; Raff, 1992). Kanserdeki birçok hücrenin birikimi yaygın hücre proliferasyonu ve/veya yetersiz apoptoza neden olur. Çok hücreli organizmalarda genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur (Evan ve Littlewood, 1998). Apoptoz olayının

oluşmasından daha önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı). Eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Yapılan *in vitro* çalışmalar apoptozun ani ve hızlı bir olay olduğunu gösterir. Apoptotik uyarıdan sonra hücre, ortamından uzaklaşır; yuvarlaklaşırken içeriği bir araya toplanır ve sitoplazması büzülür. Apoptotik cismin oluşumuna kadar bütün apoptotik olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin fagositozu için daha uzun bir zaman gerekir. Hatta bu işlem 12 – 18 saat sürebilir (Walker, Harnon, Gobe ve Kerr, 1988; Wyllie, Kerr ve Currie, 1980).

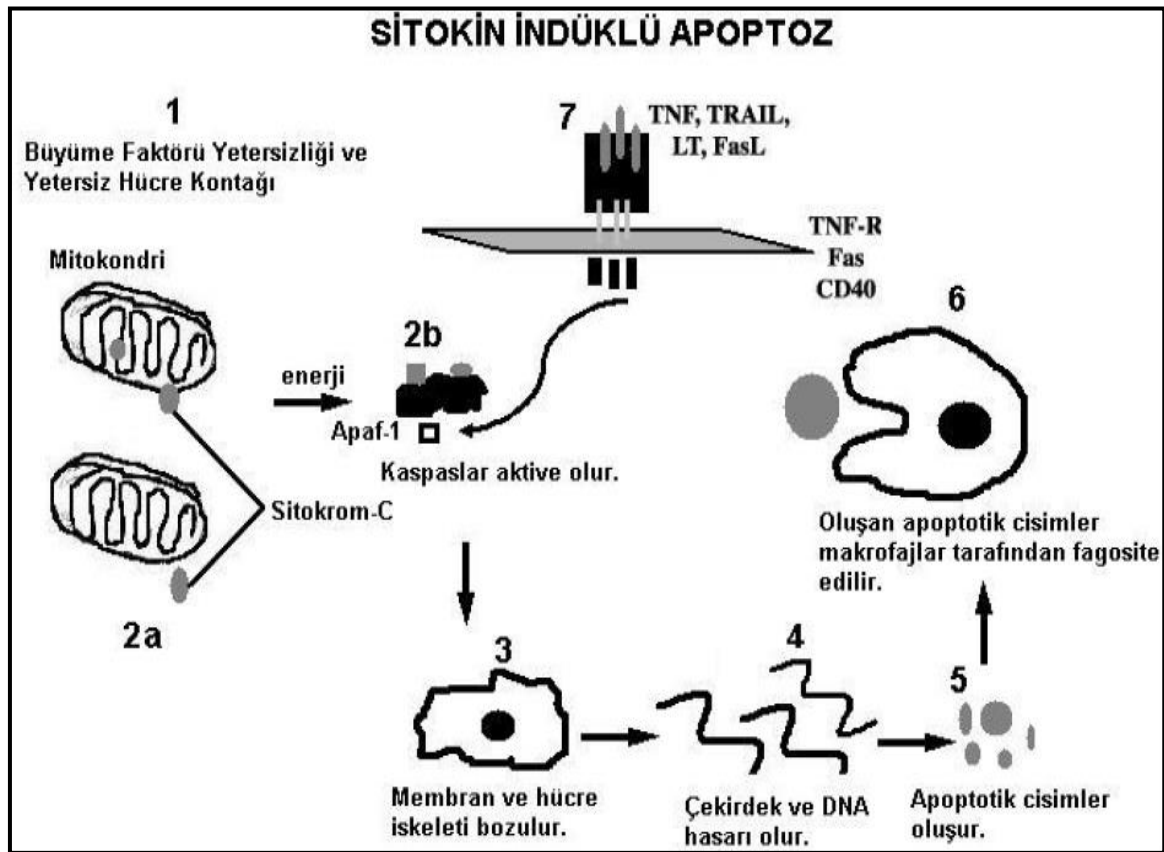


Şekil 2.4. Bir hücrede hücre ölümünün aşamaları (Grasso ve diğerleri, 2012)

2.2.1. Apoptozun moleküler mekanizması

Apoptoz olayının gerçekleşmesi esnasında gözlenen genetik olaylar, hem toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştirmesi, hem de bu işlemde tümör süpresör genleri ile onkoproteinlerin birlikte iş görmesi açısından önemlidir. Apoptoz, membran ölüm reseptörleri yoluyla (ekstrinsik) veya mitokondriyal yolak (intrinsik) ile gerçekleşebilmektedir (Danial ve Korsmeye, 2004). Plazma membranındaki reseptör -

ligand yolağı, tümör nekroz faktörü reseptör (TNFR) ailesinin plazma membran reseptörlerine ligand bağlanması ile başlatılan ölüm yoludur. Tümör nekroz faktörü (TNF), reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör, polipeptidlerin ‘sitoplazmik bölümleri ölüm alanı’ adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. Ölüm reseptörleri CD95 (APO – 1/Fas), TRAIL (TNF - Related Apoptosis - Inducing Ligand) – R1, TRAIL - R2, TNF - R dir. TNF sitolitik aktivitesini Fas (CD95) antijeni aracılığı ile yürütür. Fas ligant (FasL) ve TNF-a, apoptozun prototipik indükleyicileridir (Şekil 2.5). Bu ligantlar belirli reseptör kümelerini indükler (Fas, TNFRI ya da TNFR I), bu da başlangıçtaki sinyal iletim molekülerinin aktivasyonuna neden olur. Fas/FasL sistemi en iyi çalışılmış reseptör aracıl apoptotik yoldur. Ölüm sinyallerinin düzenlenmesi, TNFR ailesinin üyeleri tarafından tetiklenir. Ancak bunların sitotoksik sinyallerinin etkisi, reseptörlerin yüzey ekspresyonunun kritik bir seviyesine bağlı olarak meydana gelir (Itoh ve Nagata, 1993).



Şekil 2.5. Hücre ölüm reseptörlerinden bazılarının apoptozdaki rolü (Leach, 1998)

Oksidatif stres, genetik hasar, sitozolik kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış gibi faktörler, mitokondri dış zar geçirgenliğinde artışa sebep olur. Bu değişim mitokondriyal ölüm yolağını tetikler (Sankari ve diğerleri, 2012). Mitokondriyal ölüm yolağında çeşitli

proteinler rol almaktadır. Bu proteinlerden Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Hemen hemen tüm kanser hücrelerinde gözlenen, hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan özellik kazanmalarındır. Proapoptotik genlerdeki mutasyon ve antiapoptotik proteinlerin aktivitesi ya da artmış ekspresyonu yetersiz apoptoz ve malign hücrelerin büyümesine neden olur (Evan ve Vousden, 2001). Bu sebeple proapoptotik p53 tümör süpresör geninde oluşan mutasyonlar ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler önemli olmaktadır. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar (Çolakoğulları, 2007).

Bcl-2 onkoprotein grubu

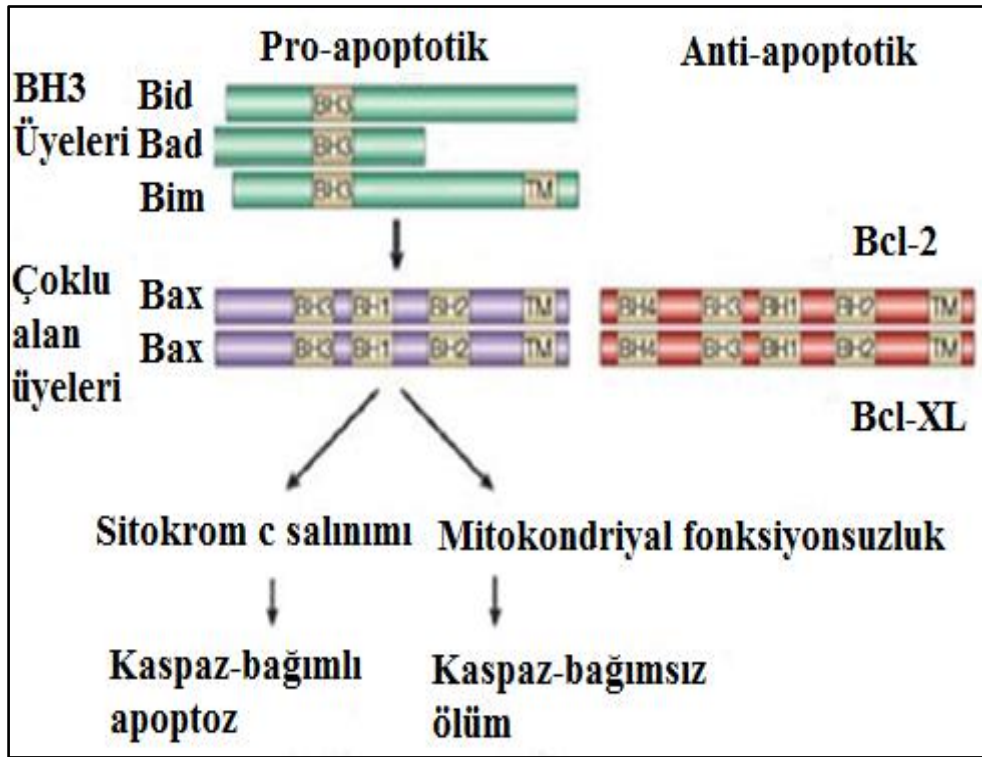
Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur (Şekil 2.6). Birçok kanser türünde bu molekül aşırı ekspre edilmektedir (Ouyang ve diğerleri, 2012).

Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar:

- 1) Bcl-2 alt grubu; Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur. Dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Proteinin C ucundan zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri dış zarına yerleşirler.
- 2) Bax alt grubu; Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler ve hepsi pro-apoptotiktir. Bax difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir. Bu toksin, endozomal/lizozomal zarlarda mRNA çevirimi (translokasyon) baskılayıcı, adenozin 5'- difosfat ribozile edici polipeptid A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür.
- 3) Bik alt grubu; proapoptotik Bik, Bid ve Bim' den oluşur. Bunların yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2' ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler olarak da adlandırılırlar. Belirgin özellikleri heterodimerler oluşturmaları ve böylece eşlerinin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamalarıdır (Atağün, Eren ve Gürkanlı, 2011; Çolakoğulları, 2007).

Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır (Altunkaynak ve Özbek, 2008). Bax, hücrede aşırı

yapıldığında apoptotik ölüm artar iken, Bcl-2 aşırı yapıldığında Bax ile heterodimerize olur ve apoptotik ölüm baskılanır. Bax ya da Bak gibi üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom c'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açar (Tsujiimoto, 1998; Taneja, Tjalkens, Phibert ve Rehemtulla, 2001). Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu, ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom c gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).



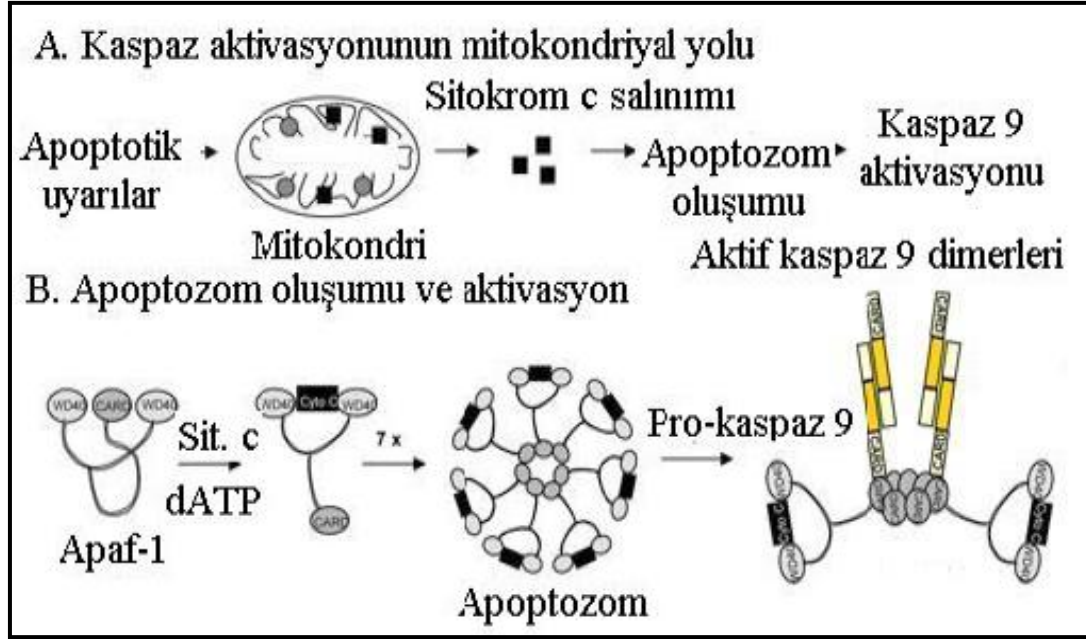
Şekil 2.6. Apoptozda mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri (Atagün ve diğerleri, 2011)

Kaspazlar

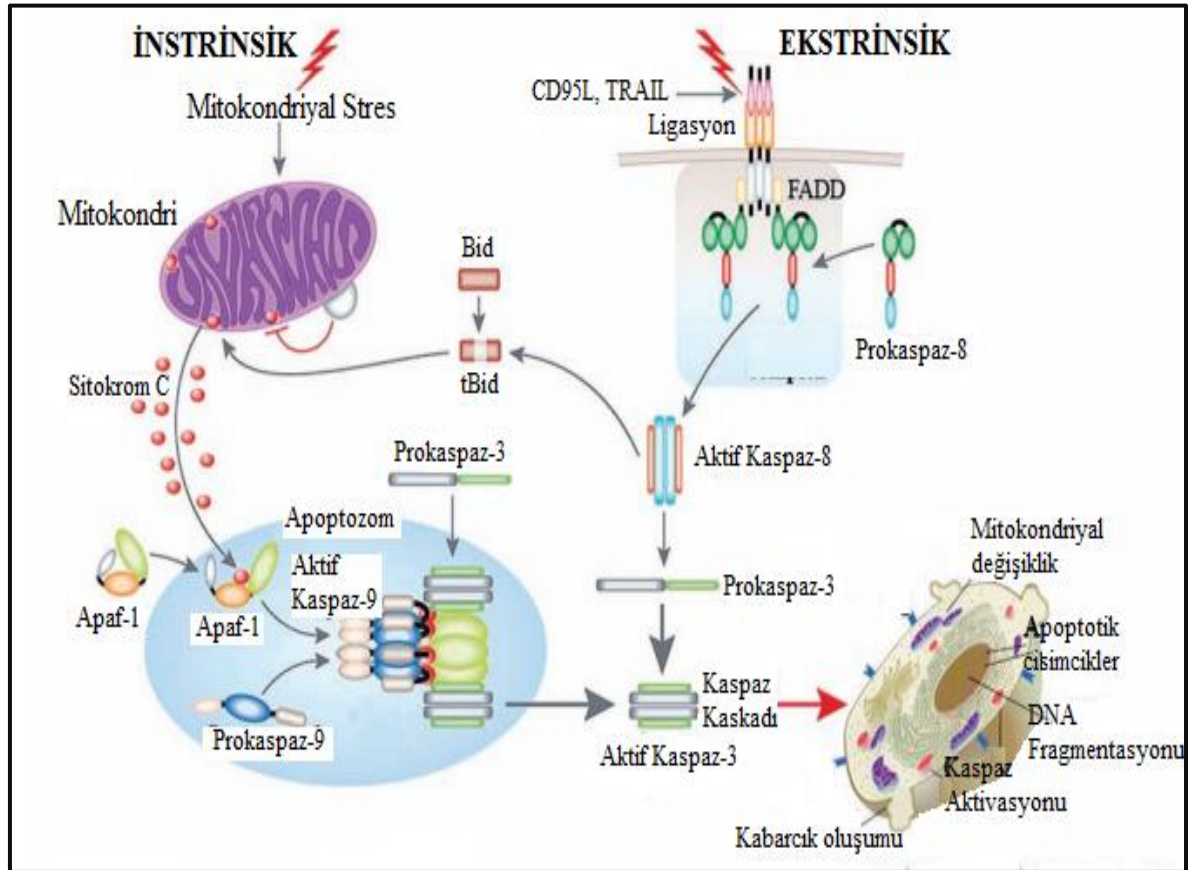
Kaspazlar, apoptoz mekanizmasında ana rol oynamaktadırlar (Sankari ve diğerleri, 2012). Kaspazlar, (caspase, cysteine-dependent aspartate-specific proteases) kalsiyum bağımsız sistein sınıfının en önemli bölümünü oluşturur. Gerek ölüm reseptörleri yolu gerekse mitokondriyal apoptozda rol alan kaspazların günümüze dek 14 izoformu keşfedilmiştir. Apoptozu başlatan kaspazlar (K-2, K-8, K-9, K-10), apoptozu yürüten kaspazlar (K-3, K-6,

K-7) ve sitokin inaktivasyonu (K-1, K-4, K-5, K-11, K-12) (Gültekin, Karaoğlu ve Küçükateş, 2008; Swapan, Edward ve Naren, 2003). Sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunurlar. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri (Şekil 2.7) başlar. Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (Leach, 1998; Saikumar ve diğerleri, 1999).

Kaspaz 3, en önemli kaspaz olarak bilinir ve kaspaz 8, kaspaz 9 ya da kaspaz 10 gibi apoptozu başlatıcı kaspazları herhangi biri ile aktive edilir. Kaspaz-3 spesifik olarak endonükleaz kaspaz aktive edici DNase (CAD)'ı aktive eder. Çoğalan hücrelerde, aktive edici DNase inhibitörü (ICAD), CAD ile kompleks oluşturur. Apoptozu uğrayan hücrelerde, aktive edilmiş kaspaz 3, ICAD'ı parçalar ve CAD'ı serbest bırakır (Sakahira, Enari ve Nagata, 1998). CAD daha sonra çekirdek içerisindeki kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz 3, aynı zamanda hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu ve apoptotik yapılar içerisinde hücrenin parçalanmasını da indükler. Bazı kaspazlar mitokondride inhibe edilir. Bcl-2 ve Bax, mitokondri dış zar geçirgenliğini ayarlar. Apoptotik uyarıda mitokondriyal bir protein olan sitokrom c, APAF-I aktive eder ve ardından ATP'nin katılmasıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9'a dönüşmesine ve diğer efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar (Atagün ve diğerleri, 2011) (Şekil 2.8).



Şekil 2.7. Mitokondri aracılığı ile kaspaz aktivasyonu. A. Apoptotik uyarıdan sonra sitokrom c sitoplazmaya salınır. B. Sitokrom c ve ile APAF-1 heptamerik oluşumu sağlayan konformasyon kazanır (Atagün ve diğerleri, 2011)



Şekil 2.8. Apoptotik yollar: ekstrinsik ve instrinsik yolak (Calvino Fernandez ve Para Cid, 2010)

2.3. Probiyotik Bakteriler

Probiyotikler, insan veya hayvana uygulandığında konakçının mikrobiyal dengesini geliştirerek sağlığı üzerinde yararlı etkiler gösteren tek veya karışım halindeki canlı mikroorganizma kültürleridir (Kaur, Chopra ve Saini, 2002). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandıklarında konağa yararlı etki sağlayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Fijan, 2014). Bifidobakteriler ve Laktobasil türleri, probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Probiyotik bakteriler, Gram (+), sporsuz ve basil şeklindedir. Asitlik, oksijen, sıcaklık gibi çevresel stres faktörlerine karşı probiyotikler son derece duyarlıdır. Dolayısıyla probiyotiklerin mide asitliği, safra tuzları, çeşitli enzimler vb. gibi zor koşullarda da canlılığını koruyabilmesi gereklidir. Probiyotikler kullanılmadan önce güvenlik ve stabiliteyle ilgili belirlenmiş kriterleri karşılamalıdır (Socol ve diğerleri, 2010; Ünal ve Erginkaya, 2010). Probiyotik türlerin seçiminde, yeni üretim teknolojileri ve formülasyonları dikkate alınarak, fonksiyonel özellikleri olanlar öncelikli olmalıdır. İnsan kaynaklı suşların kullanımı, konakçı ile spesifik etkileşimler ve türe bağlı sağlık etkileri açısından önem taşımaktadır (Uymaz, 2010).

Bakterilerin probiyotik bakteri olarak tanımlanabilmesi ve kullanılabilmesi için taşıması gereken kriterler:

- 1) Asit ve safra tuzlarına direnç; Midede ve asidik ürünlerde pH 1,5'e kadar düşebilmektedir. Bu nedenle sindirim sisteminden geçişte probiyotik olarak kullanılacak bir mikroorganizmanın canlı kalabilmesi için lizozim enzimi başta olmak üzere, ağız boşluğunda bulunan enzimlere dayanıklı olması ve midenin bu gastrik ortamından etkilenmemesi gereklidir. Probiyotik mikroorganizmalar, karaciğerde sentezlenen safra tuzlarının olumsuz koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır (Shah, 2001).
- 2) İnsan orijinli olmalı; İnsandan izole edilen ve gelişmiş ileri teknikler kullanılarak teşhisi yapılmış probiyotik mikroorganizmalara ait güvenilir suşlar olmalıdır.
- 3) Tutunma özelliği; Probiyotiklerin en önemli seçim kriterlerinden biri tutunma özellikleridir. Bu bakterilerin bağırsak epiteline tutunma, koloni oluşturma ve

çoğalmaları; patojen mikroorganizmaların tutunmalarını önleyerek kolonizasyonlarını azaltma, immün sistemin modülasyonu ve zarar gören mukozanın iyileşmesine etki göstermesi bakımından önemli olmaktadır (Ouwehand ve diğerleri, 2002).

- 4) Güvenlik; Probiyotik mikroorganizmalar, gıda ve klinik kullanımlarda güvenli olmalı yani patojen özellikte olmamalı ve toksin üretmemeleri gerekmektedir. Suşların doğru olarak tanımlanmaları ve özellikleri doğru bir şekilde belirlenmeleridir (Yerlikaya, Karagözlü, Ender ve Akbulut, 2008).
- 5) Teknolojik açıdan üstün özellikte olma; Genetik stabilitesi olan suşlar, proses ve depolama sırasında yaşama kabiliyetinin olması, iyi duyuşsal özellikler, faj dayanıklılığı ve geniş ölçekli üretimi yapılabilme niteliklerinde olmalıdır (Vasiljevic ve Shah, 2008). Gıdada ve farmasötik ürünlerde probiyotik olarak kullanılan çeşitli mikroorganizmalar mevcuttur (Collins, Thornton ve O’Sullivan, 1998; Kaur ve diğerleri, 2002; Hoessl ve Altwein, 2005). Bu mikroorganizmaların listesi Çizelge 2.1’de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Gıdada ve farmasötik ürünlerde probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. delbreuckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. breve</i> <i>B. lactis</i> <i>B. adolescentis</i>
Diğer	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremonis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak laktik asit üreten mikroorganizmalar olarak ifade edilmektedir (Olaoye ve Ntuen, 2011). Laktik asit bakterileri iki ayrı familyada toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasında *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsine ait türler yer alırken, *Lactobacillus* cinsine ait türler *Lactobacillaceae* familyasına aittirler (Tekinşen ve Atasever, 1994). Laktik asit bakterileri, gram pozitif, “Hem” grupları (sitokrom ve katalaz) olmayan, spor oluşturmeyen, DNA’larında genelde % 50’den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren ve tür morfolojileri kok veya çubuklardan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklinde olan türlerdir. Hemen hepsi hareketsizdir. Laktik asit bakteri türleri fermentatif, oksijene toleranslı ya da anaerobik, asidürik ya da asidofilik olup, gelişebilmeleri için karbonhidratlar, aminoasitler, peptitler, yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler gibi kompleks besinlere gereksinimleri olan mikroorganizmalardır. Glikozu, karbon kaynağı olarak kullanan laktik asit bakterileri ya homofermentatif (% 85’den fazla laktik asit üretirler) ya da heterofermantatifler yani eşit oranlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol (ve/veya asetik asit) üretirler (Çakır, 2003; Gismondo, Drago ve Lombardi, 1999; Tannock, 2004; Kao, Liu ve Shyu, 2007; Naidu, Bidlack ve Clemens, 1999).

Optimal gelişim gösterdikleri ortam 35-40°C sıcaklık ve 6,5-6,8 pH’dır. Bu bakteriler aynı zamanda % 1-3 oranında laktik asit oluşturarak pH’yı 3,2-3,5’e kadar düşürürler; bu nedenle asite dayanıklıdırlar. Laktik asit bakteri türleri, doğada karbonhidrat içeren substratların zengin bir şekilde elde edilebileceği ortamlarda bulunmalarından dolayı, süt ve süt ürünlerinde, insan ve diğer canlıların sindirim sistemleri, vajina, diş ve ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, ayrıca bazı iç organlar gibi farklı habitatlarda rastlanılabilmektedirler (Ljungh ve Wadström, 2006; Tannock, 2004). Laktik asit bakterileri, canlı mikrobiyal gıda katkı maddeleri olarak en iyi bilinen probiyotiklerdir. Mide asidine ve safra tuzlarına dayanıklı olmaları, besinlerle alındığı zaman canlı olarak bağırsaklara geçebilmelerini sağlamaktadır. (Tunail, 2009).

2.4.1. Laktik asit bakterilerinin kontrol mekanizmaları

İmmün sistem üzerine etkileri

Spesifik ve doğal immüneyi etkileyerek, konakçının immün sistemini uyaran LAB; M hücreleri ve epitel hücreleri arasında yer alan dendritik hücreler ile etkileşime geçebilmektedirler. Dendritik hücreler, farklı mikrobiyal suşlar arasında ayırım yapabilme yeteneğine sahiptirler. Mikroorganizmalar, dendritik hücreleri stimüle ederler. Bunun sonucunda hücre içi patojenler ile savaşan T yardımcı-1 (Th1), hücre dışı bakteriler, parazitler ve toksinlere karşı etkili T yardımcı-2 (Th2) ve düzenleyici T hücrelerine (Treg) karşı hücre cevabı oluşmaktadır. Probiyotik bakteriler, interlökin (IL) - 12 ve IL-10 düzeyini artırarak dendritik hücrelerin olgunlaşmasını indüklemektedir. Böylece probiyotik bakteriler ile dendritik hücreler arasındaki ilişki, immün regülasyonuna neden olmaktadır (Madsen, 2006). Epitel hücrelere tutunan probiyotik bakteriler ya da fragmentleri ise hücre içine alınmaktadır. İmmün sistemin uyarılması üç başlık altında incelenmiştir (Can, 2007):

Spesifik olmayan savunma mekanizmasında bulunan immün sistem hücrelerine olan etkileri

Laktik asit bakterileri, makrofajların aktivasyonunu uyarırlar. Makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositoz; yabancı bir maddenin genel reaksiyonuna cevap veren, organizmada spesifik olmayan asıl savunma mekanizmasıdır. Makrofajların aktivasyon durumu, konakçının doğal immün yanıtının bir ölçüsüdür. Bağırsak da yaşayan yararlı mikroorganizmalar ve onların antijenleri bağırsak epitel hücrelerine penetre olarak, immün sistemi uyarabilir, baskılayıcı hücrelerin üretimini kolaylaştırabilir ve lenfositlerin farklılaşmasını stimüle edebilirler.

Spesifik immün yanıt mekanizmasında bulunan hücrelerine etkileri

Spesifik immün sistem; humoral (B lenfositlerinden salgılanan antikorlar) ve hücresele (T lenfositleri) olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Spesifik immün yanıtta artış, T ve B lenfositlerin aktivasyonu ile kendini gösterir. *L. plantarum* 299 suşu içeren ürünlerin tüketimiyle bu bakterilerin bağırsak bölgesine kolonize olması ve HIV enfeksiyonuna olan etkisini belirlemek üzere bir çalışma yapılmıştır. *L. plantarum* 299 suşu içeren sıvıyı

almadan önce, çocuklarda gözlenen kronik diyare, ağız ülseri ve kilo almada zorluk görülmesine rağmen, 1 ay süreyle *L. plantarum* 299 ile beslenmeyi takip eden günlerde önemli iyileşmeler görülmüştür. Bununda *L. plantarum* 299 suşunun immün yanıt üzerindeki pozitif etkisinden kaynaklandığı vurgulanmıştır.

Salgısal immün sistem üzerine etki

LAB'nin varlığı antikorların üretimini, özellikle de bağırsak içinde salgısal Ig M'nin üretimini kolaylaştırır. İmmunoglobulin (Ig) A'ların sindirim içeriğinde mevcut antijenlerle direk olarak teması, bağırsak sisteminde çok önemlidir. Ig A, mukoz yüzeye patojenlerin tutunmasını inhibe edebilir. LAB'lerinin aşağıdaki nedenlerden dolayı immün sistem üzerinde pozitif etki yaptıkları vurgulanmıştır:

- İntestinal enfeksiyonlarda koruyucu amaçla kullanılırlar.
- İmmün sistemi etkileyen etkenlere karşı organizmayı korurlar.
- İmmün sistemi harekete geçirirler.

Antikarsinojenik etki

Probiyotik mikroorganizmaların, kanseri baskıladığına dair doğrudan deneysel kanıtlar olmamasına rağmen dolaylı olarak kanser üzerine etkili olduğu ve kimyasal karsinojenlere karşı hassasiyeti azalttığı bildirilmiştir. Probiyotiklerin antikanserojenik etkileri ana başlıklar altında aşağıdaki gibidir:

- Konak immün yanıtının arttırılması
- Karsinojenleri bağlama ve degrade etme
- Antitümör ya da antimutajenik bileşiklerin üretilmesi (Burns ve Rowland, 2000).

Konak immün yanıtının arttırılması

Tümör mikroçevresi, tümörün ilerlemesini ve yayılmasında yer alan pek çok farklı hücreden ve bunların salgıladıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bu sinyal moleküllerin içerisinde, tümör oluşumunda ve yayılmasında en fazla rolü alan sitokinlerdir. İnterlökin (IL)-8, normal hücreler dışında tümör hücrelerinden de salınmakta ve akut

inflamatuvar reaksiyonların başlatılmasında rol almaktadır. Antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'un antimetastatik ve antitümör aktiviteye sahip olduğu *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Borruec ve diğerceri (2002), Chron's hastalığına sahip kişilerin ileal örneklerinin *L. casei* ve *L. bulgaricus* ile muamele edilmesinden sonra TNF- α üretiminde düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuç Th1 ilişkili enflamasyonun probiyotikler tarafından düşürüldüğünü göstermektedir.

Karsinojenleri bağlama ve degrade etme

Bağlanmada bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanları ile polisakkaritler önemli rol oynamaktadır. Bolognani, Rumney ve Rowland (1997), et tüketiminin yoğun olduğu genellikle batı tarzı diyetlerde bulunan mutajenik bileşiklerin *in vitro* şartlarda laktik asit bakterileri tarafından bağlanabildiğini ve bu bağlanmada bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanları ile polisakkaritlerinin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Diyetle alınan bazı karsinojenlerin (benzo (a) piren, aflotoksin B1) ve pişmiş gıdalarda bulunabilen karsinojen bileşiklerin (2-amino-3-metil-3H-imidizol (4,5-f) quinolin, 2-amino-3,8-dimetilimidizol (4,5-f) quinaksalin) laktik asit bakterileri tarafından bağlanma potansiyelleri çalışılmıştır. Bağlanma derecesinin özellikle pH'ya ve karsinojenle bakterinin etkileşim süresine bağlı olduğu *B. longum* ve *L. acidophilus*'un benzo(a) piren *in vitro* şartlarda oldukça etkili bir şekilde bağladığı belirlenmiştir.

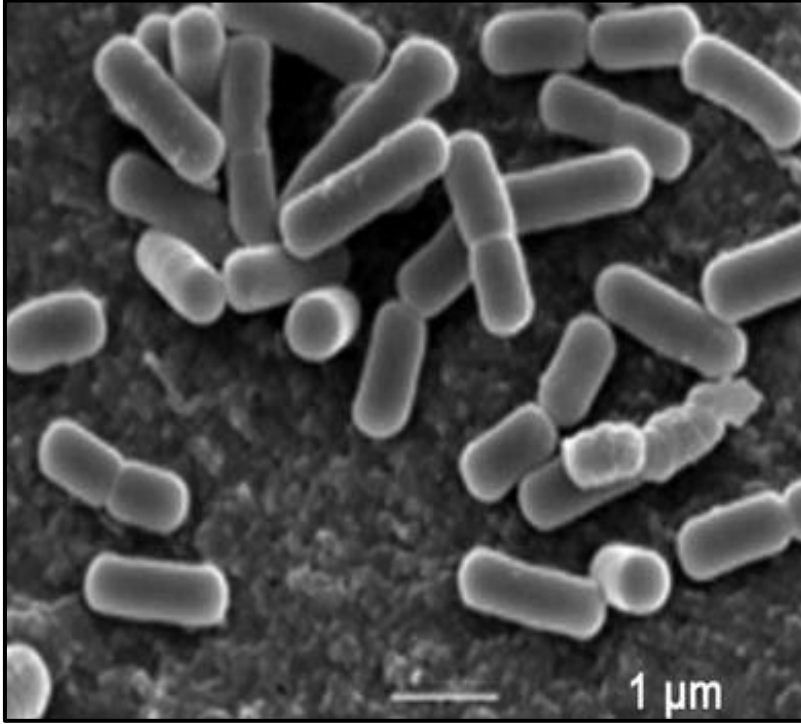
Antitümör ya da antimutajenik bileşiklerin üretilmesi

Probiyotik mikroorganizmaların ürettikleri metabolitlerin kanser gerilemesi üzerindeki rolü; farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Kısa zincirli yağ asitlerinin tümör gelişimini azaltmasındaki rolü dikkat çekmeye başlamıştır. Probiyotiklerin, luminal substratları fermente ederek kısa zincirli yağ asitlerinden (KZYA) asetik asit, bütrik asit ve propiyonik asit üretmektedirler. KZYA'dan olan asetik asitin gram negatif bakteriler üzerinde etkin bir antogonistik aktivite göstermektedir. Bu asitlerin üretimi bağırsak pH'sını düşürmekte, bazı patojen ve çürükçül bakterilerin gelişimini engellemektedir. Bağırsak pH'sının kontrolü, bakteri toksinlerinin veya karaciğer hastalıkları ve dolaşım sistemindeki bozukluklara neden olan fenol ve aminlerin üretimini de kısıtlamaktadır.

2.4.2. Laktik asit bakterileri ve vajinal mikroflora

Serviksin mikroflorasında hem aerobik hemde anaerobik bakterilerin bulunduğu bildirilmiştir (Charteris, Kelly, Morelli ve Collins, 1997). Vajina epitelinde östrojen hormonunun salımından sorumlu glikojen depoları bulunmaktadır (Paavonen, 1983). Vajinadaki laktik asit kaynağının çoğunluğunu vajinal bakterilerin oluşturduğu bildirilmiştir (Boskey, Cone, Whaley ve Monech, 2001). Vajinal floranın pH'nın <4-5 olmasının sebebi olarak laktobasillerin (Şekil 2.9) çoğunlukta olması gösterilmektedir (Redondo Lopez ve diğerleri, 1990). Mikrofloranın düşük pH'da olması patojenlerin kolonizasyonunu engellemektedir (Tomas, Ocana, Wiese ve Nader Macias, 2003). Yaşa bağlı olarak vajinanın florası dört dönemde incelenmektedir. Neonatal dönem (yenidoğan dönemi), Prepubertal dönem (ergenlik öncesi dönem), Postpubertal dönem (ergenlik sonrası dönem), Postmenopozal dönem (menopoz sonrası dönem) olarak incelenir. Anne hormonlarının etkisinde bulunan doğumdan hemen sonra bebeğin vajinal florası asidik ortamında aerob laktobasiller bulunur. Vajinal florada laktobasiller puberteye kadar bulunmaz ve vajen flora pH'sı ise nötraldir. Bu dönemde *S. epidermidis* Gr (+) ve Gr (-) koklarla, Gr (-) koliform basillerden oluşan karışık bir flora bulunur. Menopozdan sonrada vajina florası buna benzerlik gösterir. Vajinal flora puberte ile değişir ve vajina epitelinde kornifikasyon ve yassılaşıma meydana gelir. Bu dönemde florada bulunan bakteriler; *Lactobacillus* (florada yoğun miktarda), *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Listeria* cinsleri ile *G. vaginalis* bulunmaktadır. Menopozdan sonra laktobasiller tekrar ortamdan kaybolurlar ve yine karışık bir bakteri florası oluşur. Laktobasil cinsine ait bakterilerin insan vajinasının normal florasında çoğunlukta görülen mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir (Lepargnuer ve Rousseau, 2002). Mukozadaki bir biyofilm tabakasını oluşturan Laktobasil cinsine ait bakteriler sağlıklı bir insanın vajinal mikroflorasını oluşturmaktadır. Bu bakteriler, vajen epiteline yapışarak, diğer mikroorganizmaların vajen içinde yayılıp, burada gelişmelerini engeller. Hidrojen peroksit üretimi ve pH'nın 4,0-4,5 arasında değişkenlik göstermesi bakteriyal vajinal enfeksiyonlara karşı mikroorganizmaların oluşmasını engellemektedir (Sobel ve Chaim, 1996). Bunun yanı sıra vajinal floranın pH'nın artması Laktobasil cinsine ait bakteri türlerine negatif etki ettiği, ayrıca laktik asidin ve laktobasillerin lokal asidifikasyonunun vajinal ekosistemin yenilenmesini sağladığı gösterilmiştir (Melis ve diğerleri, 2000). Gebelik, yaş, menopoz, antibiyotik ve sigara kullanımına bağlı olarak vajinal

mikrofloranın içeriği değişmekte, Laktobasil cinsine ait bakteri turlerinin vajinadaki oranını dűřürmekte ve buna bağlı vajinal enfeksiyonların arttığı bildirilmektedir (Redondo Lopez ve diğerleri, 1990; McGroarty, 1993; Charteris ve diğerleri, 1997).



şekil 2.9. Laktobasillerin mikroskopik görüntüsü (Ghoneum ve Gimzewski, 2014)

Vajen florasında yer alan LAB'nin ürogenital enfeksiyonları önemli ölçüde önlediği ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara sebep olan patojenleri engellediği gözlemlenmiştir (Vasquez, Jakobsson, Ahrne, Forsum ve Molin, 2002). Sağlıklı kadının vajinasında % 100 oranında Laktobasil cinsine ait bakterilerin izolasyonu rapor edilmiştir (Lepargnuer ve Rousseau, 2002). Schroder yaptığı çalışmada laktobasillerin vajen florasındaki koruyucu rolünü, laktobasillerin dominant olduğu durumlarda en az patojenlerin bulunduğu ve laktobasillerin bulunmadığı ortamlarda, patojenlerin en yoğun olduğunu belirtmiştir (Eryılmaz Turhan, 2011). Yapılan alışmalarda LAB'lerin, sağlıklı kişilerin gerek bağırsak, gerekse vajen florasında bulunarak patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyolojik bir bariyer görevi oluşturduğu görűlmektedir. Ayrıca, kanserojen maddelere karşıda önemli bir savunma birliği içindedirler (Charteris ve diğerleri, 1999). Vajinal floranın dominant ajanları olan laktobasiller, vajinanın doğal dengesinin korunmasında ve patojenlerin yerleşmesinin engellenmesinde önemli rol oynadıkları çeşitli araştırmalar sonucu gözlenmiştir. Laktobasillerin vajinayı patojenlerin kolonizasyonundan,

epitele yapışmalarını engelleyerek ya da üremelerini inhibe eden maddeler salgılayarak koruduğuna inanılmaktadır (Redondo Lopez ve diğerleri, 1990; Prasad ve diğerleri, 1998). Antonio, Hawes ve Hillier (1999), *L. crispatus*, *L. jensenii* ve *L. gasseri* vajinadaki en önemli türlerinin olduğunu belirtirken, kadınların hiçbirinden *L. acidophilus* izole edilmediğini bildirmiştir. Diğer çalışmalarda *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. acidophilus* vajinada çoğunlukla görüldüğü belirtilmiştir (Redondo Lopez ve diğerleri, 1990, Reid, 1996; Zhong, Millsap, Bialkowska Habrzanska ve Reid, 1998). LAB'nin vajen florasındaki çeşitliliği birçok nedene bağlı olarak değişmekle birlikte bulunduğu miktara göre insan sağlığında olumlu yönde önemli bir yer teşkil etmektedir.

2.4.3. Laktobasillerin vajinal florada etkili olan özellikleri

Laktik asit üretimi ve düşük vajinal pH

Vajinadaki laktik asit kaynağının çoğunluğunu vajinal bakterilerin oluşturduğu bildirilmektedir (Boskey, Telsch, Cone, Whaley ve Monech, 1999; Boskey ve diğerleri, 2001). Laktobasiller, vajinayı döşeyen çok katlı yassı epitel hücrelerinde glikojen olarak depo edilen glikozu fermente ederek enerji üretirler. Fermantasyon sonucu laktobasiller tarafından üretilen laktik asit, ortam pH'sını düşürerek vajen asiditesinin sabit bir değerde (pH 4-4.5) kalmasını sağlar (Vallor ve diğerleri, 2001; Boris ve Barbes, 2000; Dembele, Obdrzalek ve Votava, 1998). Rönnqvist, Forsgren-Brusk ve Grahn-Hakansson (2006) yaptıkları çalışmada, ortalama vajinal pH'nın, vajinadaki laktobasil miktarı yüksek düzeylerde olduğunda önemli derecede düştüğünü göstermişlerdir. Vajinal pH değerinin 6,0'nın üzerinde (6,0-7,5 aralığı) olması enfeksiyona yol açan patojenlerin varlığını işaret etmektedir (Hanna, Taylor Robinson, Kalodiki Karamanoli, Harris ve McFadyen, 1985). *In vitro* çalışmalar çeşitli Laktobasil cinsine ait türlerin üreme ortamlarının asidifikasyonunun *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Eschericia coli*, *G. vaginalis*, *C. albicans* türlerini içeren patojen mikroorganizmaların çoğalmasını önlediğini göstermiştir (McGroarty, 1993; Tomas ve diğerleri, 2003).

Hidrojen peroksit üretimi

Laktobasil cinsine ait türlerin ürettikleri hidrojen peroksit (H_2O_2), patojen mikroorganizmaların aktivitesini inhibe ederek vajinal ortamın ürogenital sistem

enfeksiyonlardan korunmasına yardımcı olmaktadır (Sobel ve Chaim, 1996). Vajinal florada H_2O_2 üreten türler de dahil olmak üzere laktobasil miktarında ve konsantrasyonunda azalma ve *G. vaginalis*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma hominis*, *Bacterioides* türleri; *E. coli* ve enterokoklar gibi bakterilerin yoğunluğunda artış ile ortaya çıkan bir hastalık olan bakteriyel vajinozis (BV), kadınlarda ürogenital hastalıkların en büyük nedenidir. BV, yaşamı tehdit edici bir hastalık olmamasına rağmen, HIV enfeksiyonu gibi cinsel yollar ile bulaşan hastalıkların oluşma riskini artırmaktadır. Knezevic ve diğerleri (2005), HIV pozitif kadınlardan HIV negatif kadınlara göre daha az miktarda H_2O_2 üreten laktobasil izole etmişlerdir. Otero ve Nader-Macias (2006), sığır vajinasından izole ettikleri *L. gasseri* CRL 1421 suşunun H_2O_2 ve laktik asit üretiminin etkileri sonucu *S. aureus* üzerinde inhibitör etki gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmaların sonuçları, laktobasillerin özellikle H_2O_2 üreten türlerinin hayvanda ve insanda enfeksiyon riskini azalttığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen, genellikle aynı veya yakından ilişkili türlere ait suşları inhibe eden ve dar bir aktivite spektrumu gösteren protein yapısında bakterisidal maddelerdir. Vajinanın normal flora üyesi olan laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinler, ortamda bulunan diğer mikroorganizmalara karşı savunma amaçlı olarak sentezlenir. Araştırmalar insan vajinasında bulunan *L. salivarius* türü tarafından üretilen Salivaricin CRL 1328 adlı ısıya dayanıklı bir bakteriyosinin, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *N. gonorrhoeae* türlerini etkilediği bildirilmiştir (Dover, Aroutcheva, Faro ve Chikindas, 2008; Aroutcheva ve diğerleri, 2001; Ocana, de Ruiz Holgado ve Nader-Macias, 1999).

Adezyon (Tutunma) yeteneği

Bir bakterinin probiyotik sayılabilmesi için kullanılan ana özelliklerden biri de epitel hücrelere tutunma yeteneğidir (Salminen, Ouwehand, Benno ve Lee, 1999). Bağırsak, ağız mukozası ve genital mukoza, patojen bakterilerin vücuda girmesi ve vücutta hastalık oluşturması bakımından en elverişli yüzeylerdir. Mukozal yüzeylerin çok katlı epitel tabakası, konakçıyı patojenlere karşı bir bariyer görevi üstlenerek korumaktadır. Fakat bazı durumlarda bu bariyer kırılmakta ve patojenler, epitel hücrelere yapışarak enfeksiyona neden olmaktadır. Epitel hücrelerin yüzeyinde bulunan çeşitli adezyon molekülleri,

bakteriler için reseptör görevi görmektedir ve bakteriler bu molekülleri tanıyarak epitel hücrelere yapışmaktadır (Kagnoff ve Eckmann, 1997). Probiyotikler, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, immün sistemi düzenleme, zarar gören mukozanın daha hızlı iyileşmesini sağlama gibi sağlığa faydalı etkilerini ancak tutunup kolonize oldukları zaman gösterebilirler. (Ouwehand, Kirjavainen, Shortt ve Seppo, 1999; Kirjavainen, Ouwehand, Isolauri ve Salminen, 1998). Epitel yüzeylere adezyon, laktobasillerin kolonizasyonunda önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Laktobasiller, vajinadaki patojen bakterilerin kolonize olmasını ve vajinanın epitel yüzeyine yapışmasını engellemek için patojenler ile yarışmaya girerek bariyer oluştururlar ve böylece vajinal florayı koruyabilmektedirler (Osset, Bartolome, García ve Andreu, 2001; Kaewsrichan, Peeyananjarassri ve Kongprasertkit, 2006). Laktobasillerin vajinayı üropatojenlerin kolonizasyonundan koruma mekanizmaları, adezyon reseptörleri (etkileşim ve koagregasyon) için yarışma ve antimikrobiyal maddelerin (H₂O₂, laktik asit, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi) üretimi olarak özetlenebilir (Osset ve diğerleri, 2001). Karbonhidrat metabolizması sonucu üretilen laktik asit vajinal pH'nın < 4,5' te kalmasını sağlayarak patojenlerin gelişimini engellemektedir.

Laktobasillerin patojenik mikroorganizmaların insan epitelyal hücrelerine adezyonunu engellemek için kullanıldıklarını gösteren *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışma mevcuttur. Chan, Reid, Irvin, Bruce ve Costerton'un 1985 yılında yaptıkları bir çalışmada, HeLa hücrelerine adezyon için ürovajinal laktobasil kültürleri ile üropatojenler arasındaki yarışmada etkili mekanizmanın, reseptör bölgelerin spesifik blokajından farklı olarak laktobasillerin hücre duvarı fragmanlarından kaynaklı sterik engelleme olduğunu ileri sürmüşlerdir. Atassi, Brassart, Grob, Graf ve Servin (2006), üropatojenik Afa/Dr *E. coli*'nin (Afa/Dr DAEC) IH11128 ve 7372 suşlarına karşı sağlıklı kadınların vajinalarından izole edilen *L. jensenii* türüne ait KS119.1 ve KS121.1 suşları ve *L. gasserii* türüne ait KS120.1 ve KS124.3 suşlarının antibakteriyel aktivitelerini araştırmakla birlikte bu suşların, HeLa hücreleri üzerine *E. coli* IH11128 suşunun adezyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *L. jensenii* ve *L. gasserii* türlerine ait suşların, *E. coli* suşları ile 18 saat muamelesi sonrası *E. coli*'nin gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *L. rhamnosus* GG ve negatif kontrol olarak *E. coli* IH11128 suşunun kullanıldığı adezyon deneyinde sonuç olarak KS119.1, KS120.1 ve KS121.1 suşlarının etkili olduğu görülmüştür.

2.5. Probiyotiklerde EPS'nin Yapısı ve Klinik Uygulamalardaki Yeri

2.5.1. EPS'nin yapısı

Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış, tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen bu bileşikler, kompleks bir biyopolimer karışımıdır. Laktik asit bakteri grubuna dahil olan birçok mikroorganizma tarafından üretilen EPS'ler, mikroorganizmalar arasındaki boşlukları doldurarak mikrobiyal agregatların oluşmasını sağlamakta ve biyofilm matriksinin yapısını meydana getirmektedirler (Vu, Chen, Crawford ve Ivanova, 2009). Farklı LAB'den üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları ve proteinlerle ilişkileri de farklılık göstermektedir. EPS sentezi, bakteri cinslerine göre değişiklik gösteren ve enerji bağımlı bir işlemdir. EPS üretimi ve üretim miktarı, mikroorganizmanın gelişimi için kullanılan besiyerine ve ortam şartlarına göre değişiklik göstermektedir (Welman ve Maddox, 2003; Patel, Michaud, Singhanian, Soccol, and Pandey, 2010). EPS oluşumuna etki eden en önemli faktörler, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve ortamın pH'sıdır. Yapılan çalışmalar sonunda *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* türünün EPS üretimi için gerekli olan pH değerinin 6,5 olduğu bildirilmiştir (Welman ve Maddox, 2003; Broadbent, McMahon, Oberg ve Welker, 2001). EPS'ler, bakteri şuşlarının çoğalmaları esnasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir (Sutherland, 1998). EPS'lerin sentezinde; uridin difosfat glikoz (UDP-glikoz)-dehidrogenaz, glikozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır (Sutherland, 1977). Glikoliz reaksiyonları ile yakında ilişkili olan EPS sentezinde katabolik ve anabolik yolun ayrılmasında önemli rol oynayan fosfoglukomutaz (PGM) enzimi, glikoz-6-fosfatın (glikoz-6P), glikoz-1P'a dönüşümünü katalizlemektedir. EPS biyosentezinde merkezi ara ürün olan glikoz-1P şeker nükleotitleri; UDP-glikoz, UDP-galaktoz ve dTDP-ramnoz'a dönüşmektedir. Glikoz-1P'dan UDP-glikoz sentezi GalU geni tarafından, UDP-glikoz UDP galaktoz sentezi GalE geni tarafından ve glikoz-1P'dan dTDP-Rha sentezi ise Rfb geni aracılığıyla katalizlenmektedir. GalU geni aracılığıyla katalizlenen UDP-glikoz sentezi EPS üretiminde önemli bir kontrol noktasıdır (Kleerebezem ve diğerleri, 2002; Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003; Hugenholtz ve Kleerebezem, 1999; Welman ve Maddox, 2003). EPS'ler çok sayıda bakterinin yüzeyinde bulunan ekzoselüler

polimerlerdir (Ruas-Madiedo, Gueimonde, de los Reyes-Gavilan ve Salminen, 2006). Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS, kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS, bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. EPS üretimini düzenlenmesi oldukça kompleksir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. EPS üretimi, ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarılardan etkilenmektedir (Yılmaz ve Yuvalı Çelik, 2007).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar (Ruas-Madiedo, Hugenholtz ve Zoon, 2002). Homopolisakkaritler, tek tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içerirler. Glukanlar ve fruktanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Fruktanlar, inülin ve levan benzeri yapılardan, glukanlar ise dekstran ve mutandan oluşmaktadır. Homopolisakkaritler, yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Heteropolisakkaritler ise D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnoz ya da N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren birimlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit bulundurmaktadırlar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen polimerlerin çoğu bu özelliktedir. Polimerlerin omurgasında monomerik birimler arasında 1,4- β - ya da 1,3- β - bağları ve 1,2- α - ya da 1,6- α - bağları bulunmaktadır. Heteropolisakkaritler, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler (Nwodo, Green ve Okoh, 2012; Welman ve Maddox, 2003; Broadbent, McMahon, Oberg ve Welker, 2001). EPS'leri, hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak üç ana grup altında toplanmaktadır. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlar ile bağlı olan kapsüller polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (Lipopolisakkarit, LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlar ile ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (Shoji ve diğerleri, 2013; Leigh ve Walker, 1994). CPS ve LPS, genellikle üretici bakterilerin patojen özelliğini belirleyen yapılardır.

2.5.2. EPS'nin klinik uygulamalardaki yeri

EPS'lerin sayısız türleri keşfedilmiş ve belgelenmiştir. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS'ler, hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden korur, yüksek oksijen gerilimi sağlamaktadır. Ayrıca, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit ve etanol gibi) karşı hücreleri koruma, biyofilm oluşturma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir (Patel ve Prajapati, 2013; Cerning ve diğerleri, 1994).

EPS'ler, endüstriyel ve tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. EPS'lerin antioksidan, kolesterol düşürücü etki, antitümör, antiviral ve immünomodülatör (bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma yoluyla bağışık yanıtı değiştiren madde) aktiviteleri gibi sağlığa önemli fayda sağladıkları kanıtlanmıştır (Kodali ve Sen, 2008; Welman ve Maddox, 2003; Hosono ve diğerleri, 1997; Arena ve diğerleri, 2006). Parkinson's, romatoid artrit, ateroskleroz ve kanser gibi çeşitli ciddi rahatsızlıkların nedenleri arasında etken olarak hidroksil, süperoksit gibi reaktif oksijen türleri bulunmaktadır. EPS'lerin serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Kishk ve Al-Sayed (2007), *Rhizobium meliloti*'den izole edilen EPS'nin, antioksidan ve radikal süpürücü etkilerinin olduğu ve ayçiçeği yağındaki lipid oksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Chabot ve diğerleri (2001), *L. rhamnosus* RW- 9595M'den EPS izole etmişler ve C57Bl/6 (siyah deney fareleri) ve BALB/c (beyaz deney fareleri) soylarından elde edilen splenositler (dalak dokusunda bulunan makrofaj), RAW 264.7 (fare lösemiye monosit makrofaj hücre hattı) ve PBMC (periferik kan mononükleer hücreleri) ile muamele etmişler ve çalışma sonunda EPS'nin TNF, IL-6 ve IL-12 sitokinlerinin sentezini stimüle ettiğini bulmuşlardır. Nagaoka, Hashimoto, Watanabe, Yokokura ve Mori (1994), ratlarda asetik asit indüklü gastrik ülserle karşı bifidobakter, laktobasillerin antiülser etkilerini araştırmışlardır. *Bifidobacterium breve* YIT4014 ve 4043; *Bifidobacterium bifidum* YIT4007 oral yolla verildiğinde sadece bu mikroorganizmaların değil aynı zamanda onlardan elde edilen polisakkaritlerin de antiülser etkisinin olduğunu doğrulamışlardır. Bu antiülser etkiye sahip polisakkaritlerden en önemli olanının ramnoz olduğunu ve gastrik ülserin iyileşmesinde çok etkili olduğunu değerlendirmişlerdir. EPS'nin immün sistemi stimüle ettiği ve antikanser etki gösterdiği bulunmuştur. Nakajima, Toba ve Toyod (1995), *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495'ten elde edilen EPS'yi fare karnının içine doğru uygulamışlar ve EPS'nin, farelerde spesifik antijenlerin üretimini

arttırdığını bulmuşlar ve bu çalışma sonunda EPS'nin bir adjuvan olarak rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. *Leuconostoc mesenteroides* bakterisi türünden elde edilen ve monomeri glikoz olan dekstran, kan plazması sulandırıcı, kan akış hızını hızlandırıcı ajan ve kolesterol düşürücü ajan olarak tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. Oda ve diğerleri, *L. helveticus* ssp. *jugurti* bakterisinden elde edilen EPS'nin antitümör etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. EPS'nin antitümör aktivitesi Sarkoma-180 hücrelerine hazırlanan EPS dozları enjekte edilerek test edilmiştir. Farelere dokuz gün boyunca 20 mg/kg doz verilmiştir. Çalışma sonunda yaşam sürelerinin % 144 olarak arttığı değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, EPS'nin antitümör aktivitesinin konakçı ile doğrudan ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. EPS'nin ve EPS üreten hücrelerin antitümör aktivitesinin anlaşılması için immün sistem ile ilgili olarak bir çalışma yapılmıştır. Forsen ve diğerleri hücre yüzey materyalinin, *L. lactis* ssp insan lenfositlerinde T hücrelerinin mitojenik aktiviteyi oluşturduğunu değerlendirmişlerdir (Patel ve Prajapati, 2013). Kim, Oh, Yun, Oh ve Kim (2010), *L. acidophilus* 606 bakterisi türünden izole edilen EPS'nin insan kolon adenokarsinoma hücre hattı (HT-29) üzerine antitümör aktivitesini araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada HT-29 kanser hücrelerinin proliferasyonunu EPS'ler tarafından inhibe edildiğini bulmuşlardır. Haroun, Refaat, El- Menoufy, Amin ve El-Waseif (2013), *L. plantarum* NRRL B-4496 probiyotik bakterisi türünden izole ve pürifiye edilen EPS'yi (5-50 µg/ml konsantrasyonlar) Caco-2 (insan kolon kanser hücre hattı), HeLa, HCT116 (insan kolon kanser hücre hattı), MCF-7 (insan meme kanser hücre hattı), HEP2 (insan larinks kanser hücre hattı) ve HEPG2 (insan karaciğer kanser hücre hattı) tümör hücreleri ile 48 saat muamele etmişlerdir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, hücrelere uygulanan EPS'nin, konsantrasyona bağlı olarak bu altı tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edildi. Bu suşlar Gazi Üniversitesi Kadın Doğum Polikliniği'ne başvuran sağlıklı kadın vajeninden izole edilmiş olup, fizyolojik ve biyokimyasal tanımlamaları Analitik Profil İndeks 50 CHL, API, Bio Merieux, France test kiti ile Prof. Dr. Belma Aslım'ın danışmanlığı/proje yürütücülüğünde tamamlanmış başka yüksek lisans tez çalışması/proje kapsamında yapıldı (Sonuçlar bu tezde verilmemiştir) (Kılıç, 2003). Bu tanımlamalara göre seçilen 10 adet suşun mikroskopik inceleme ile morfolojileri belirlendi. 16S rRNA/rDNA'ya göre moleküler düzeyde tanımlamaları gerçekleştirildi. Çalışma için seçilen suşlar Çizelge 3.1'de belirtildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sağlıklı insan vajeninden izole edilmiş bakterilerin tür adları ve kodları

Tür İsmi	Suş Kodu
<i>Lactobacillus crispatus</i>	A2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G4
<i>Lactobacillus gasseri</i>	H10
<i>Lactobacillus gasseri</i>	G10
<i>Lactobacillus gasseri</i>	R4
<i>Lactobacillus gasseri</i>	R2
<i>Lactobacillus gasseri</i>	S1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	H5
<i>Lactobacillus gasseri</i>	H14
<i>Lactobacillus gasseri</i>	H15

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve tampon çözeltiler

Laktobasil kültürlerinin geliştirilmesinde, De Man Rogosa and Sharp Broth (MRS, Merck) kullanıldı. Araştırmada kullanılan MRS sıvı besiyerinde yer alan maddeler Çizelge 3.2’de ve çalışmada kullanılan Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponunun içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.3’de gösterildi.

Çizelge 3.2. MRS sıvı besiyeri içeriğindeki maddeler

Madde İçeriği	g/L
Beef Ekstrakt	10,00
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	2,00
Glikoz	20,00
Magnezyum Sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,20
Manganez Sülfat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,05
Pepton	10,00
Sodyum Asetat	5,00
Tri Amonyum Sitrat	2,00
Tween 80	1 mL
Yeast Ekstrakt	5,00

Besiyerinde kullanılacak maddeler tartılıp, distile su ile 1000 mL’ye tamamlandı. Ortam madde pH’sı $6,2 \pm 0,02$ ’ye ayarlandı. Katı besiyeri hazırlamak için hazırlanan sıvı besiyerine % 1,5 oranında Agar (Merck) ilave edilmiş ve besiyeri otoklavda 15 dk. 121°C ’de steril edildi.

Çizelge 3.3. PBS tamponunda yer alan maddeler

Maddeler	g/L
Sodyum klorür (NaCl)	8,00
Potasyum klorür (KCl)	2,00
Di potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	5,20
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	7,10

PBS tamponu için gerekli maddeler tartılıp, distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. pH 7,2 \pm 0,02'ye ayarlandı. 121°C'de 15 dk. otoklavda steril edildi.

3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada insan serviks karsinoma hücre hattı (HeLa), Hamamatsu Üniversitesi Patoloji Bölümü'nden (Japonya) temin edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan Laktobasil cinsine ait farklı suşların geliştirilmesinde, MRS Broth ve MRS Agar besiyerleri kullanıldı. Bakteri kültürleri, MRS Broth içinde 37°C'de 18-20 saat geliştirilmiş olup en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alındı. Çalışmalarda kullanılan canlı hücreler, PBS tamponu içinde Grant DEN-1 ile Mac Farland 10'a, spektrofotometrik olarak ise (T80 + UV/VIS Spectrometer, PG Instruments) 600 nm dalga boyunda \sim 0,600 OD ayarlandı (Villarante ve diğerleri, 2011).

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Bakteri kültürleri, uygun besiyerinde art arda iki kez aktifleştirildi. Kriyo tüpler içerisine konan 1 mL gliserol (Merck), 121°C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Aktifleştirilen bakteri kültürlerinden 1 mL alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edildi. Bu stoklar -20°C ve -80°C'de muhafazaya alındı (Baer ve Ryba, 1992).

3.2.3. Laktik asit bakterilerinin moleküler tanımlamaları

Kültür koleksiyonundan seçilen on adet vajen izolatların 16S rRNA gen bölgelerine göre tanımlamaları yapıldı. Moleküler çalışmaların tamamı ve DNA dizi analizleri, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. İki kez aktifleştirilip % 0,9 NaCl içeren serum fizyolojik ile yıkanmış bakterilerin DNA'ları, Fermentas Genomic DNA Purification Kit (Kat. No. K0512) kullanılarak izole edildi. Universal primerler (Univ-1492R, Univ-27F) kullanılarak 1492 bp uzunluğunda 16S rRNA gen bölgesi

çoğaltıldı. Universal primerlerin optimal bağlanma sıcaklıkları 59°C olup; bu primerlerin sekansları, Univ-27F için 5' AGAGTTTGATCTGGCTCAG 3' ve Univ-1492R için 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' şeklindedir. PCR reaksiyonları; 10x PCR buffer (5 µl, Thermo Scientific), 50 mM MgCl₂ (1,5 µl, Thermo Scientific), 10 mM dNTP (1 µl, Thermo Scientific), 10 pmol forward primer (1 µl), 10 pmol reverse primer (1 µl), 500 U Taq DNA polimeraz (0,3 µl, Thermo Scientific) ve DNA örneği (3,5 µl) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri 100 - 3000 bp DNA marker ile yürütüldü. Elektroforez sonrası bantlar görüntülendi.

3.2.4. Çalışmada kullanılan insan servikal karsinoma hücre hattının (HeLa) hazırlanması

Hücreler, sıvı azotta (-196°C) kriyo tüpler içinde stoklandı. HeLa hücreleri çalışmaya alınmadan önce 37°C'de ılık su banyosunda bekletildi. Daha sonra içinde medium bulunan tüplere aktarıldı. Canlı hücre sayımını belirlemek amacı ile 50 µl tripan mavisi (Sigma) ile 50 µl hücre karışımı thoma lamı üzerine konuldu ve toplam 16 kare, inverted mikroskopta sayıldı. Hücreler, sayımı yapıldıktan sonra T25 ya da T75'lik flasklara aktarıldı. Flasklardaki HeLa hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) içinde % 10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco), % 1 penisilin/streptomisin antibiyotiği (Sigma), % 1 L-Glutamin (Sigma) ve % 1 non essential amino asit (NEAA, Life Technologies) katılarak hazırlanmış besiyortamında, 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde (MCO-18AIC, Sanyo) geliştirildi. Gün aşırı hücre besiyortamı değiştirildi ve hücre gelişimi takip edildi. Flasklarda % 80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler Tripsin/EDTA (Gibco) ile kaldırılarak 96 kuyulu mikropklara aktarıldı. 96 kuyulu mikropklarda (Costar) 1x10⁴ hücre/kuyu yoğunluğuna ulaşan hücreler ile çalışma yapıldı (Choi ve diğerleri, 2006; Nair ve Varalakshmi, 2011).

3.2.5. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu ve liyofilizasyonu

Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu, Adebayo ve Onilude'un (2008) kullandığı metotta bazı değişiklikler uygulanarak yapıldı. MRS broth besiyerinde en az iki kez 37°C'de aktifleştirilen laktobasil kültürleri çalışmaya alındı. Aktifleştirilmiş bakteriler 600 nm'de ~0,600 optik yoğunluğa ayarlanmış ve uygun besiyortamlarına % 2 oranında aşılansarak 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kültürler 32 g trikloroasetikasit (TCA, Merck) ile 2 saat karıştırıldı. Bakteri örneklerinin metabolitleri

4000 rpm'de 10 dk. arka arkaya santrifüjlenerek (NF 400, Nuve) toplandı ve santrifüj sonrası oluşan sıvının en az yarısı (yaklaşık 6–8 saat) kontrollü sıcaklık (70–80°C) ve düşük basınçla dönen evaporatörde (BUCHI) (Resim 3.1) uzaklaştırıldı. Evaporatör işlemi sonrasında elde edilen EPS hacminin iki katı oranında % 96'lık soğuk etil alkol (Merck) eklendi ve bu karışım 12 saat +4°C'de buzdolabında bekletildi. Daha sonra 4000 rpm hızda 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve EPS'ler toplandı. Elde edilen EPS'ler üzerine 1 ml steril distile su ilave edilerek çözünmeleri sağlandı. EPS'ler liyofilizasyon şişelerine alınarak, liyofilizasyon işlemi için hazır hale getirildi ve liyofilize şişeleri, liyofilizatör cihazına yerleştirildi (Resim 3.2). 0,05 Torr düşük basınç altında 10 saat liyofilizasyon uygulandı. 10 saat sonunda işleme son verilmiş, vakum altında liyofilize şişelerin ağızları kapatıldı (Resim 3.3). Örnekler +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.



Resim 3.1. Çalışmada bakteri türlerinin liyofilizesi için kullanılan evaporatör



Resim 3.2. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı



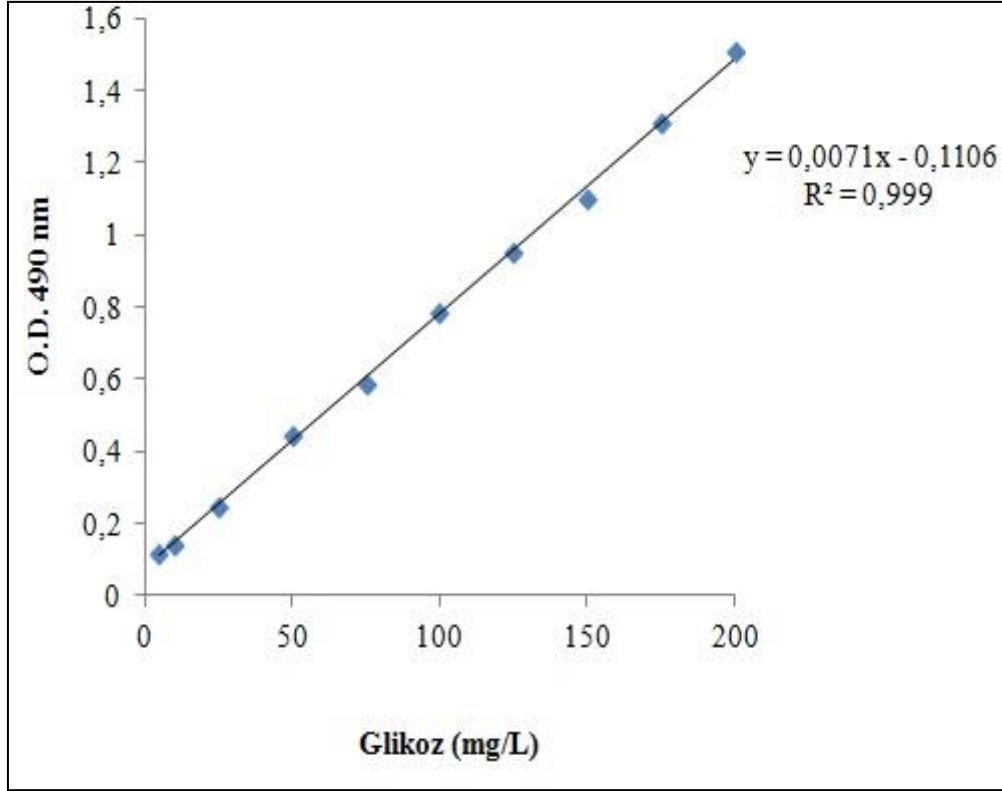
Resim 3.3. Liyofilizasyon işlemi sonrası toz haline getirilen vial içindeki EPS'ler

3.2.6. Laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin EPS üretim düzeyleri, Marshall ve Rawson metodunda yapılan bazı modifikasyonlar ile değerlendirildi (Marshall ve Rawson, 1999). Kültürler, 37°C’de en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alındı. Aktifleştirilmiş bakteri kültürleri 600 nm’de ~0,600 optik yoğunluğa ayarlandı ve besiyortamına % 2 oranında aşılansarak 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında endorf tüplerine örneklerden 1 mL’lik alındı ve 96°C’de 10-15 dk. kaynatıldı. Sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. % 85’lik TCA, 1 mL’lik örnek üzerine ilave edilerek, 13 000 rpm’de 25 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplanan metabolitler etanol içerisinde 13 000 rpm’de 25 dk. santrifüj edilerek presipite edildi. Presipite örnekler, 1 mL distile suda çözüldü. EPS üretim miktarlarının belirlenmesi için çalışmanın devamında örneklere liyofilizasyon öncesi ve sonrasında Dubois, Gilles, Hamilton, Pebers ve Smith (1956) tarafından fenol sülfürik asit metodu uygulandı. Deney 3 tekrarlı ve 3 paralelli olarak yapıldı.

Fenol sülfürik asit metodu

Örnekler fenol tüplerine eklendi, üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL saf sülfürik asit (Merck) ilave edilerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra karıştırıldı. Daha sonra örnekler 30°C’de 15-20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kültürlerin EPS üretim miktarları, glikoz standardına (Şekil 3.1) göre belirlendi. Glikoz standartı 0-200 mg/L arasında değişen farklı konsantrasyonlarda hazırlandı (Dubois ve diğerleri, 1956). Glikoz standartının formülü $y = 0,0071x - 0,1106$ ($R^2 = 0,999$) şeklindedir.



Şekil 3.1. Glikoz standartına göre hazırlanan standart eğrisi

3.2.7. Laktik asit bakterilerinin adezyon yeteneğinin belirlenmesi

Kültür kaplarında % 80 yayılma gösteren hücreler, Tripsin/EDTA çözeltisi ile kaldırılarak sayıldı ve içinde lamel bulunan 6 kuyulu mikropklara 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde aktarıldı. Deneyden bir gün önce antibiyotiksiz DMEM her bir kuyucuğa eklendi. Hücreler 3 ml PBS ile iki defa yıkandı. Antibiyotiksiz ve serum içermeyen DMEM her kuyucuğa 2 ml olmak üzere eklendi ve 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Gelişen hücrelerin üzerine yüksek EPS miktarına sahip bakteri beş farklı suş (H10, G10, H15, R2 ve S1) Mac Farland 10'a ayarlanarak eklendi ve 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar beş defa PBS (2 ml) ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 3 ml metanol (Merck) eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası metanol, kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 2 ml Giemsa boyası (Sigma) kuyucuklara eklenerek oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Giemsa boyası uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 2'şer ml etanol eklendi. Lameller kuyulardan çıkarılarak kurumaya alındı. Bakteri kültürlerinin adezyon yeteneği ışık mikroskopunda 100 farklı alanda yapılan sayım ile belirlendi. Sonuçlar, adezyon yüzdesi ve adezyon indeksi olarak iki şekilde ifade edildi.

Adezyon yüzdesi, (Bakteri tutunmuş hücre sayısı / Toplam hücre sayısı) x 100 ve adezyon indeksi (Hücreye tutunan bakteri sayısı / Toplam bakteri sayısı) olarak hesaplandı (Otero ve Nader-Macias, 2007; Duary, Bhausahab, Batish ve Grover, 2012).

3.2.8. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin antiproliferatif etkisi WST1-1 Cell Proliferation Assay kiti (Cayman, Kat. No. 10008883) ile belirlendi. Bu kit, canlı hücrelerin miktarı hakkında bilgi vermektedir. Bakteri kültürlerin antiproliferatif etkilerinin belirlenmesinde Hong ve diğerleri tarafından (2008) kullanılan metotta yapılan bazı değişiklikler ile çalışma yapıldı. Challouf ve diğerlerinin (2011) kullandığı metotta bazı modifikasyonlar yapılarak bakteri suşlarının ürettiği EPS'lerin antiproliferatif etkisi belirlendi. Kit prensibine göre mitokondriyal dehidrogenaz enzimi canlı hücrelerde bulunan hücresel bir enzimdir ve bu enzim tetrazolium tuzu olan WST-1'in formazana dönüşümünü gerçekleştirmektedir. HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etki, probiyotik bakterilerin kendisi kullanılarak araştırıldı. Mikroorganizmaları ortamdaki ayırmak amacı ile bakteri kültürleri 30 dk. 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında canlı hücreler steril PBS ile 10 dk. 3000 rpm'de 2 kere yıkandı. Bakteri kültürlerinin kendisinin doğrudan etkisinin olup olmadığını belirlemek için, kültürler Mac Farland 10'a (~8,4-8,6 log cfu/mL) ayarlandı. Elde edilen canlı hücreler hücre kültürü ortamına eklendi ve 24 saat 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. EPS'lerin antiproliferatif etkilerini belirlemek amacıyla çalışmada, yüksek EPS üretimine sahip bakteri kültürlerinin suşları (H10, G10, H15, S1 ve R2) kullanıldı. Liyofilize EPS'ler, steril saf su ile 200, 400 ve 800 µg/mL farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 0,45 µm por çaplı filtreden geçirildikten sonra DMEM ile karıştırılıp ortama eklendi. EPS'ler, HeLa hücre hattında 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası çalışmada hücre süspansiyon karışımı üzerine WST-1 hücre proliferasyon ajanı eklendi ve örnekler 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı. Canlı hücre miktarını belirlemek üzere 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Epoch, Biotek) ölçüm yapıldı (Resim 3.4). Canlı bakteri kültürleri ve EPS ile muamele edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı ve besiyortamından kaynaklanan sitotoksik etki göz önünde bulundurularak, kontrol grubuna bağlı yüzde (%) ölüm oranı hesaplandı. Deney 3 tekrarlı 5 paralelli olarak yapıldı. Sonuçların hesaplanmasında; % Ölüm = (1-Örnek/Kontrol) × 100 formülü kullanıldı.



Resim 3.4. Çalışmada kullanılan mikropalak okuyucu

3.2.9. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etkinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etkinin belirlenmesi

Cell Death Detection ELISA^{Plus} (Roche, Kat. No. 11774425001) kiti kullanılarak bakteri kültürlerinin HeLa kanser hücrelerine apoptotik etkisi belirlendi. Bu kit, apoptozun indüklenmesi sonrasında hücre sitoplazması dışındaki histon ile kompleks oluşturmuş mononükleozom ve oligonükleozomlar gibi DNA fragmentlerinin miktarsal tayini için kullanıldı. 1×10^6 hücre/kuyu yoğunluğunda olacak şekilde HeLa hücrelerinin 96 kuyulu mikropalalarda kültürü yapıldı. Mikropalalarda tam yayılma gözlemlendikten sonra Mac Farland 10'a ayarlanmış laktobasil kültürleri hücre ortamına 200 μ l olarak eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücre lizatı oluşturuldu. Optik yoğunluk 405 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda ölçüldü (Zysk, Bejo, Schneider-Wald, Nau ve Heinz, 2000).

EPS'lerin HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etkinin belirlenmesi

EPS'lerin, apoptotik etkisinin belirlenmesi için, 3.2.9'da kullandığımız metot bazı modifikasyonlar ile uygulandı. S1, R2, H15, G10 ve H10 suşlarının EPS'lerinin HeLa

hücrelerine apoptotik etkisi araştırıldı. EPS'ler, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda ayarlandı ve 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. 24 saat inkübasyondan sonra apoptotik etki, Cell Death Detection ELİSA^{Plus} kit yöntemi ile 405 nm'de mikropalak okuyucuda belirlendi. Deneysel çalışmalar 3 paralelli ve 5 tekrarlı olarak yapıldı.

3.2.10. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa hücresi üzerine apoptotik indekslerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin, HeLa hücresine apoptotik indeksi Hoechst 33342 boyası ile belirlendi. Çalışmada Mac Farland 10'a ayarlanmış bakteri kültürleri (H15, H14, R2 ve G10) ve S1, R2, H10, G10 ve H15 suşlarının ürettiği EPS'ler (400 µg/mL) kullanıldı. Kültür kontrol grubu olarak kanser hücresine sadece PBS ve EPS kontrol grubu olarak kanser hücresine distile su muamele edildi. Bakteri kültürleri ve EPS'ler, HeLa hücresi ile muamele edilerek hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler toplandı ve 15 dk. boyama solüsyonu (2 µg/mL Hoechst 33342 boyası, 1 µg/mL propidyum iyodid, 100 µg/mL DNAaz free RNAaz) ile % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı (Türk, Kaya, Menemen ve Oğuztüzün, 2011). Apoptotik ve nekrotik hücreler, 546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli floresan mikroskobu (Leica DFC425C, Germany) ile 40X objektifte görüntülendi. Apoptotik indeks, floresan mikroskobunda sayılan 150 hücre ile yüzde (%) olarak belirlendi (apoptotik hücrelerin sayısı / total hücrelerin sayısı x %100) (Jackisch ve diğerleri, 2000).

3.2.11. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 3 aktivitelerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi Kaspaz 3 Colorimetric Assay kit (ApoTarget™ Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler kit; Novex®, Invitrogen Life Technologies, USA, Kat. No. KHZ0022) ile gerçekleştirildi. Kaspaz 3 yönteminin prensibi, işaretlenmiş peptid substratın Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilid (DEVD-pNA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor p-nitroanilitin (pNA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. Bakteri kültürlerinin HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Mac Farland 10'a ayarlanmış

canlı bakteri kültürleri (H15, H14, R2 ve G10) HeLa hücrelerine muamele edildi. Kültür kontrol grubu olarak kanser hücresine sadece PBS muamele edildi ve hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. EPS'lerin HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çalışmada S1, R2, H10, G10 ve H15 bakteri kültürlerinin ürettiği EPS'ler (400 µg/mL) kullanıldı. EPS kontrol grubu olarak kanser hücresine distile su muamele edildi ve EPS'ler HeLa hücresi ile muamele edilerek hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerdeki pNA miktarı 405 nm'de mikropilaya okuyucuda ölçülerek tayin edildi.

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin HeLa hücrelerine kaspaz 9 aktivitesinin belirlenmesi Kaspaz 9 Colorimetric Assay kit (ApoTarget™ Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler kit; Invitrogen Life Technologies, USA, Kat. No. KHZ0102) ile gerçekleşti. Kaspaz 9 yönteminin prensibi, işaretlenmiş substratın (LEHD-pNA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. Kaspaz 9 yönteminde kaspaz 3 yöntem protokolündeki basamaklar kullanıldı. İki deneyde farklı olan substratlar olup kaspaz 9'da LEHD-pNA substratı kullanıldı. Buna göre hücrelerdeki pNA miktarı 405 nm'de değeri ölçülerek tayin edildi (Ucbek, Özunal, Uzun ve Gepdiremen, 2014).

3.2.12. Bakteri kültürlerinin HeLa hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi

HeLa hücre kültürlerinin bakteri kültürleriyle ve EPS ile uyarılması

Yüksek antikanserojenik aktivite gösteren Mac Farland 10'a (~8-9 log cfu/ml) ayarlanmış canlı bakteri kültürleri (H15, H14, R2 ve G10) ve bakteri kültürlerinden elde edilen R2, G10, S1, H10 ve H15 EPS örnekleri (400 µg/ml) kültürü yapılan 1×10^7 yoğunluktaki HeLa kanser hücre hattı üzerine uygulandı ve 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. RNeasy Mini Kiti (Qiagen, Kat. No. 74104) kullanılarak örneklerden total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden her biri spektrofotometrede (NanoDrop D-1000, NanoDrop Technologies, ABD) 260 nm dalga boyunda ölçülerek µl'deki µg değerleri belirlendi.

Hücre kültürlerinden RNA izolasyonu

- 1) Hücre, 600 µl β merkaptoetanol (Merck) içeren Lizis tamponu içinde pipetle çekilip bırakmak suretiyle parçalandı.
- 2) Örnekler üzerine 360 µl absolut (% 100) etanol eklendi.
- 3) Hücre lizatı, kolon içeren toplama tüpüne aktarıldı ve 12 000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.
- 4) Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve bu işlem lizat bitene kadar tekrarlandı. Bu işlem sonunda kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
- 5) Kolona 700 µl yıkama tamponu 1 eklendi ve kolon 13 000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki sıvı döküldü ve kolon, toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
- 6) Kolona 600 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve kolon 13 000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki sıvı döküldü ve kolon, toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
- 7) Kolona 250 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve kolon 13 000 g'de 2 dk. santrifüj edildi. Kolon toplama tüpü atıldı. Kolon, steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi.
- 8) Kolona 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve kolon 13 000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen RNA'lar cDNA sentezine -80°C derin dondurucuda saklandı (Boom ve diğerleri, 1990).

cDNA izolasyonu

Total RNA'dan cDNA sentezi, QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Kat. No. 205311) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

- 1) Her bir örnekten 250 ng RNA alınarak cDNA sentezine başlandı.
- 2) PCR tüpüne önce 7 µl nükleaz içermeyen su, sonra sırasıyla 1 µl Primer (oligodT), 4µl template RNA eklendi ve 1 dk. santrifüj edildi.
- 3) Tüpler 65°C'de 5 dk. bekletildi ve inkübasyon sonrası örnekler hızla buz üzerine alındı.
- 4) 5X Reaction Buffer'dan 4 µl; Ribolock RNase inhibitör (20 u/µl) 1 µl; dNTP mix (10 mM) 2 µl; Reveraid M-Mulv Reverse Transcriptase (200 u/µl) 1 µl alınarak tüplere eklendi ve santrifüj edildi.
- 5) 42°C'de 60 dk. ve 70°C'de 5 dk. inkübe edildi.

6) Elde edilen cDNA'lar, spektrofotometrik olarak okundu ve miktar tayini yapıldı. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Gerçek Zamanlı PZR

Gen ifadelerinin tayini, SYBR boyası kullanılarak gerçek zamanlı PZR yöntemiyle belirlendi. cDNA örnekleri, 1/30 oranında sulandırılarak kullanıldı. 2x QuantiFast SYBR Green PZR Master Mix (Qiagen, Kat. No. 204054) kiti gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanıldı. Genlere özgü dizayn edilen (PPIA ve Kaspaz 3) ve hazır olarak Qiagen firmasından alınan gene (Kaspaz 9, Qiagen, Kat. No. PAHS-012Z) ait dizi ve bilgiler Çizelge 3.4'de verildi. İlgili genlere ait primerler aynı reaksiyon koşullarında çalışılmıştır. Bu reaksiyon koşulları, 95°C/5dk., 95°C/10s. ve 60°C/30s koşullarda 40 döngü olarak gerçekleştirildi. Amplifikasyonlar, 10 µL hacimde Gerçek Zamanlı PZR Sistemi (Applied Biosystems, 7500 Fast & 7500 Real-Time PCR Systems, USA) ile reaksiyona alındı. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen ifade miktarlarını normalize etmek için housekeeping gen olan peptidilprolil izomeraz A=siklofilin A (PPIA), mRNA ifade düzeyi referans olarak alındı. EPS örneklerinin kontrol grubu için HeLa hücre hattı, saf su ile; kültür suşlarından elde edilen bakteri canlı hücrelerinin kontrol grubu için HeLa hücre hattı, PBS ile muamele edildi (Yaoxian ve diğerleri, 2013). Gerçek zamanlı PZR'de eşik döngüsü olarak ifade edilen CT değeri, deneysel olarak florasan sinyalinin üçüncü ve onbeşinci döngüsü ile on standart sapma arasında ölçülen florasan sinyallerinin ortalamasına ulaştığı döngü olarak tanımlanmaktadır. Sonuçların hesaplanmasında deney sonucunda elde edilen örneklerin CT değerlerinin ortalamaları alındı. ΔCT olarak ifade değer için ise örneklerin CT değeri ile referans olarak alınan PPIA housekeeping genin CT değeri arasındaki fark alındı. Karşılaştırmalı CT değeri ($\Delta\Delta CT$), $\Delta CT_{\text{örnek}} - \Delta CT_{\text{referansgen}}$ olarak hesaplandı. Her bir gen için deney üç kez tekrarlandı.

Çizelge 3.4. Gerçek Zamanlı PZR'de kullanılan PPIA ve kaspaz 3 geninin primer dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
PPIA	5'CTGAGAAACGGCTACCACATC3'	5'GCCTCGAAAGAGTCCTGTATTG3'
Kaspaz 3	5'CTCTGGAATATCCCTGGACAAC3'	5'ACATCTGTACCAGACCGAGA3'

3.2.13. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerde SPSS Inc Software (16.0 versiyon; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Kendall tau ve Spearman'ın korelasyonuna göre, suşların EPS üretimi ile adezyon yüzdesi ve adezyon indeks oranları arasında ilişki olup olmadığı incelenmiştir. Antiproliferatif ve apoptotik çalışmalarda suşlar arası farka tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Kruskal Wallis testi ile bakılmıştır. Kruskal Wallis testine göre antiproliferatif çalışmasında 10 farklı suştan elde edilen ölçümler değerlendirilmiştir. Aynı şekilde EPS çalışmalarında da örnekler arası fark Kruskal Wallis testi ile ortaya konulmuştur. Tüm çalışmalar her çalışma için paralel sayısı değişmekle beraber, üç tekrarlı yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması \pm standart sapma şeklinde verilmiştir

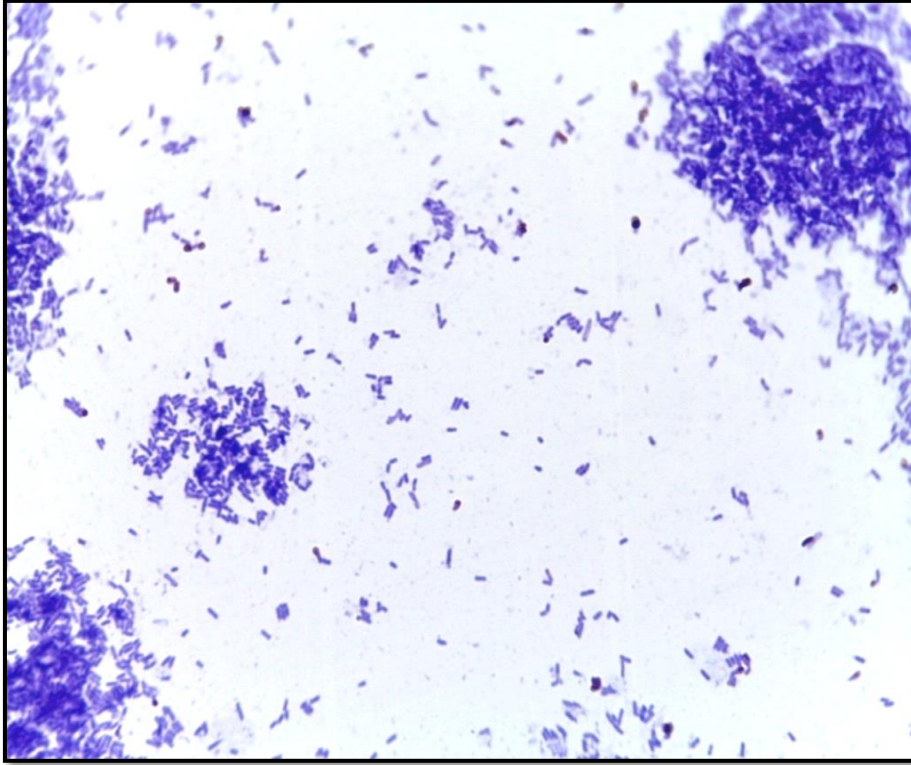
4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

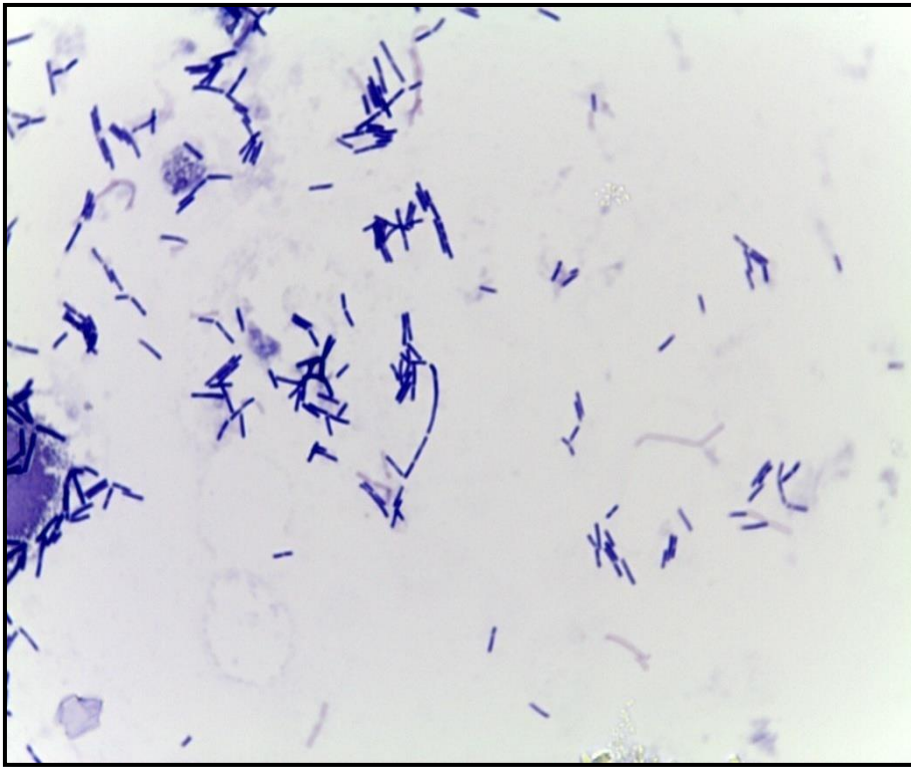
Sağlıklı insan vajeninden izole edilen, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, *L. crispatus* (A2), *L. plantarum* (G4) ve *L. gasseri* (H10, G10, R4, R2, S1, H5, H14 ve H15) türleri çalışmaya alındı. Bu çalışma için, daha önce yapılan projeler ve tez çalışmaları kapsamında probiyotik özellikleri ile öne çıkmış olan vajinal kaynaklı suşlar seçildi (sonuçlar verilmemiştir). Bu çalışmalar Prof. Dr. Belma Aslım danışmanlığında tamamlanan Emine Kılıç'ın (2003) tez çalışmasında yapıldı. Aynı şekilde suşların kültürel, mikroskopik ve biyokimyasal tanımlamaları da farklı projeler kapsamında yapıldığı için sonuçlar tezde verilmedi. Çalışmada yer alan kullanılan üç farklı türün morfolojileri Gram boyama ile kontrol edilerek, mikroskopik görüntüleri Resim 4.1, Resim 4.2 ve Resim 4.3 'te gösterildi.



Resim 4.1. *L. gasseri* (R2) türünün ışık mikroskopundaki morfolojisi (100x)



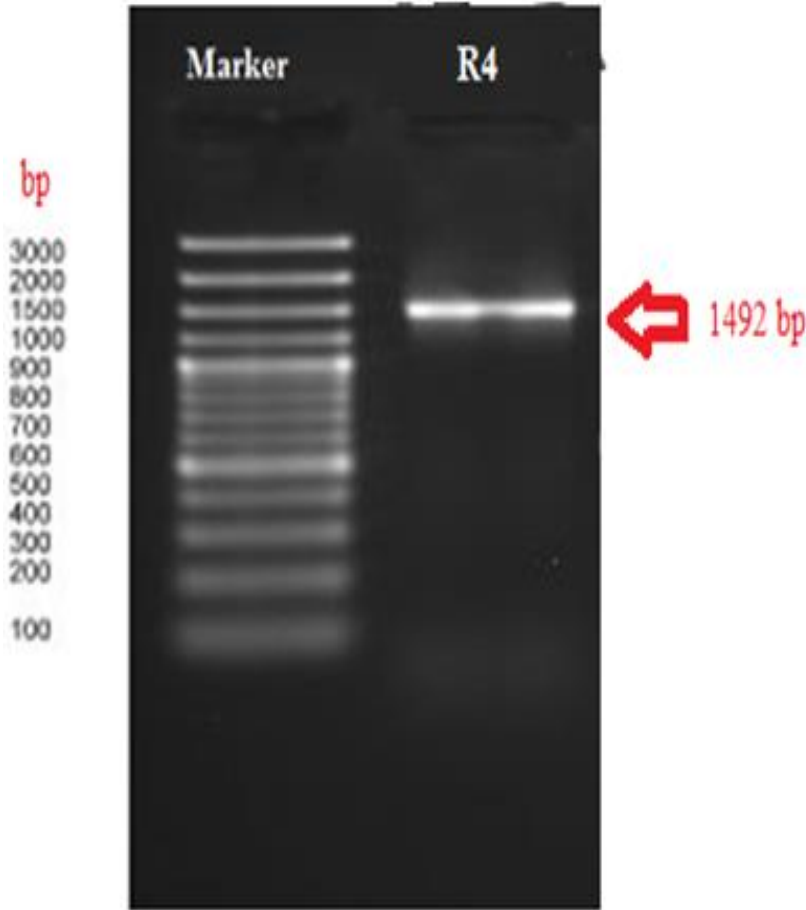
Resim 4.2. *L. plantarum* (G4) türünün ışık mikroskopundaki morfolojisi (100x)



Resim 4.3. *L. crispatus* (A2) türünün ışık mikroskopundaki morfolojisi (100x)

4.2. Laktik Asit Bakterilerin Moleküler Tanımlama Sonuçları

Kültür koleksiyonundan on adet seçilen ve daha önce tamamlanmış çalışmalar kapsamında biyokimyasal testleri, morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre tanımlanmış olan izolatların 16S rRNA gen bölgelerine göre de tanımlamaları yapılarak, moleküler düzeyde tür isimleri doğrulanarak, kesinleştirildi. Universal primerler (Univ-1492R, Univ-27F) kullanılarak 1492 bp uzunluğunda 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. PCR ürünleri 100 - 3000 bp DNA marker ile yürütüldü. Elektroforez sonrası bantlar görüntüledi (Resim 4.4). Dizi analizi, Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) cihazı ile yapıldı. Analiz sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI DNA Gen Bankası'nda taranarak moleküler tanımlama yapıldı (Çizelge 4.1).



Resim 4.4. Laktobasil izolatlarının (*L. gasseri* (R4)) universal primer ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin PCR ürünü

Çizelge 4.1. 16S rRNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL/Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
A2	FR683088.1	<i>Lactobacillus crispatus</i> DSM 20584T	% 99
G4	JQ801724.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LA113	% 99
H10	JQ805680.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB062	% 99
G10	JQ805679.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB061	% 99
R4	GU454858.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> 177-3	% 100
R2	JQ805674.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB056	% 99
S1	JQ805669.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB051	% 99
H5	GU454856.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> E16B7	% 99
H14	JQ805634.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB014	% 99
H15	JQ805680.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> IMAUFB062	% 99

Blast sonuçlarına göre A2 kodlu izolat % 99 oranında homoloji göstermiş ve *L. crispatus* olarak ve G4 kodlu izolatu % 100 oranında homoloji göstermiş ve *L. plantarum* olarak tanımlanmış diğer izolatların hepsi *L. gasseri* olarak teşhis edilmiştir.

4.3. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerin Kültür Ortamında EPS Üretim Kapasiteleri

On laktobasilin EPS üretimleri madde 3.2.6'da verilen metoda göre tespit edildi. Bu metoda göre yapılan çalışmada tüm suşlarda EPS üretimi gözlemlendi. Çalışmada, EPS üretim miktarlarının suşlar arasında farklılık gösterdiği gözlemlendi (Çizelge 4.2). En yüksek EPS üretimi *L. gasseri* H15 suşunda $217,1 \pm 2,0$ mg/L olarak bulundu. Bu miktarı takiben ikinci sırada yüksek EPS üretimi *L. gasseri* G10 suşunda $178,1 \pm 3,0$ mg/L olarak hesaplandı. *L. gasseri* H10 suşunda $159,4 \pm 1,0$ mg/L; *L. gasseri* R2 suşunda $130,2 \pm 1,0$ mg/L; *L. gasseri* S1 suşunda $115,1 \pm 1,0$ mg/L EPS üretim miktarları bulundu. Buna karşılık en düşük EPS üretimi ($37,3 \pm 0,0$ mg/L) ise *L. gasseri* R4 suşunda görüldü. Yüksek veya orta üretim kapasitesine sahip olan beş adet suşun (H10, G10, H15, R2, S1) saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası EPS miktarları ölçüldü (Çizelge 4.3). Buna göre liyofilizasyon

öncesi suşlardaki EPS üretimi, liyofilizasyon sonrası EPS üretimi ile paralellik gösterdi ($p < 0,05$). Saflaştırma öncesi ve sonrası laktobasil suşlarının EPS üretim kapasiteleri değerlendirildiğinde sonuçlarda görülen paralellik anlamlı olmaktadır. EPS üretimi yüksek laktobasil suşun, liyofilizasyon sonrasında da yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olduğu değerlendirildi. Yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan beş adet suştan saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası en yüksek EPS miktarı ($255,2 \pm 4,3$), *L. gasseri* H15 ve en düşük EPS miktarı ($168,2 \pm 3,4$) suşunda görüldü.

Çizelge 4.2. Kültür koleksiyonundan seçilen bakteri türlerinin kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri

No	Tür İsmi	Suş Kodu	EPS miktarı (mg/L)
1	<i>L. crispatus</i>	A2	$51,1 \pm 2,0$
2	<i>L. plantarum</i>	G4	$62,2 \pm 4,0$
3	<i>L. gasseri</i>	H10	$159,4 \pm 1,0$
4	<i>L. gasseri</i>	G10	$178,1 \pm 3,0$
5	<i>L. gasseri</i>	R4	$37,3 \pm 0,0$
6	<i>L. gasseri</i>	R2	$130,2 \pm 1,0$
7	<i>L. gasseri</i>	S1	$115,1 \pm 1,0$
8	<i>L. gasseri</i>	H5	$38,2 \pm 0,0$
9	<i>L. gasseri</i>	H14	$67,3 \pm 4,1$
10	<i>L. gasseri</i>	H15	$217,1 \pm 2,0$

Çizelge 4.3. EPS üretimi yüksek suşlardan elde edilen liyofilize EPS miktarları

Tür Adı	Suş Kodu	EPS ¹ (mg/L)
<i>L. gasseri</i>	H10	$228,3 \pm 2,4$
<i>L. gasseri</i>	G10	$241,8 \pm 3,2$
<i>L. gasseri</i>	H15	$255,2 \pm 4,3$
<i>L. gasseri</i>	R2	$168,2 \pm 3,4$
<i>L. gasseri</i>	S1	$194,1 \pm 4,2$

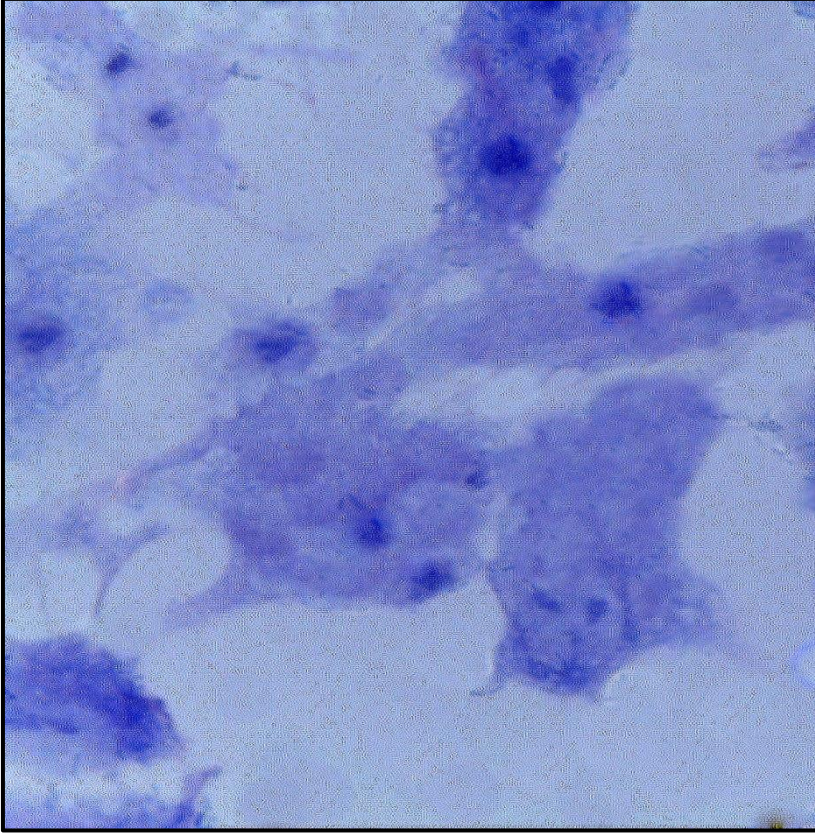
¹ Saflaştırılmış ve dondurulup kurutulmuş toz halindeki EPS'nin miktarı

4.4. Bakterilerin Adezyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

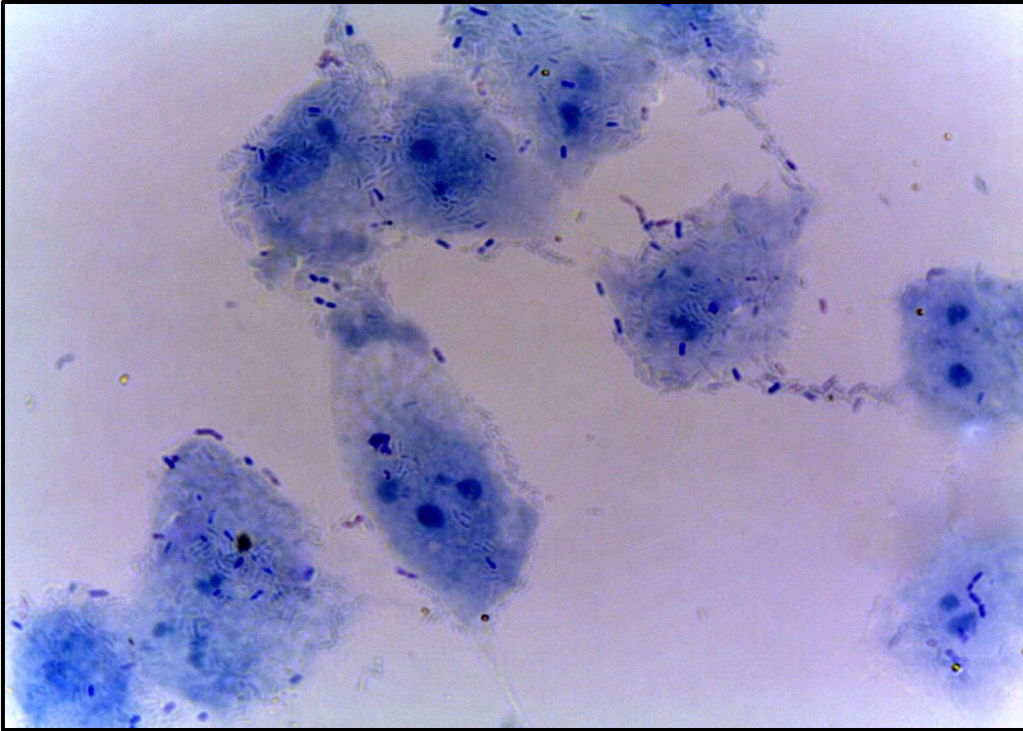
Çalışmada, yüksek EPS sentezleme yeteneğine sahip *L. gasseri* türüne ait suşlarının (G10, H10, H15, R2 ve S1) epitel yüzeye tutunma yetenekleri madde 3.2.7’de belirtildiği gibi çalışıldı. Suşların tutunma kapasiteleri ışık mikroskobunda yapılan sayım ile belirlendi. Tutunma kapasiteleri adezyon yüzdesi ve adezyon indeksi olarak hesaplanarak değerlendirildi. Adezyon yüzdesi, bakteri tutunmuş hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı ile elde edilen sonucun yüzde olarak ve adezyon indeksi ise hücreye tutunan bakteri sayısının toplam bakteri sayısına oranı olarak ifadesidir. Bakteri suşları ile muamele edilmemiş HeLa kanser hücreleri Resim 4.5’te görülmektedir. Çalışmada bakterilerin canlı hücreleri HeLa hücrelerine tutunma yeteneğinin olduğu bulundu. Beş laktobasil suşlarının kanser hücrelerine adezyon indeksi ile adezyon yüzdesi arasında kısmi ilişki gözlemlendi (Çizelge 4.4). Yüksek adezyon yüzdesine sahip iki suşun (G10 ve S1) aynı zamanda yüksek adezyon indeksine sahip olduğu değerlendirildi. En yüksek adezyon yüzdesi (% $90 \pm 3,4$) ve indeksi ($59 \pm 3,1$) G10 suşunda görüldü. Resim 4.7’de en yüksek adezyon yüzdesi ve indeksine sahip G10 suşunun ışık mikroskobunda hücreye tutunma görüntüsü gösterilmektedir. Aynı suşun EPS üretim kapasitesi de yüksek bulundu. Buna göre G10 suşunun HeLa hücresine en yüksek tutunma kapasitesine sahip olduğu belirlendi. En düşük adezyon yüzdesi (% $28 \pm 3,1$) ve indeksi ($50 \pm 5,0$), diğer suşlara göre kültür ortamında orta düzeyde EPS üretimine sahip R2 suşunda görüldü. Resim 4.6’da en düşük adezyon yüzdesi ve indeksine sahip R2 suşun HeLa hücresine tutunma görüntüsü gösterilmektedir. Diğer sonuçlarda benzer sonuçlar vermesi, adezyon ile EPS üretim kapasitelerinin önemli derecede etkili olabileceğini görüldü. Suşların EPS üretim kapasiteleri ile HeLa hücrelerine adezyon indeksi arasında orta düzeyde bir anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4. Yüksek EPS üretimine sahip bakteri suşlarının HeLa kanser hücreleri üzerine tutunma kapasiteleri

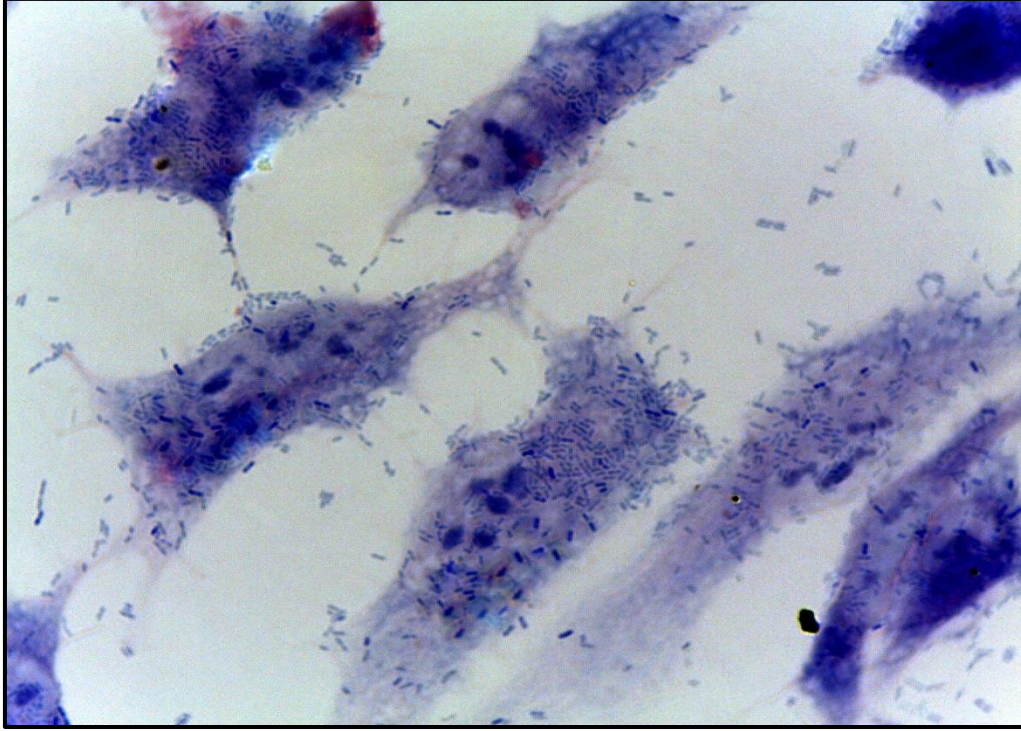
	Adezyon yüzdesi (%)	Adezyon İndeksi
<i>L. gasseri</i> (H15)	$79 \pm 2,2$	$54 \pm 4,2$
<i>L. gasseri</i> (H10)	$66 \pm 3,1$	$50 \pm 5,0$
<i>L. gasseri</i> (R2)	$50 \pm 4,2$	$28 \pm 3,4$
<i>L. gasseri</i> (G10)	$90 \pm 3,4$	$59 \pm 3,1$
<i>L. gasseri</i> (S1)	$81 \pm 4,0$	$45 \pm 2,2$



Resim 4.5. HeLa hücresinin ışık mikroskop görüntüsü (100x)



Resim 4.6. En düşük adezyon indeksi ve yüzdesine sahip R2 suşunun hücreye tutunma görüntüsü (100x)

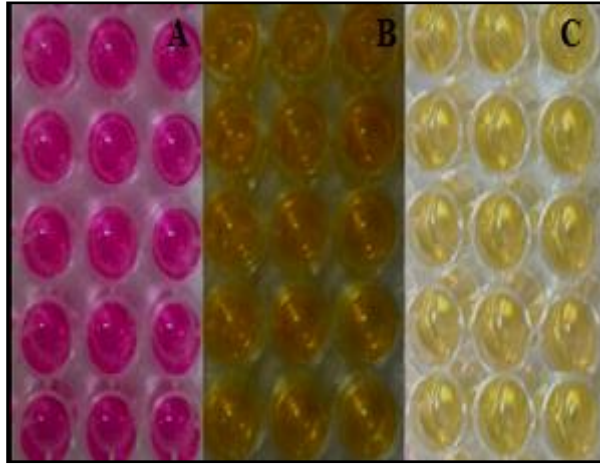


Resim 4.7. En yüksek adezyon indeksi ve yüzdesine sahip G10 suşunun hücreye tutunma görüntüsü (100x)

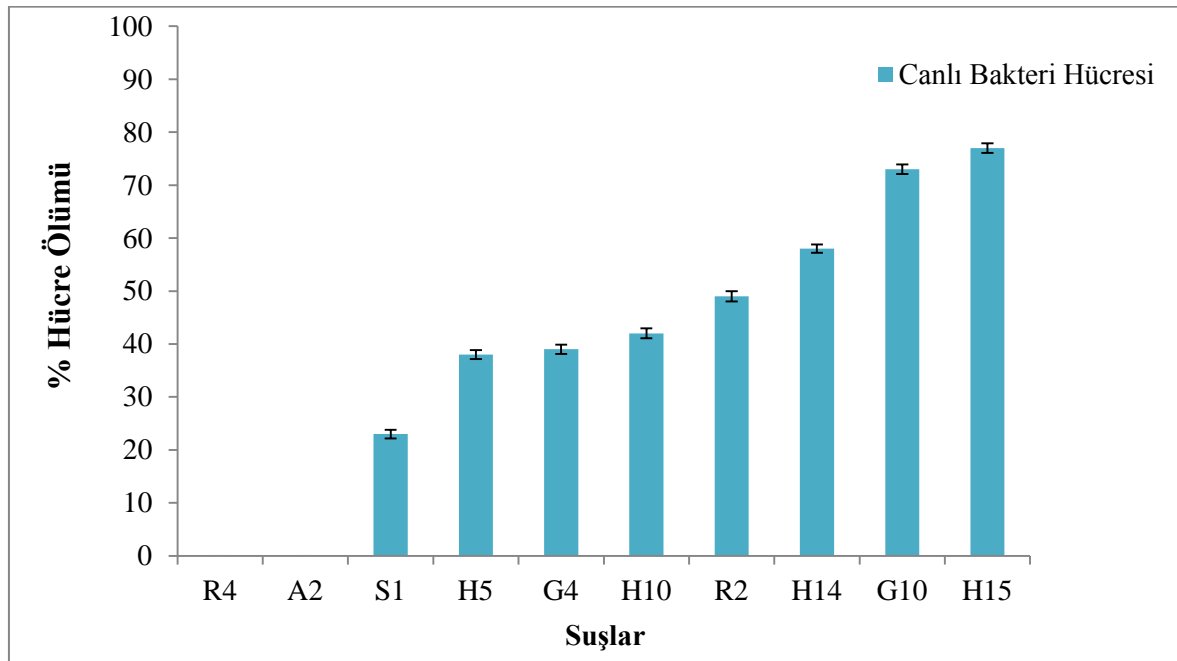
4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antiproliferatif Etkisi

Çalışmada, HeLa hücresi, Mac farland 10'a ayarlanmış canlı bakteri hücreleri ile muamele edildikten sonra antiproliferatif aktivitesi WST-1 kiti ile belirlendi. Çalışmada kullanılan kontrol grubu, bakteri ile muamele edilmemiş kanser hücrelerinden oluşturuldu. Kontrol grubuna hücre canlılığını belirleyen, bir tetrazolium tuzu olan WST-1 ajanı eklenmediğinde renk değişiminin olmadığı gözlemlendi. Aynı kontrol grubuna WST-1 ajanı eklendiğinde, canlı kanser hücreleri WST-1'i renkli formazana dönüştürdü. Mikroplaklarda canlı hücrelerin yoğunluğuna göre oluşan rengin tonu değiştiği görüldü. Canlı kanser hücrelerinin yoğunluğu, bakteri canlı hücreleri eklenmesi ile azaldı. Buna bağlı olarak WST-1'in formazana dönüşümü azalmakta ve rengin tonu açıldı (Resim 4.8). Antiproliferatif etki HeLa hücrelerinin ölümü esas alınarak tespit edildi. Denenen 10 farklı canlı bakteri hücrelerinin ikisi hariç hepsinin kanser hücrelerini öldürerek antiproliferatif etki gösterdiği belirlendi. Sonuçlar farklı bakteri suşlarına göre farklılık gösterdi (Şekil 4.1). Buna göre *L. gasseri* H15 suşunun canlı hücreden oluşan pelletinin % 77 hücre ölümü gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçları takiben *L. gasseri* G10 % 73, *L. gasseri* H14 % 58, *L. gasseri* R2 % 49, *L. gasseri* H10 % 42, *L. gasseri* G4 % 39, *L. gasseri* H5 % 38 ve *L.*

gasseri S1 % 23 oranında antiproliferatif aktivite gösterdi ($p<0.05$). *L. plantarum* A2 ve *L. crispatus* R4 suşlarının HeLa hücresinde antiproliferatif etkisi belirlenemedi. Genellikle yüksek antiproliferatif etkiyi *L. gasseri* türüne ait suşlar gösterdi. Bu ön çalışma sonucunda kanser hücresinde yüksek antiproliferatif etki gösteren suşlar (H15, G10, H14, R2 ve H10) seçilerek, devam eden çalışmalarda kullanıldı.



Resim 4.8. Mikropiplaklarda bulunan kanser hücrelerinin WST-1 kiti ile canlılığın tespiti A) Kontrol grubu (Kit muamelesinden önce kanser hücresi) B) Kit ile muamele edilmiş kontrol grubunda canlılığı gösteren renk değişimi C) Kit ile muamele edilmiş deney grubunda (bakteri canlı hücresi) canlılığı gösteren renk değişimi

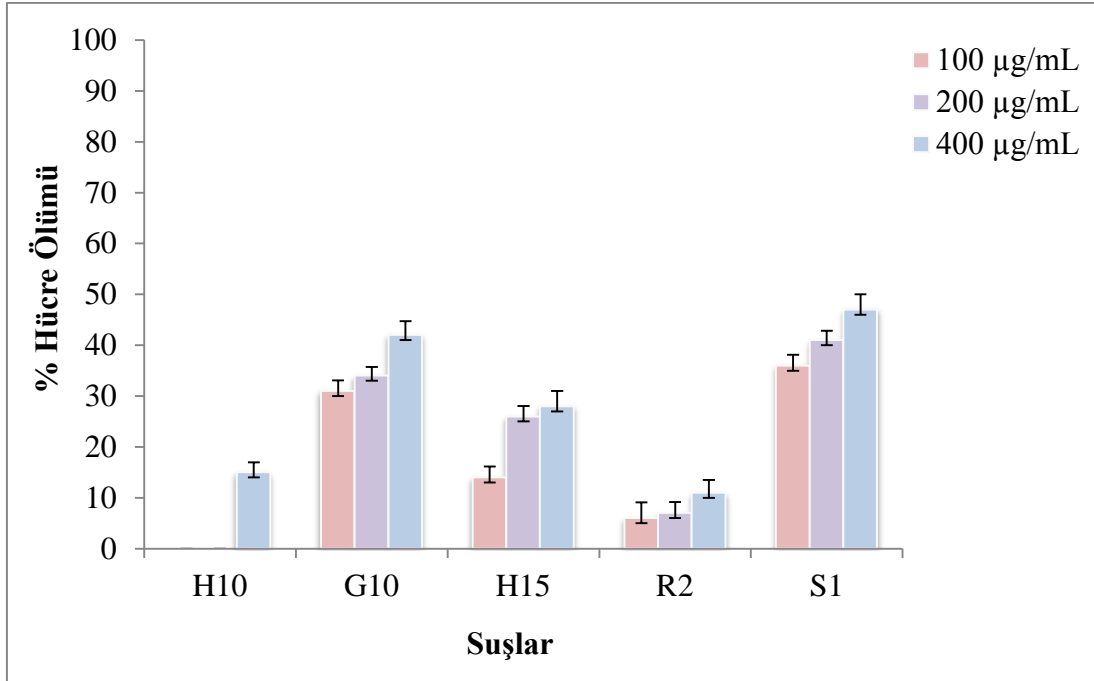


Şekil 4.1. Canlı bakteri hücrelerinin HeLa hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisi

4.6. EPS'lerin Antiproliferatif Etkisi

Çalışma, yüksek EPS üreticisi suşların saflaştırılarak liyofilize haline getirilmiş EPS ile gerçekleştirildi. Kültür suşlarının ürettiği EPS'lerin antiproliferatif aktivitesi, WST-1 kiti ile hücre yüzde ölümü esas alınarak belirlendi. Suşlardan elde edilen EPS'lerinin uygulanmalarına bağlı olarak, HeLa hücrelerinin canlılığında azalma gözlemlendi. Kanser hücre canlılığında görülen azalma ile birlikte, WST-1'in formazana dönüşümü de azaldı ve mikropilaya kuyucuklarında renk tonunun açıldığı görüldü. Yapılan uygulamada, bakterilerin canlı hücrelerinin kullanıldığı uygulamadan daha koyu bir renk tonu elde edildi. Bu sonuç, EPS'nin canlı bakteri hücresine göre daha az antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Liyofilize EPS'ler, steril su ile 100, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı ve HeLa hücre hattına muamele edildi. 24 saat inkübasyon sonrası tüm EPS örneklerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak antiproliferatif etkinin de arttığı görüldü. Tüm örneklerde en yüksek antiproliferatif etki 400 µg/mL EPS konsantrasyonunda belirlendi (Şekil 4.2). Suşlardan elde edilen EPS'lere göre kanser hücresi üzerine antiproliferatif ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Bundan sonraki çalışmalar tüm EPS'lerde en iyi sonuç alınan 400 µg/mL konsantrasyonla devam edildi. En yüksek etkiyi S1 suşunun 400 µg/mL konsantrasyonunda % 47 ($\pm 3,0$) hücre ölümü ile tespit edildi. Bu sonuçları takiben HeLa hücresi üzerine G10 suşu % 42 ($\pm 2,75$) oranında hücre ölümü; H15 suşu % 28 ($\pm 3,00$) oranında hücre ölümü; H10 suşu % 15 ($\pm 2,0$) oranında hücre ölümü; R2 suşu % 11 ($\pm 2,5$) oranında hücre ölümü gösterdiği belirlendi. Farklı suşlardan elde edilen EPS'nin farklı antiproliferatif etki göstermeleri dikkat çekmiştir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, canlı bakteri kültürleri ve kültürlerden elde edilen EPS'ler, HeLa kanser hücresine antiproliferatif etki göstermiş olup, EPS ve bakteri kültürleri arası karşılaştırma yapıldığında ise, en yüksek antiproliferatif etkiyi bakteri canlı hücrelerinin gösterdiği görüldü. Genel olarak, canlı probiyotik bakterisinin kanser hücresine uygulaması EPS'ye göre daha yüksek antiproliferatif etki göstermesi bakımından önemli bulundu. Uygulama konsantrasyonu ve süresi arttırılarak EPS'nin daha etkin olabilmesi mümkündür. Ayrıca, EPS'nin stabil ve uygulama sonucu daha kalıcı etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Yine EPS'nin canlı hücreye göre uygulama kolaylığının olması da başka bir avantaj olarak değerlendirilebilir.

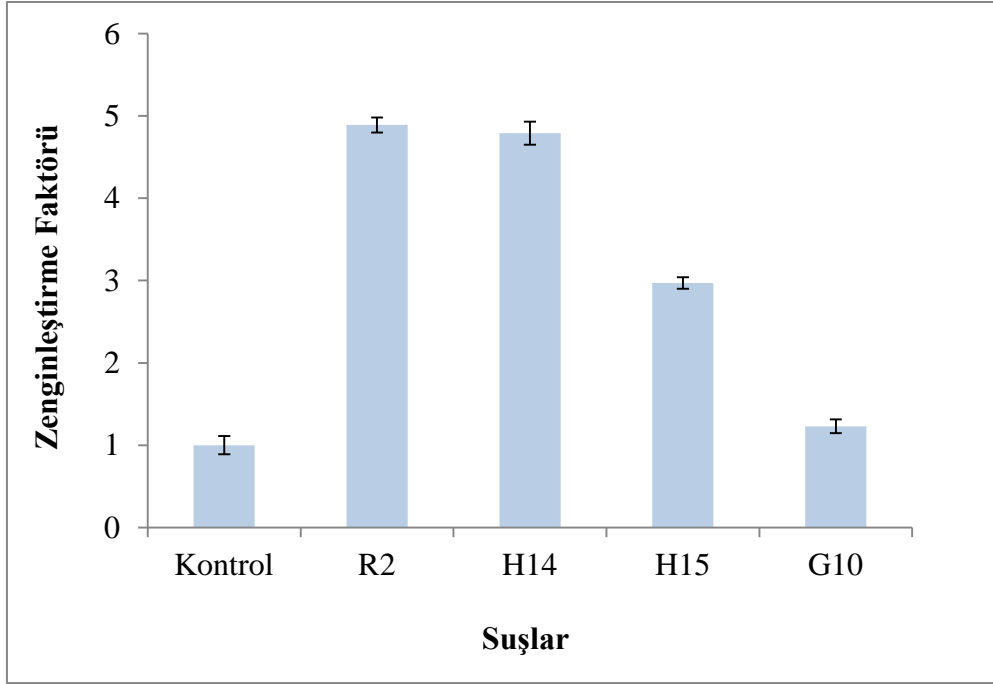


Şekil 4.2. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi

4.7. Laktik Asit Bakteri Kültürlerinin Apoptotik Etkisi

Çalışmada, yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip Mac farland 10'a ayarlanmış canlı bakteri kültürlerinin (R2, H14, H15 ve G10 suşları) HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etkileri, Cell Death Detection ELİSA^{Plus} kiti kullanılarak belirlendi. Bu kit, apoptozun indüklenmesi sonrasında hücre sitoplazması dışındaki histon ile kompleks oluşturmuş DNA fragmentlerinin (mono- ve oligonükleozomlar) miktarsal tayini için kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan kontrol grubu, bakteri ile muamele edilmemiş kanser hücrelerinden oluşturuldu. Canlı bakteri kültürleri (pellet) HeLa kanser hücresi ile muamele edildi ve hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra apoptotik etki 405 nm'de mikropalak okuyucuda belirlendi. Çalışma sonucunda H14, G10, R2 ve H15 bakteri canlı hücrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerine apoptotik etki seviyeleri sırasıyla 4,79-, 1,23-, 4,89- ve 2,97- zenginleştirme faktörü olarak hesaplandı (Şekil 4.3). Bu sonuca göre bakteri suşları arasında en yüksek apoptotik etkiyi R2 canlı bakteri hücresi gösterdi. En düşük apoptotik etkinin G10 suşunda olduğu hesaplandı. Bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında laktik asit bakterilerinin kanser hücresi üzerine apoptotik etkisinin anlamlı olduğu bulundu (p<0.05). Çalışma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, canlı bakteri hücrelerinin kanser hücresi üzerine

apoptotik etkisi ile antiproliferatif etkisi arasında anlamlı bir ilişki görülmedi ($p>0.05$). Yüksek antiproliferatif etkiye sahip olan *L. gasseri* H15 canlı bakteri hücrelerinin diğer canlı bakteri hücrelerine göre düşük apoptotik etkiye sahip olduğu değerlendirildi. Buna karşılık canlı bakteri hücreleri arasında düşük antiproliferatif etkiye sahip olan R2 canlı bakteri hücrelerinin ise kanser hücrelerine yüksek apoptotik etki gösterdiği bulundu.



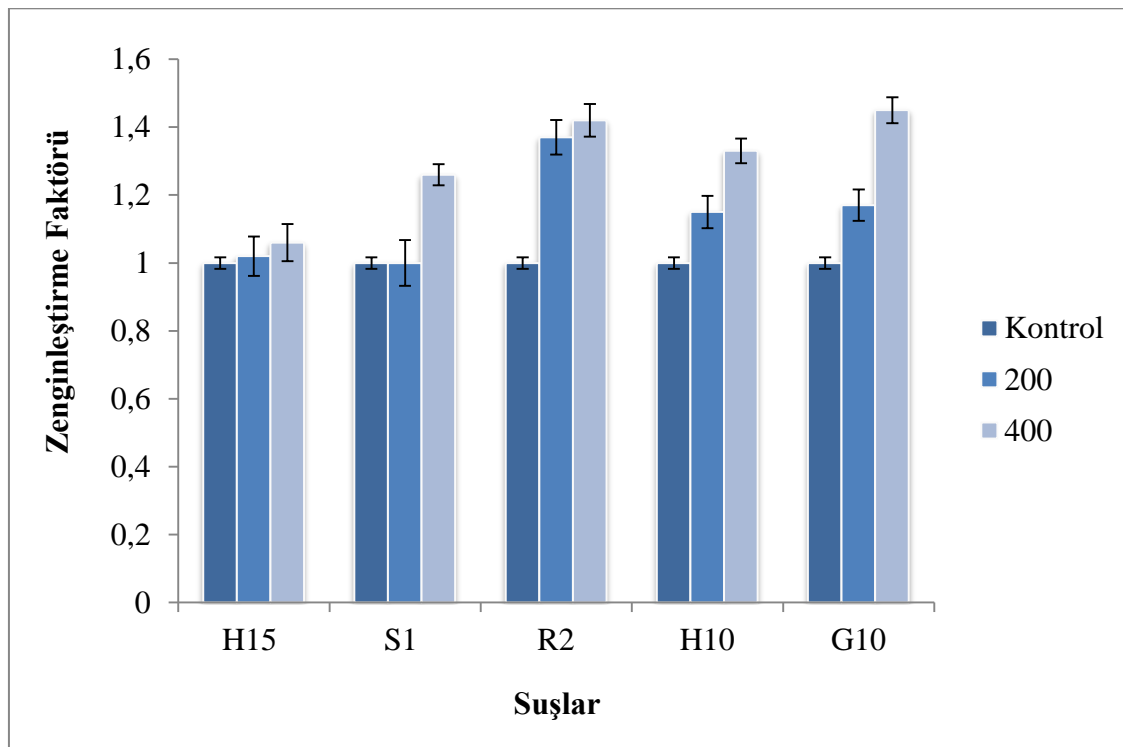
Şekil 4.3. Canlı bakteri hücrelerinin HeLa kanser hücre hattında Cell Death Detection Elisa^{PLUS} ile belirlenen apoptotik etkinin sonuçları

4.8. EPS'lerin Apoptotik Etkisi

Çalışma, yüksek EPS üreticisi suşların saflaştırılarak liyofilize haline getirilmiş EPS ile gerçekleştirildi. Kültür suşlarının ürettiği EPS'lerin apoptotik etkisi Cell Death Detection ELISA^{Plus} kiti kullanılarak belirlendi (3.2.9). S1, R2, H15, G10 ve H10 kültürlerinin EPS'lerinin HeLa hücrelerine apoptotik etkisi araştırıldı. Kontrol grubu olarak kanser hücrelerine distile su muamele edildi. EPS'ler 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonda ayarlandı ve HeLa hücrelerine muamele edildi. Hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra EPS'lerin kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi 405 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda belirlendi. 24 saat inkübasyon sonrası tüm EPS örneklerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak HeLa hücrelerine apoptotik etkinin de arttığı görüldü. Tüm örneklerde en yüksek apoptotik etki 400 µg/mL EPS konsantrasyonunda belirlendi (Şekil 4.4). Konsantrasyon artışına bağlı olarak apoptotik

etkinin artış göstermesi anlamlı olmaktadır ($p < 0.05$). EPS'ler arası en yüksek apoptotik etkiyi ise çok az bir farkla birlikte *L. gasseri* G10 (1,45- zenginleştirme faktörü) ve R2 suşlarından (1,42- zenginleştirme faktörü) elde edilen EPS'ler gösterdi.

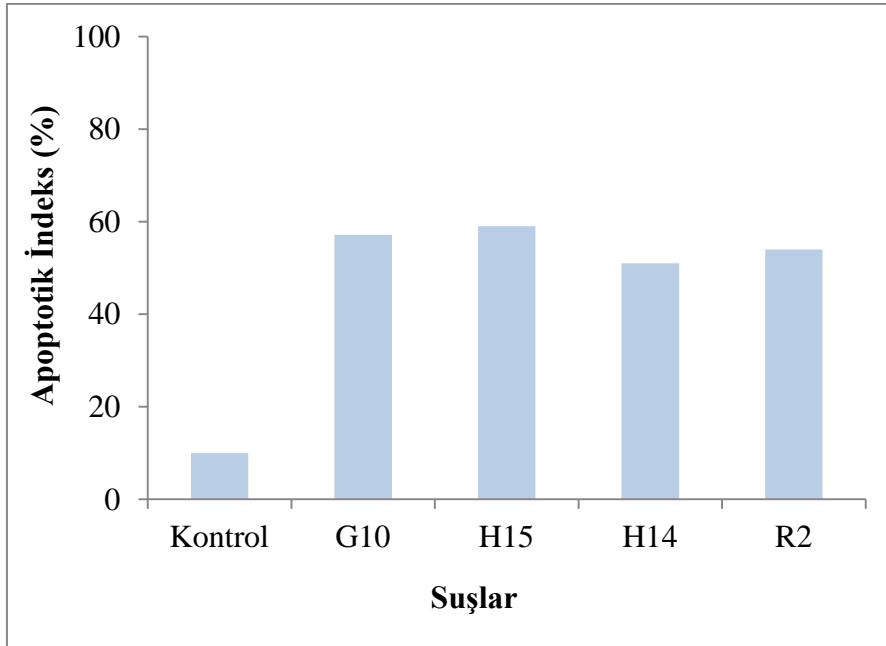
Çalışma sonucunda, kanser hücresi üzerine, canlı bakteri hücrelerinin EPS'lere göre çok daha yüksek ve anlamlı bir apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edildi. Canlı hücre uygulamasına göre EPS'nin HeLa hücresine daha düşük apoptotik etki gösterdiği bulundu. EPS'lerin kanser hücresi üzerine apoptotik etkisi ile antiproliferatif etkisi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı değerlendirildi ($p > 0.05$). Düşük antiproliferatif etkiye sahip olan R2 bakterisinden elde edilen EPS'nin diğer EPS'lere göre yüksek düzeyde apoptotik etkiye sahip olduğu ve orta düzeyde antiproliferatif etkiye sahip olan H15 bakterisinden elde edilen EPS'nin ise düşük oranda apoptotik etki gösterdiği tespit edildi.



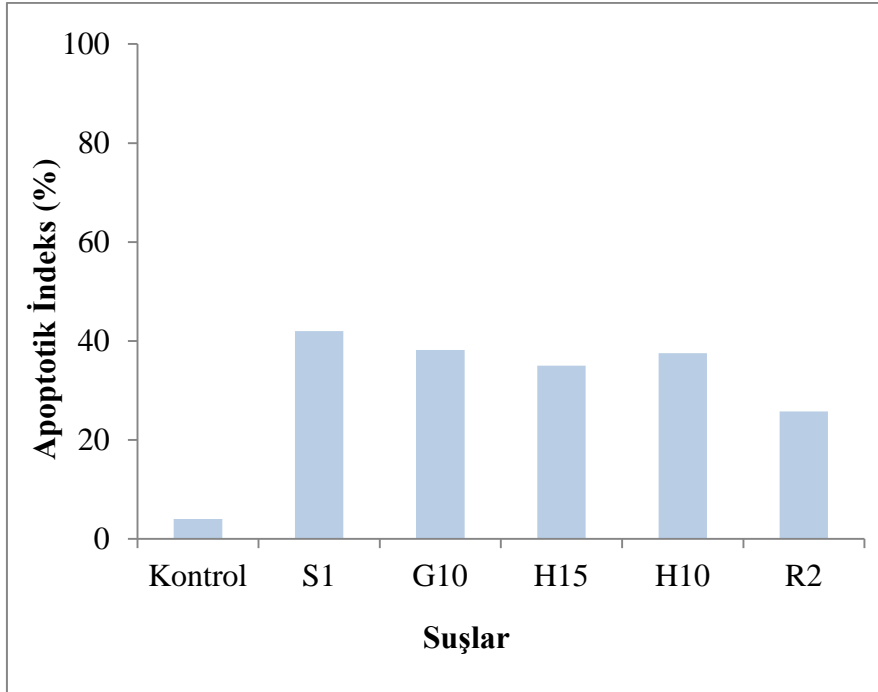
Şekil 4.4. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa kanser hücre hattında Cell Death Detection Elisa^{PLUS} ile belirlenen apoptotik etkinin sonuçları

4.9. Kùltürlerin ve Kùltür Suşlarının Ürettiği EPS'lerin Apoptotik İndeksi

Canlı bakteri kùltürlerinin ve kùltür suşlarının ürettiği EPS'lerin, HeLa hücresi üzerine apoptotik indeksi Hoechst 33342 boyası ile belirlendi (Li ve diğerleri, 2010). Çalışmada Mac farland 10'a ayarlanmış canlı bakteri kùltürleri (H15, H14, R2 ve G10) ve S1, R2, H10, G10 ve H15 kùltür suşlarının ürettiği EPS'ler (yüksek apoptotik ve antiproliferatif etki gösteren konsantrasyon, 400 µg/mL) kullanıldı. Kanser hücresi üzerine en yüksek % apoptotik indeksin H15 suşunun pelletinin % 59 oranında olduğu hesaplandı. Bu sonucu takiben G10, H14 ve R2 suşlarının HeLa hücreleri üzerine % apoptotik indeksi sırasıyla % 57, % 51 ve % 54 (Şekil 4.5) olarak tespit edildi. Kanser hücresi üzerine yüksek apoptotik etkiye sahip R2 ve H14 canlı bakteri kùltürlerinin % apoptotik indekslerinin düşük olduğu ve apoptotik etki ile % apoptotik indeks arasında anlamlı bir ilişki olmadığı değerlendirildi ($p>0,05$). Suşların (S1, G10, H15, H10 ve R2) ürettiği EPS'lerin HeLa hücresi üzerine % apoptotik indeksi sırasıyla % 42, % 38, % 35, % 37.5 ve % 26 oranında olduğu hesaplandı (Şekil 4.6). Buna göre EPS'ler arasında en yüksek % apoptotik indeks S1 EPS'sinde görüldü. En düşük % apoptotik indekse % 26 oranında R2 EPS'sinin sahip olduğu tespit edildi. EPS'lerin kanser hücresine apoptotik etkisi ile % apoptotik indeksi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$). Düşük apoptotik etkiye sahip G10 EPS'sinin % apoptotik etkisinin EPS'ler arasında en yüksek değerde olduğu değerlendirildi.

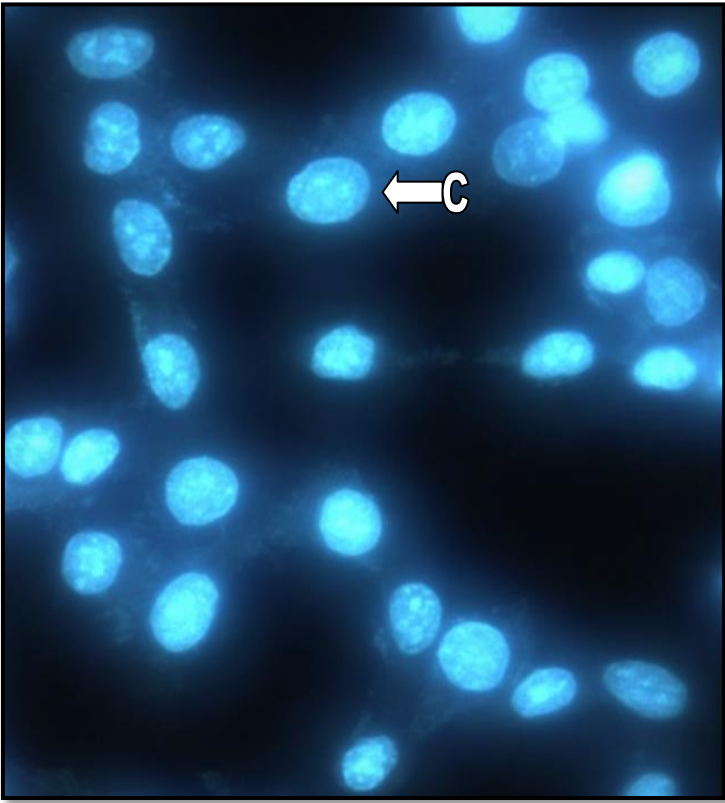
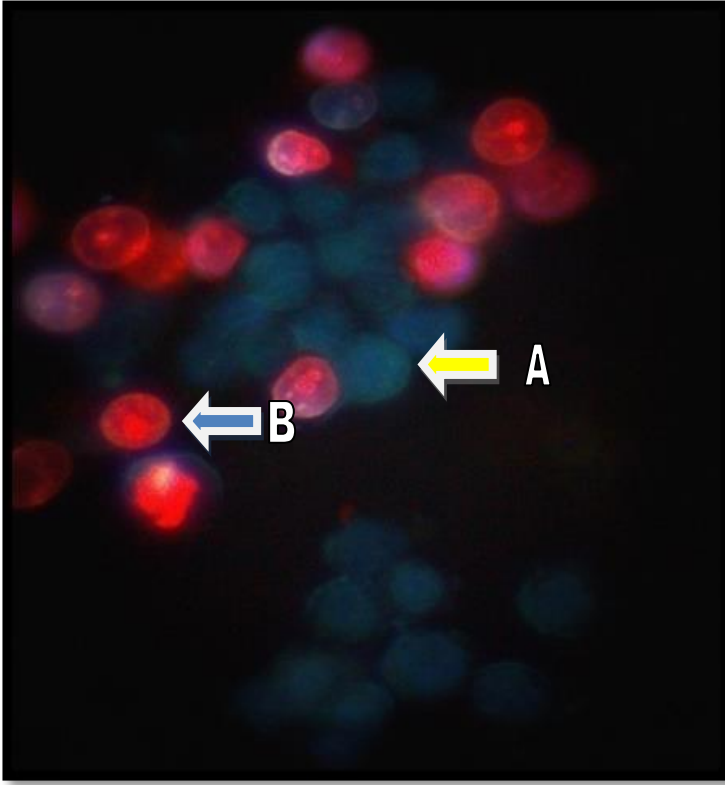


Şekil 4.5. Canlı bakteri kùltürlerinin HeLa hücresi üzerine % apoptotik indeksi



Şekil 4.6. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücresi üzerine % apoptotik indeksi

Canlı bakteri kültürleri ve kültür suşlarında elde edilen EPS'ler ile muamele edilen HeLa hücreleri Hoechst 33342 boyası ile boyanarak hücrelerin apoptotik ve nekrotik görüntüleri floresan mikroskobunda görüntülendi. Canlı bakteri kültürlerin ve EPS'lerin kontrol grubu olarak HeLa kanser hücresine bir şey muamele edilmemiştir. Bakteri kültürleri ve EPS'ler ile muamele olan kanser hücrelerinde hem nekroz hem de apoptoz ölüm çeşitleri görüldü (Resim 4.9). Apoptoza uğrayan hücrelerde hücre zar yapısınının değiştiği ve bozulduğu bununla birlikte hücrenin küçüldüğü gözlemlendi. Resim 4.9 A'da canlı bakteri kültürleri ile muamele edilmemiş kanser hücrelerinin rengi soluk mavi renkte olup, bu hücreler canlı hücrelerdir. Resim 4.9 B'de görülen canlı bakteri kültürleri ile muamele edilmiş parlak turuncu renkteki hücreler ise nekrotik hücrelerdir. Resim 4.9 C'de canlı bakteri kültürleri ile muamele edilmiş kanser hücreleri parlak mavi renkte olup, bu hücreler apoptoza uğramış kanser hücreleridir.

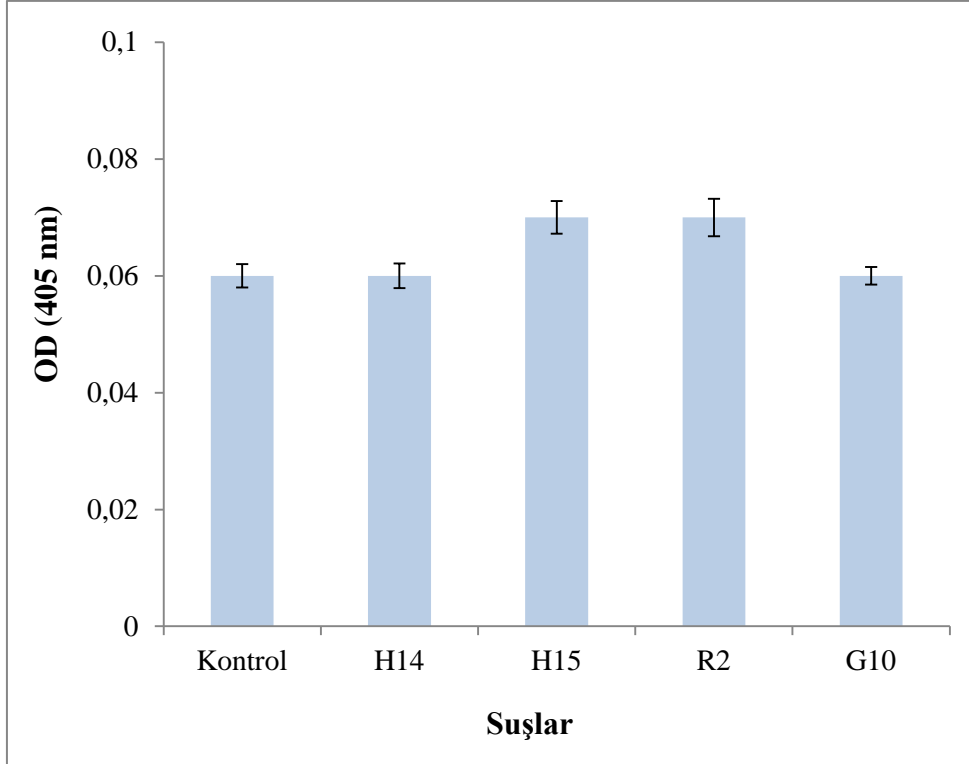


Resim 4.9. Hoechst 33342 boyası ile boyanan kanser hücrelerinin floresan mikroskobu ile görüntüsü. A. Canlı hücre B. Nekrotik hücre C. Apoptoza uğramış hücre

4.10. Bakteri Kùltürleri ve Kùltür Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitesi

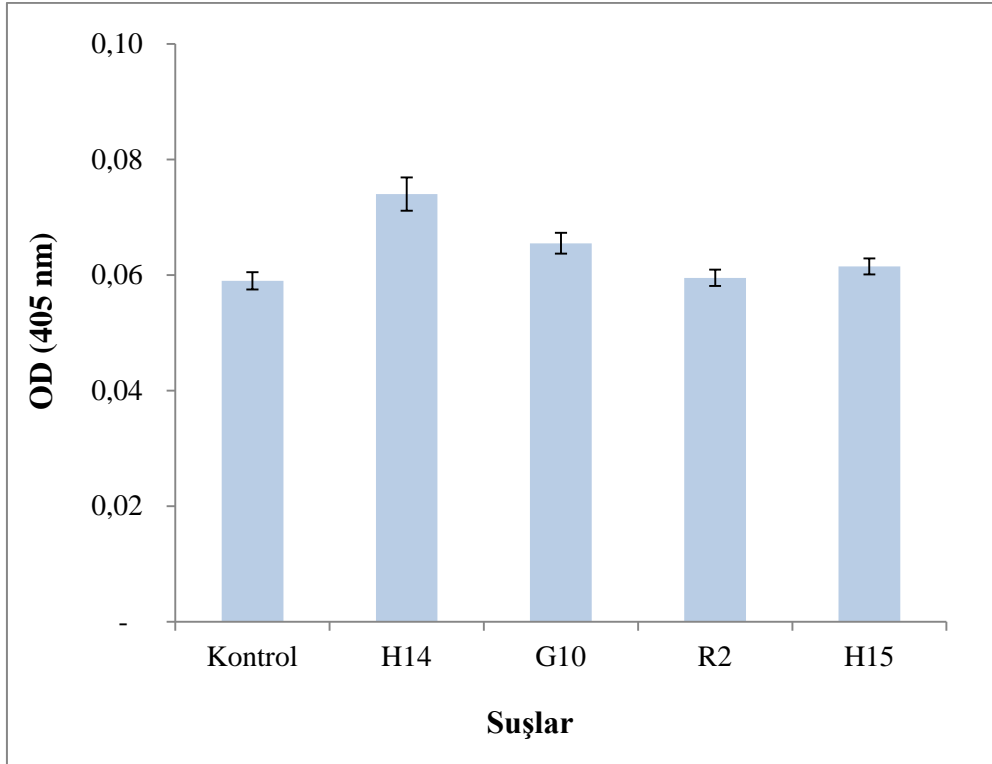
Yüksek antiproliferatif etkiye sahip bakteri kùltürleri ve kùltür suşlarından elde edilen EPS'lerin HeLa hücreleri üzerine kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesinin belirlenmesi Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Colorimetric Assay kit ile gerçekleşti. Kaspaz 3 yönteminin prensibi, işaretlenmiş substratın (DEVD-*p*NA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. Kaspaz 9 yönteminin prensibi, işaretlenmiş substratın (LEHD-*p*NA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçümüdür. Çalışmada kontrol grubu olarak HeLa hücrelerine bir şey muamele edilmedi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri, Mac Farland 10'a ayarlanmış canlı bakteri kùltürleri (H15, H14, R2 ve G10) ve kùltür suşlarının (S1, R2, H15, G10 ve H10) ürettiği EPS'ler (400 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan) HeLa hücrelerine muamele edildi. Hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kanser hücrelerindeki *p*NA miktarı 405 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülerek tayin edildi. Canlı bakteri kùltürleri ve kùltür suşlarının ürettiği EPS'lerin kanser hücresi üzerine Kaspaz 9 aktivitesinin belirlenmesi yöntemindeki basamaklar Kaspaz 3 yönteminin belirlenmesindeki gibidir. Yapılan her iki çalışma tek bir basamakta birbirinden ayrılmaktadır. Kaspaz 9 aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan substrat, kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan substrattan farklılık göstermekte olup, Kaspaz 9 yönteminde LEHD-*p*NA substratı kullanıldı.

Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, HeLa hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitesini H15, H14, R2 ve G10 bakteri canlı hücreleri arasında sadece H15 ve R2 suşlarının (birbirlerine yakın oranlarda) (OD 0,07) gösterdiği tespit edildi. Çalışma sonunda G10 ve H14 suşlarının HeLa hücrelerine kaspaz 9 aktivitesinin olmadığı görüldü. Apoptotik etki ile kaspaz 9 aktivitesi arasında bir ilişki olup olmadığı belirlendi. Bakteri kùltürleri arasında kanser hücresi üzerine yüksek apoptotik etki gösteren R2 suşunun aynı zamanda diğer bakteri kùltürleri arasında yüksek kaspaz 9 aktivitesine sahip olduğu değerlendirildi. Düşük apoptotik etkiye sahip olan G10 canlı bakteri hücresinin ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise HeLa hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitesi göstermediği belirlendi (Şekil 4.7).



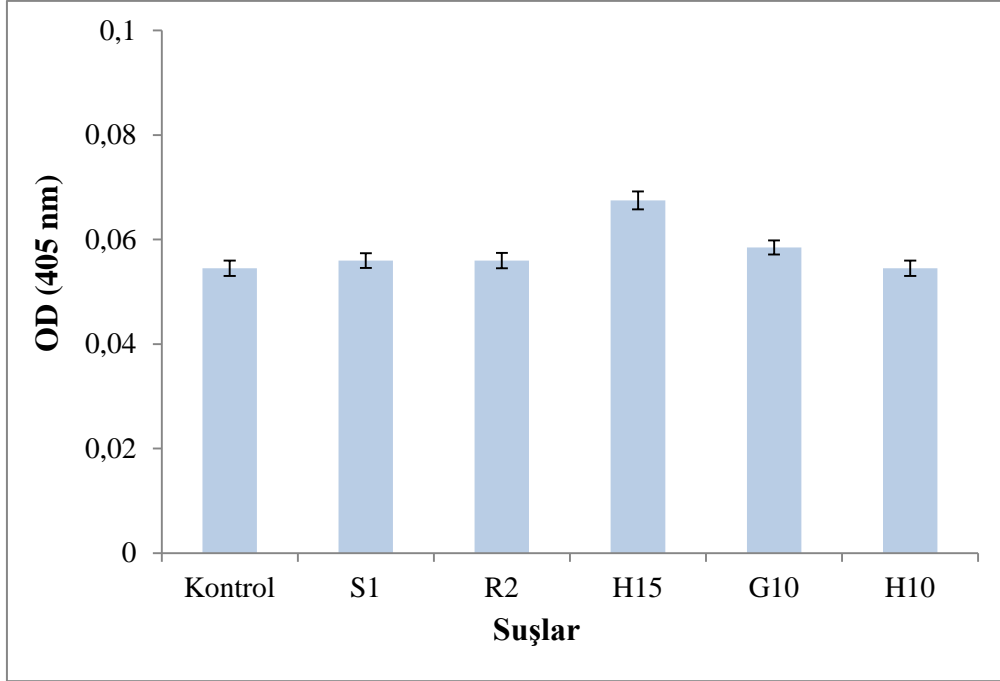
Şekil 4.7. Suşların canlı hücrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitesi

Çalışma sonunda kontrol grubu ile, H15, H14, R2 ve G10 canlı bakteri hücreleri karşılaştırıldığında, bakteri hücreleri arasında HeLa hücreleri üzerine en yüksek kaspaz 3 aktivitesine (OD 0,07) H14 suşunun sahip olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Sonuçlara göre R2 ve H15 suşlarının HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesinin olmadığı görüldü. G10 suşunun ise H14 suşundan düşük kaspaz 3 aktivitesine sahip olduğu ve hesaplanan değerlerin önem arz etmeyecek nitelikte olduğu tespit edildi. Bu sonuç ile birlikte G10 suşunun yapılan önceki apoptoz çalışması sonucunda da düşük apoptotik etkiye sahip olduğu değerlendirildi. Buna göre G10 suşunun apoptotik etkisi ile kaspaz 3 aktivitesi arasında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,05$). Yüksek apoptotik etkiye sahip olan ve birbirine yakın oranlarda apoptotik etki gösteren R2 ve H14 suşları arasında, H14 suşunun diğer bakteri hücreleri ile karşılaştırıldığında yüksek kaspaz 3 aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Apoptotik etkisi yüksek olan bir diğer R2 bakteri suşunun ise HeLa hücreleri üzerine kaspaz 3 aktivitesi göstermediği bulundu (Şekil 4.8). Canlı bakteri kültürlerinin kanser hücreleri üzerine kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin değerlendirme sonuçlarına bakıldığında, bu iki aktivitenin farklı suşlarda farklı etki gösterdiği ve aynı suşun kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin de farklı olduğu tespit edildi.



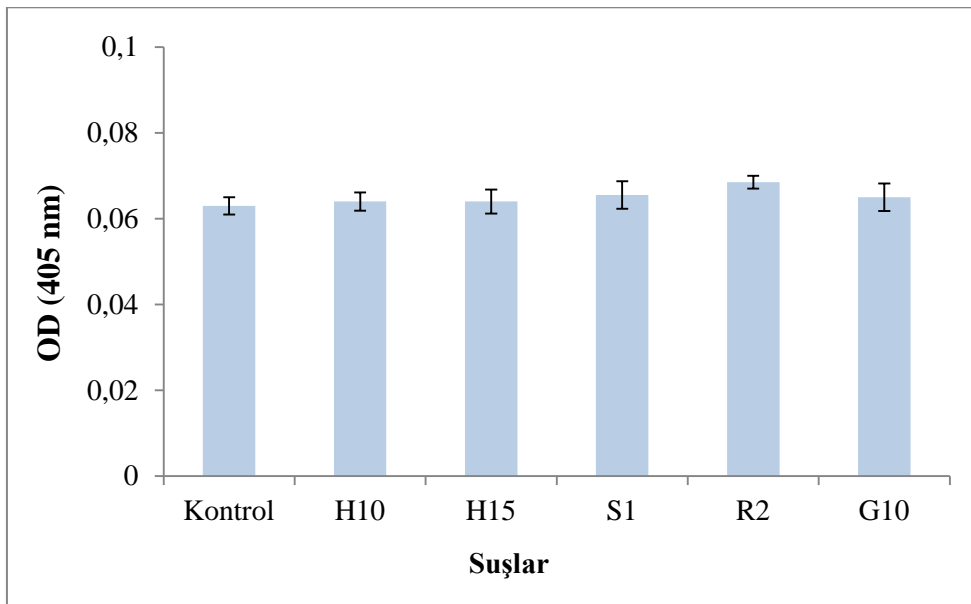
Şekil 4.8. Suşların canlı hücrelerinin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 3 aktivitesi

Yüksek antiproliferatif etki gösteren S1, R2, H15, G10 ve H10 kültür suşlarının ürettiği EPS'lerin (400 µg/ml) HeLa hücreleri ile 24 saat muamele sonucu hücrelerdeki kaspaz 3 aktivitesi ölçüldü. Çalışma sonunda EPS'ler ile kontrol grubu karşılaştırıldığında sadece H15 suşunda elde edilen EPS'nin yüksek kaspaz 3 aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.9). Diğer EPS'lerin HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesine sahip olmadığı değerlendirildi. EPS'ler arasında kanser hücresi üzerine yüksek apoptotik etki gösteren G10 suşunun, kaspaz 3 aktivitesi göstermediği; EPS'ler arasında kanser hücreleri üzerine düşük apoptotik etkiye sahip olan H15 EPS'nin ise yüksek kaspaz 3 aktiviteye (OD 0,07) sahip olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde EPS'lerin kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi ile kaspaz 3 aktivitesinin paralellik göstermediği belirlendi ($p>0,05$). Canlı bakteri kültürleri ile kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin HeLa hücrelerine gösterdiği kaspaz 3 aktiviteleri karşılaştırıldığında, EPS'lerin ve canlı bakteri hücrelerinin sahip olduğu kaspaz 3 aktivitesinin de yaklaşık olarak aynı etkide olduğu görüldü.



Şekil 4.9. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücresi üzerine kaspaz 3 aktivitesi

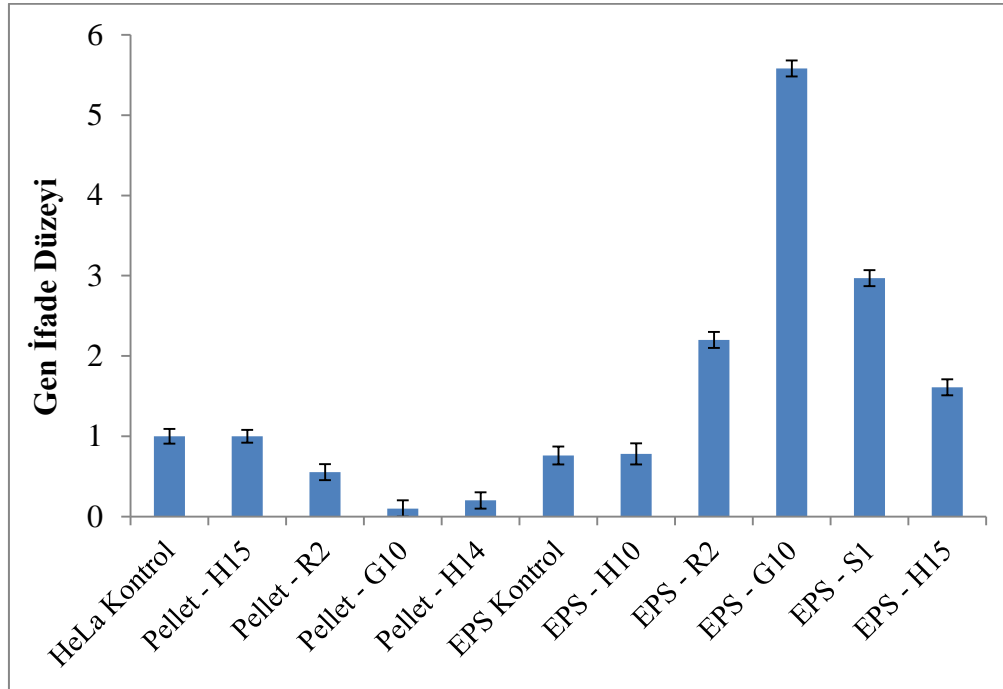
Şekil 4.10'de görüldüğü gibi bakteri kültürlerine ait beş farklı suşlarından elde edilen EPS'lerinin (400 µg/ml) HeLa hücreleri ile 24 saat muamele edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. Bu sonuca göre EPS'lerin hiçbirinin HeLa hücrelerinde kaspaz 9 aktivitesi göstermediği tespit edildi. Sonuçlar doğrultusunda EPS'lerin apoptotik etkileri ile kaspaz 9 aktiviteleri arasında bir ilişki bulunamadığı belirlendi ($p>0,05$).



Şekil 4.10. Beş farklı suşun EPS'lerinin HeLa hücresi üzerine kaspaz 9 aktivitesi

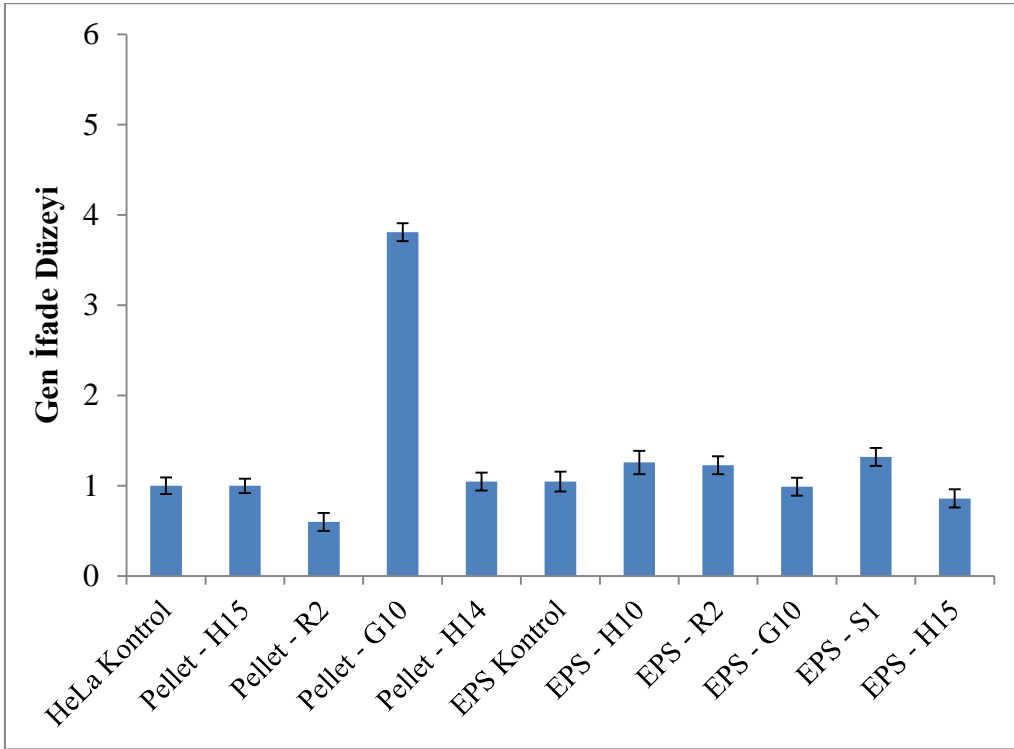
4.11. Bakteri Kùltürleri ve Kùltür Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Gen İfade Düzeyleri

Yüksek antikanserojenik aktivite gösteren Mac Farland 10'a ayarlı canlı bakteri kùltürleri (H15, H14, R2 ve G10) ve bakteri kùltürlerinden elde edilen R2, G10, S1, H10 ve H15 EPS örnekleri (400 µg/ml konsantrasyonda) kùltürü yapılan HeLa kanser hücreleri ile muamele edildi ve 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bakteri kùltürleri ve EPS'lerin kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi, kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin mRNA ifade düzeyleri tespit edilerek değerlendirildi (Şekil 4.11 ve 4.12). Şekil 4.11'e göre canlı bakteri kùltürleri uygulanan HeLa hücrelerinde, bakteri kùltürleri ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerine oranla kaspaz 3 mRNA'sında artış olmadığı bulundu. Kùltür suşlarından elde edilen EPS örnekleri uygulanan HeLa hücrelerinde EPS ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerine oranla G10, R2, S1 ve H15 kùltür suşlarından elde edilen EPS'lerin kaspaz 3 mRNA'sının arttığı belirlendi (p<0,05). EPS'ler arasında G10 EPS'sinin diğer EPS'lere göre daha yüksek kaspaz 3 gen ifade düzeyine sahip olduğu tespit edildi. Canlı bakteri kùltür suşları ile kùltür suşlarından elde edilen EPS'ler karşılaştırıldığında EPS'lerin daha etkin olduğu ve yüksek kaspaz 3 aktivitesi gösterdiği değerlendirilmiştir.



Şekil 4.11. Bakteri kùltürleri ve kùltür suşlarından elde edilen EPS'lerin kaspaz 3 gen ifade düzeyleri

Şekil 4.12’te hem canlı bakteri kültür suşları hem de kültür suşlarından elde edilen EPS’lerin kaspaz 9 gen ifade seviyeleri verildi. Örnekler arasında G10 canlı bakteri kültüründe kaspaz 9 mRNA’sının arttığı bulundu. Diğer canlı bakteri kültürlerinin kanser hücreleri üzerinde gen ifadesinin olmadığı tespit edildi. Kültür suşlarından elde edilen EPS’lerin de kaspaz 9 gen ifade düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemsenmeyecek değerde kaspaz 9 gen ifade seviyesinin arttığı belirlendi.



Şekil 4.12. Bakteri kültürleri ve kültür suşlarından elde edilen EPS’lerin kaspaz 9 gen ifade düzeyleri

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, canlı bakteri kültürlerin ve kültür suşlarından elde edilen EPS’lerin, HeLa hücresi üzerine gen ifade düzeyleri ile protein düzeyinde değerlendirilen kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri kısmen benzer sonuç gösterdiği tespit edildi. Çünkü protein düzeyinde yüksek kaspaz aktivitesi gösteren hem canlı bakteri kültürleri hem de kültür suşlarından elde edilen EPS’lerin gen düzeyinde düşük etki gösterdi. Sonuçlar doğrultusunda hem canlı bakteri kültürleri hem de kültür suşlarından elde edilen EPS’ler varlığı ile HeLa hücresi üzerine apoptotik etkinin kaspaz yolağından gerçekleşmediği belirlendi.

5. TARTIŞMA

Doğal vajinal floranın en önemli grubunu oluşturan laktik asit bakterilerinin, vajen florasında ürogenital enfeksiyonları önemli ölçüde önlediği ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara sebep olan patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyerek mikrobiyolojik bir bariyer görevi gördüğü gözlenmiştir. Kanserojen maddelere karşı önemli bir savunma birliği içinde olmaları ile birlikte aynı zamanda immün sistemi teşvik ederek organizmayı sağlıklı tutmaya yardımcı olmaktadır (Prasad ve diğerleri, 1998; Vasquez ve diğerleri, 2002; Perdigon, Vintini, Alvarez, Medina ve Medici, 1999). Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması, invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapması ile karakterize edilen öldürücü bir hastalıktır (Komaki ve diğerleri, 2012). Günümüzde kullanılan antineoplastik ajanlar, birkaçı haricinde tedavi edici değil, hafifletici olarak rol oynamaktadır (Di Leva ve diğerleri, 2012). Epidemiyolojik çalışmalar, bitkilerle yapılan tedavilerin yanı sıra, yüksek miktarda probiyotik alımının insanlarda düşük kanser prevalansı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Karsinojen inaktivasyonu, antiproliferasyon, hücre döngüsünün askıya alınması, apoptoz ve farklılaşmanın indüksiyonu, anjiyogenezin baskılanması, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması ya da tüm bu mekanizmaların kombinasyonu probiyotiklerin kansere karşı etki mekanizmalarını oluşturur (Liu ve diğerleri, 2013). Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi, cerrahi tedavi ve kemoterapi gibi birçok yöntemin yan etkilerinin bulunması ve tedavide başarı şansının düşük olması nedenleri ile doğal, yeni ve alternatif ilaçlara arayışlar artmaktadır. Çalışmamız bu nedenle, kanserin tedavisinde alternatif olabilecek vajinal probiyotik bakteri kültürlerinin, vajinada kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmedeki rolü ve antikanser mekanizmasının anlaşılmasına yöneliktir.

Laktobasiller ve bifidobakteriler, probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların en önemlileridir (Iqbal ve diğerleri, 2014). Bu mikroorganizmaların insan kaynaklı olması, ortama daha kolay adapte olmaları ve konak ile diğer muhtemel ilişkilerini en iyi şekilde gerçekleştirmeleri açısından önemlidir (Fuller, 1989). Bu düşünce ile çalışmada, sağlıklı insan vajen kaynaklı, probiyotik özellikleri ile öne çıkmış (sonuç verilmemiştir) bakteri kültürlerinden, on laktik asit bakterisi kullanılmıştır. Bu bakterilerin probiyotik özellikte olması ve vajinal florada bulunması sebebiyle, çalışmamızda serviks kanser hücre hattı (HeLa) kullanılmıştır. Çalışmada, kullanılan suşların EPS üretim miktarları dikkate

alınmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların çoğalmaları sırasında sentezleyerek ortama saldıkları polisakarit yapıda, yüksek moleküler ağırlıklı, gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, pıhtı azaltıcı olarak kullanılan, biyoteknolojik olarak önemli kullanım alanı bulunan bir polimerdir (Kodali ve Sen, 2008; Welman, Maddox ve Archer, 2003; Cerning, 1990). Yapılan literatür araştırmalarında, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp. gibi farklı probiyotik bakterilerin EPS üretimleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Audy, Labrie, Roy ve Lapointe (2010), yine farklı şeker kaynaklarının (glukoz, galaktoz, laktoz, fruktoz) *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002 tarafından üretilen EPS üretimini değerlendirmiş ve en yüksek laktoz kaynağında 1080 ± 120 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Donnarumma ve diğerleri (2014), sağlıklı kadın vajinal florasından *L. crispatus* L1 suşunu izole etmişler ve *L. crispatus* L1 suşundan elde ettikleri EPS'yi saflaştırarak miktar ölçümü yapmışlardır. Ölçüm sonunda EPS miktarının 200 ile 400 mg/L olarak değiştiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda, vajinal kaynaklı probiyotiklerden sentezlenen EPS üretim miktarları 37,3 ile 217,1 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek EPS üretimi *L. gasseri* H15 suşunda $217,1 \pm 2,0$ mg/L olarak bulunmuş ve buna karşılık en düşük EPS üretimi ($37,3 \pm 0,0$ mg/L) ise *L. gasseri* R4 suşunda görülmüştür. Suşların EPS üretimi literatürlerde elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir. Yüksek veya orta üretim kapasitesine sahip olan beş adet *L. gasseri* suşunun (H10, G10, H15, R2, S1) saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası ölçülen EPS miktarları ile liyofilizasyon öncesi suşlardaki EPS üretim miktarlarının paralellik gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). EPS üretimi yüksek laktobasil suşun, liyofilizasyon sonrasında da yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olduğu değerlendirilmiştir. Yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan beş adet suştan saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası en yüksek EPS miktarı ($255,2 \pm 4,3$), *L. gasseri* H15 ve en düşük EPS miktarı ($168,2 \pm 3,4$) suşunda görülmüştür. Aynı türün EPS üretme miktarının suşlara göre farklılık gösterdiği dikkat çekmiştir. Ruas Madiedo ve diğerleri 2007 yılında, çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarından sentezlenen EPS'lerin üretim miktarlarını tespit etmişlerdir. Sonuçlarda *L. casei* türüne ait 3 farklı suşun EPS üretim kapasitelerinin 38,2 ile 153,0 mg/L arasında değiştiğini bulmuşlar; *L. plantarum* türüne ait 4 farklı suşun EPS üretim kapasitelerinin her bir suşta farklılık gösterdiğini ve suşlar arasında EPS üretim miktarlarının en düşük 44.1 mg/L ve en yüksek ise 170,1 mg/L olduğunu hesaplamışlardır.

Probiyotikler, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, immün sistemi düzenleme, zarar gören mukozanın daha hızlı iyileşmesini sağlama gibi sağlığa faydalı etkilerini ancak tutunup kolonize oldukları zaman gösterebilirler. (Ouweland ve diğerleri, 1999;

Kirjavainen ve diğeri, 1998). Laktobasiller, vajinadaki patojen bakterilerin kolonize olmasını ve vajinanın epitel yüzeyine yapışmasını engellemek için patojenler ile yarışmaya girerek bariyer oluştururlar ve böylece vajinal florayı koruyabilmektedirler (Osset ve diğeri, 2001; Kaewsrichan ve diğeri, 2006). Laktik asit bakterilerinin adezyonu, pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik, sterik gibi kuvvetlerle; lipoteikoik asit ve lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkili olmaktadır. Bakteri yüzeyinde bulunan protein ve karbonhidrat moleküllerinin farklı kombinasyonları da laktobasillerin, insan bağırsak epiteli gibi epitel yüzeylere tutunmasını sağlayan faktör olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Servin ve Coconnier, 2003; Doğan, 2012). Otero ve Nader-Macias'ın (2007) yaptığı bir çalışmada vajinal laktobasil türlerine ait *L. gasseri* CRL1412, *L. gasseri* CRL1421 ve *L. delbrueckii* CRL1461 suşlarının farklı pH'da (4,5 ve 7) vajina epitel hücreleri üzerine adezyon etkisi araştırılmıştır. Adezyon etki, adezyon indeksi ve adezyon yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre farklı pH'larda vajinal laktobasil türlerinin, vajinal epitel yüzeye adezyon yüzdesi ve adezyon indeksinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. pH değeri arttıkça suşların vajina epiteline adezyon yeteneklerinin azaldığı bulunmuştur. Çalışma sonunda adezyon yüzdesi bakımından tüm suşlar benzer sonuç göstermiştir. En yüksek adezyon yüzdesi *L. gasseri* CRL1421 suşunda % $100 \pm 0,0$ oranında hesaplanmıştır. En yüksek adezyon indeksine ise *L. delbrueckii* CRL1461 suşunun sahip olduğu tespit edilmiştir ($67,5 \pm 8,2$). Adezyon indeksine göre sonuçlar değerlendirildiğinde belirgin farklılıkların olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların farklı laktobasil türlerine, ayrıca aynı türe ait farklı suşlara göre değişiklik gösterdiği değerlendirilmiştir. *L. gasseri* türüne ait farklı iki suşun adezyon yeteneklerinin farklı olmasında, aynı zamanda bakterilerdeki glikozid yapısının etkili olabileceği bildirilmiştir. Duary, Rajput, Batish ve Grover (2011), *L. plantarum* Lp91 suşunun HT-29 ve Caco-2 kolon kanser hücre hatları üzerine % $12,8 \pm 1,56$ oranında adezyon yeteneğine sahip olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada araştırmacılar, bakterilerin adezyon yeteneklerinin bakteri hücre zarı ve yüzeyindeki etkileşimler ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada, hücre yüzeyinin hidrofobisitesi türlerin adezyon yeteneklerinde önemli bir kriter olarak değerlendirilmiş ve hidrofobisitesi yüksek olan bakteri türünün adezyon yeteneğinin yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda yüksek EPS sentezleme yeteneğine sahip *L. gasseri* suşlarının (G10, H10, H15, R2 ve S1) HeLa hücresi epitel yüzeye tutunma yetenekleri araştırılmıştır. Tutunma kapasitesi adezyon indeksi ve adezyon yüzdesi olarak değerlendirilmiştir. Adezyon indeksi ve adezyon yüzdesi arasında kısmi

ilişki gözlenmiştir. Yüksek adezyon yüzdesine sahip iki suşun (G10 ve S1) aynı zamanda yüksek adezyon indeksine sahip olduğu değerlendirilmiştir. En yüksek adezyon yüzdesi (% $90 \pm 3,4$) ve indeksi ($59 \pm 3,1$) G10 suşunda görülmüştür. Aynı suşun EPS üretim kapasitesinin de yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu sonuca göre G10 suşunun HeLa hücrelerine en yüksek adezyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük adezyon yüzdesi (% $28 \pm 3,1$) ve indeksi ($50 \pm 5,0$), diğer suşlara göre kültür ortamında orta düzeyde EPS üretimine sahip R2 suşunda görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer sonuçlarda benzer sonuçlar vermesi, adezyon ile EPS üretim kapasitelerinin önemli derecede etkili olabileceğini göstermiştir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşan EPS'ler, kompleks bir biyopolimer karışımıdır. Bu polimerler, mikroorganizma hücreleri arasındaki boşlukları doldurarak mikrobiyal agregatların oluşmasını sağlamakta ve biyofilm matriksinin yapısını meydana getirmektedirler (Vu ve diğerleri, 2009). Yapılan çalışmalarda adezyon yeteneğinin suşlara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Lopez ve diğerleri, 2012). Literatürlere göre suşların HeLa kanser hücresi üzerine adezyon yeteneğinde, suşlar tarafından üretilen EPS'nin farklı polimer yapısının etkili olduğu bildirilmiştir (Laparra ve Sanz, 2009).

Yapılan *in vitro* deneylerde probiyotiklerin kanserli hücre gelişimini inhibe ettiği ve hayvan denemelerinde kanser gelişimini engellediği, tümörleri küçülttüğü bilinmesinin yanı sıra laktik asit bakterilerinin kanserojen maddelere karşı önemli bir savunma birliği içinde olduğu bunun yanında sağlıklı kişilerin vajen florasında bulunarak patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyolojik bir bariyer olarak görev aldığı belirtilmektedir. Serviks kanseri, insan papilloma virüs (HPV) bulaşması ile ilgili olarak oluşan bir kanser türüdür. Yapılan çalışmalarda laktobasil türlerinin antitümör aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Bunun nedeni de vajinal florada bulunan laktobasillerin dominant halde olmalarındandır. Choi ve diğerleri (2006), *L. acidophilus* ATCC 43121, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* 606 ve *L. brevis* ATCC 8287 suşlarını ısı ile öldürülmüş formlarını HeLa, MCF7, U-87 (beyin kanser hücresi), HepG2, U2OS (kemik kanser hücresi), PANC-1 (pankreas kanser hücresi) ve hEF (kansere olmayan insan embriyo fibroblastı) hücreleri ile muamele etmişlerdir. MTT metodu ile suşların kanser hücre hatları üzerine antiproliferatif etkisini ve normal hücreler üzerine sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Test edilen suşlar arasında *L. acidophilus* 606 suşunun HT-29, HeLa and PANC-1 hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi en yüksek olmuştur. Normal hücreler üzerine ise *L. acidophilus* 606 suşu sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, HeLa hücresi, Mac farland 10'a ayarlanmış canlı bakteri hücreleri ile muamele edildikten sonra antiproliferatif aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlara göre *L. gasseri* türüne ait farklı iki suşta en yüksek antiproliferatif etki bulunmuştur. Bu sonuçlar, *L. gasseri* H15 suşunun pelletinin % 77 hücre ölümü ve G10 suşunun % 73 hücre ölümü olarak hesaplanmıştır. *L. gasseri* türünden farklı bakteri türleri (*L. plantarum* A2 ve *L. crispatus* R4 suşları) HeLa hücresi üzerine antiproliferatif etkisi belirlenememiştir. Sonuç genelinde yüksek antiproliferatif etkiyi *L. gasseri* türüne ait suşlar göstermiştir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada, *L. gasseri* ve *L. crispatus* türleri normal serviks hücresine sitotoksik etkisi ve HeLa kanser hücresi üzerine antiproliferatif aktivite araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda laktik asit bakteri türlerinin sağlıklı serviks hücresi üzerine sitotoksik etki göstermediği fakat serviks tümör hücresi üzerine sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışmada, probiyotik olarak bilinen, normal serviks ve vajinal mikrobiyal florasında dominant halde bulunan laktobasillerin antitümör etkilerinin, kadınlarda ürogenital hastalıklarından biri olan bakteriyel vajinozis ve servikal intraepital neoplazi arasındaki bağlantının, vajinal laktobasiller ve serviks kanseri ile korelasyon gösterdiği tahmininde bulunmaktadır (Motevaseli ve diğerleri, 2013). Probiyotiklerin antitümör aktivitelerinin yanı sıra, probiyotiklerden sentezlenen EPS'lerin de kanser hücreleri üzerine antitümörojenik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Kim ve diğerleri, 2010).

EPS'lerin antioksidan, kolesterol düşürücü etki, antitümör, antiviral ve immünomodülatör (bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma yoluyla bağışık yanıtı değiştiren madde) aktiviteleri gibi sağlığa önemli fayda sağladıkları kanıtlanmıştır (Kodali ve Sen, 2008; Welman ve Maddox, 2003; Hosono ve diğerleri, 1997; Arena ve diğerleri; 2006). Liu, Chu, Chou ve Yu (2011) yaptığı bir çalışmada, *L. casei* 01 suşundan elde edilen EPS'nin farklı miktarlarının HT-29 kanser hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisini ve sağlıklı insan bağırsak 407 hücre hattına (ATCC CCL-6) sitotoksik etkisini MTT kolorimetrik yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmada 5-100 µg/mL konsantrasyonlardaki EPS'nin 24 saat inkübasyon sonrası bağırsak 407 hücrelerinin canlılığını etkilememiş, 100 µg/mL konsantrasyonu HT-29 hücre hattı üzerine yüksek derecede antiproliferatif etki göstermiş, kanser hücre hattı % 73,9 oranında canlı kalmıştır. Çalışmamızda yüksek EPS üreticisi suşların saflaştırılarak liyofilize haline getirilmiş EPS'nin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi WST-1 kiti ile araştırılmıştır. Laktobasil türlerine ait beş

farklı H10, R2, H15, G10 ve S1 suşlarından elde edilen EPS'lerinin uygulanmalarına bağlı olarak, HeLa hücrelerinin canlılığında azalma gözlenmiştir. Liyofilize EPS'ler farklı konsantrasyonlarda (100, 200 ve 400 µg/mL) hazırlanmış ve HeLa hücre hattına muamele edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrası tüm EPS örneklerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak antiproliferatif etkinin de arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Denenen beş farklı suşun hepsi antiproliferatif etki göstermiştir. EPS'nin en yüksek antiproliferatif etkinin belirlendiği konsantrasyon 400 µg/mL'dir. Antiproliferatif etki % 11 ile % 47 (hücre ölümü) oranları arasında değişiklik göstermektedir. Suşlar arasında en yüksek etkiyi S1 suşunun 400 µg/mL konsantrasyonun ($47 \pm 3,0$ hücre ölümü) gösterdiği belirlenmiştir. İkinci olarak yüksek antiproliferatif etki, *L. gasseri* G10 suşunda $42 (\pm 2,75)$ oranında hücre ölümü olarak hesaplanmıştır. Çalışmada en düşük antiproliferatif etkiye sahip EPS örneği ise R2 suşunda $11 (\pm 2,5)$ oranında hesaplanmıştır. Yapılan bir çalışmada *L. helveticus* MB2-1 suşundan elde edilen EPS, farklı konsantrasyonlarda (50-600 µg/mL) insan gastrik kanser hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiştir. Çalışma sonunda EPS'nin kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisinin inkübasyon sürelerine ve doza bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Inkübasyon süreleri arttıkça antiproliferatif etki de artış görülmüştür. Buna bağlı olarak uygulanan EPS dozlarının da artışına bağlı olarak antiproliferatif etki artmıştır. En yüksek antiproliferatif etkinin $57,6$ oranında olduğu bulunmuştur. Yapılan antiproliferatif çalışmalarında bakteri suşlarından elde edilen EPS'lerin farklı antiproliferatif etkisinin; farklı inkübasyon sürelerinin olması, uygulanan EPS konsantrasyonunun değişiklik göstermesi gibi çeşitli nedenlerden ötürü farklı olduğu tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2014). Buna göre çalışmamızda kanser hücresi üzerine uygulanan EPS'nin inkübasyon süresinin (24 saat) ve uygulama dozunun (100, 200 ve 400 µg/mL), yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında elde ettiğimiz sonucun yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, canlı bakteri kültürleri ve kültürlerden elde edilen EPS'ler, HeLa kanser hücresine antiproliferatif etki göstermiş olup, EPS ve bakteri kültürleri arası karşılaştırma yapıldığında ise, en yüksek antiproliferatif etkiyi bakteri canlı hücrelerinin gösterdiği görülmüştür. Genel olarak, canlı probiyotik bakterisinin kanser hücresine uygulaması EPS'ye göre daha yüksek antiproliferatif etki göstermesi bakımından önemli bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan canlı bakteri hücrelerinde yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan suşlardan biri *L. gasseri* G10 suşu olup bu suş, aynı zamanda HeLa hücreleri üzerine yüksek adezyon yeteneği göstermiş ve bu suştan elde edilen EPS'nin antiproliferatif etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla hücredeki denge için gerekli bir süreç olan apoptozun apoptozun kontrolünde oluşan anormalliklerin kanser başta olmak üzere birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (Gökçe ve diğerleri, 2011; Mcphie ve diğerleri, 2003). Apoptotik süreçte hücre ölümü ya da sağkalımında kemopreventif ve terapötik potansiyeli önemli olabilmektedir. Çeşitli çalışmalar laktik asit bakterilerin iç (intrinsic) (Bax, Bak, Bik, Bcl-2, Bcl-XL gibi proteinler aracılığı ile) ve dış (extrinsic) yollara (CD95 (APO – 1/Fas), TRAIL– R1, TRAIL - R2, TNF - R gibi ölüm reseptörleri aracılığı ile) bağlı olarak apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini gösterilmiştir. (Zhong, Zhang ve Covasa, 2014). Chen ve diğerleri (2012), farelerde kolorektal kanser üzerine *L. acidophilus*'un ağızdan uygulandıktan sonra etkisini analiz etmişlerdir. Bu sonuçlar, tedavi edilen farelerde *L. acidophilus*'un kolorektal karsinogenezisi azalttığı ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* bakteri türlerinden elde edilen eksopolisakaritlerin, HT-29 kolon kanseri hücrelerine karşı antitümör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Bu antitümör aktivite otofajik hücre ölümü aktivasyonuna bağlı olarak apoptotik proteinlerin dolaylı olarak indüksiyonu ile gerçekleşmiştir (Kim ve diğerleri, 2010). Bu çalışmada Bax, kaspaz-3 ve Bak proapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ile bakterilerin hücre ölümünü gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. Nami ve diğerleri, 2014 yılında vajinal mikrofloradan izole edilen probiyotik bakteri türünün (*Enterococcus faecalis*) HeLa, MCF-7 ve HT-29 kanser hücreleri üzerine biyoterapötik etkisinin antiproliferatif etki (MTT metodu ile) ve apoptoz (Flow sitometri yöntemi ile) ile ilişkili olup olmadığı ile ilgili çalışmalarında, bu bakteri türünün apoptozu indüklediği ve kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Nami ve diğerleri, 2014). 2007 yılında yapılan bir çalışmada insan prostat kanser hücre hatlarına (LNCaP, PC-3 ve DU145) *Matricaria chamomilla* bitkisinin su (2000 µg/mL) ve metanol ekstraktı (200 µg/mL) muamele edilmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bitkinin her iki ekstraktının tüm hücrelere apoptotik etkisi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada bitkinin su ekstraktı LNCaP hücreleri üzerine yüksek apoptotik etki (3,1- zenginleştirme faktörü) göstermiştir (Srisvasta ve Gupta, 2007). HeLa kanser hücreleri üzerine vajinal laktobasillerin apoptotik etkilerinin Elisa kit yöntemi ile yapılan bir çalışmanın bulunmaması çalışmamızın özgünlüğünü oluşturmaktadır. Çalışmamızda ise laktik asit bakterilerinin apoptotik etkileri Cell Death Detection ELISA^{Plus} kiti kullanılarak belirlenmiştir. Laktik asit bakteri örnekleri ile muamele edilen kanser hücreleri 24 saat

inkübasyon esnasında anti-histon antikoru nükleozomların histon bileşiklerine bağlanmış ve immünokompleks oluşmuştur. Anti-DNA-POD ise nükleozomların DNA'ları ile reaksiyona girmiştir. İmmünokompleksteki POD aracılığı ile de nükleozomların miktarı belirlenmiştir. Apoptotik etki, nükleozomların miktarı ile orantılı olup çıkan sonuç zenginleştirme faktörü olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç, bakteri suşları arasında (H14, G10, R2 ve H15) kanser hücresi üzerine apoptotik etki 1,23- ve 4,89- (zenginleştirme faktörü) değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Suşlar arasında en yüksek apoptotik etkiyi *L. gasseri* R2 bakteri canlı hücresi 4,89- zenginleştirme faktörü olarak göstermiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu apoptotik etki anlamlı olmaktadır. En düşük apoptotik etkiye sahip suş ise 1,23- zenginleştirme faktörü ile *L. gasseri* G10 suşu olmuştur. Birçok antikanser ilacı, apoptozu indüklemesine bağlı olarak gösterdiği etki ile kullanılmaktadır. Choi ve diğerleri (2006), bu amaçtan yola çıkarak *Lactobacillus* cinsine ait türlerin farklı suşlarının kolon kanser hücre hatları (HT-29) üzerine apoptotik etkisinin değerlendirmişlerdir. *L. acidophilus* 606 (10 mg/ml) tan izole edilen polisakkaritin, HT-29 kanser hücreleri ile 72 saat inkübasyon sonunda kanser hücrelerinin ölümünün gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bu hücre ölümünün nekrozdan daha ziyade apoptoz aracılığı ile gerçekleştiğini ve nükleer DNA fragmentasyonu sonuçlandığını bulmuşlardır. Elde ettikleri bu sonuçlar ile ilk kez, laktobasillerden elde edilen EPS'lerin kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *L. gasseri* R2, S1, H10, H15 ve G10 suşlarından elde edilen EPS'lerin 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda HeLa hücrelerine apoptotik etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara göre EPS'lerin artan konsantrasyonlarında, kanser hücresi üzerine apoptotik etkinin arttığı bulunmuştur. 400 µg/mL konsantrasyon, apoptotik etkinin yüksek bulunduğu konsantrasyondur. *L. gasseri* G10 suşu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında suşlar arasında yüksek apoptotik etkiye (1,45- zenginleştirme faktörü) sahiptir ($p < 0,05$). İkinci yüksek apoptotik etki, *L. gasseri* R2 suşunda 1,42- zenginleştirme faktörü olarak hesaplanmıştır. En düşük apoptotik etki ise *L. gasseri* H15 suşunda görülmüştür (1,06- zenginleştirme faktörü). EPS'lerin antiproliferatif etkileri ile apoptotik etkileri arasında korelasyon bulunamamıştır ($p > 0,05$). Nami ve diğerleri 2014 yılında, sağlıklı insan vajinasından izole edilen *L. acidophilus* 36YL bakteri türünün HeLa, MCF-7 ve HT-29 kanser hücreleri üzerine antiproliferatif ve apoptotik etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda üç kanser hücre hatları antikanser etki göstermiş; bu etkiyi apoptozu indüklenmesi ve sitotoksik aktivite ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada DAPI boyası ile apoptotik hücreler morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Apoptoza uğrayan hücrelerin

küçüldüğü, apoptotik cisimciklerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, kültürlerin ve suşların ürettiği EPS'lerin HeLa hücresi üzerine apoptotik etki, hücre zarındaki bozulmalar göz önünde bulundurularak morfolojik olarak değerlendirilmiş ve % apoptotik indeksleri hesaplanmıştır. Morfolojik değerlendirme floresan mikroskopu aracılığı ile Hoechst 33342 boyası ile belirlenmiştir. Bakteri kültürlerin ve suşların ürettiği EPS'lerin muamele olan kanser hücrelerinde hem nekroz hem de apoptoz ölüm çeşitleri görülmüştür. Apoptoza uğrayan hücrelerde hücre zar yapısının değiştiği ve bozulduğu bununla birlikte hücrenin küçüldüğü gözlemlenmiştir. Çalışmada en yüksek % apoptotik indeksi *L. gasseri* H15 suşunun pelleti % 59 oranında göstermiştir. İkinci olarak yüksek apoptotik indeksine *L. gasseri* G10 suşu (% 57) sahiptir. Elisa yöntemi kullanılarak, zenginleştirme faktörü baz alınarak, kit aracılığı ile değerlendirilen laktik asit bakteri türlerinin canlı hücrelerinin HeLa hücresi üzerine apoptotik etkisi ile apoptotik indeksi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Suşların ürettiği EPS'lerin (400 µg/mL) apoptotik indeksleri % 42 - % 25,74 oranları arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek % apoptotik indeks (% 42) ise S1 suşunda görülmüştür. En düşük apoptotik indeks ise *L. gasseri* R2 suşunda (% 25,74) tespit edilmiştir. Elisa yöntemi ile değerlendirilen EPS'lerin apoptotik etkileri ile apoptotik indeksleri arasında ilişki bulunamamıştır.

Birçok genetik ve biyokimyasal çalışmalar hücre ölümünün apoptotik fenotipinin ortaya çıkmasında kaspaz aktivasyonu temel oluşturmaktadır. Çoğu kaspaz çeşidi DNA yapısı, onarılması ve replikasyon düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Kumar, Radha and Swarup, 2010). 2011 yılında Fichorova, Yamamoto, Delaney, Onderdonk ve Donce, *L. acidophilus* ve *L. crispatus* türlerinin insan vajinal epitelyum hücreleri (Vk2/E6E7) üzerine kaspaz 3 aktivitesinin olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, yüksek antiproliferatif etkiye sahip bakteri kültürleri ve yüksek EPS üretimine sahip kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin, HeLa hücrelerine uygulanan kaspaz 3 ve kaspaz 9 etkisi, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Colorimetric Assay kit ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Çalışmamız sonunda *L. gasseri* G10 ve H14 suşlarının uygulandığı HeLa hücrelerine kaspaz 9 aktivitesine sahip olmadığı görülmüştür. Bakterilerin canlı hücreleri arasında kanser hücresi üzerine yüksek apoptotik etki (4,89- zenginleştirme faktörü) gösteren *L. gasseri* R2 suşunun, aynı zamanda çalışılan *L. gasseri* H15, H14 ve G10 suşları arasında kontrol grubu (OD değeri 0,06) ile karşılaştırıldığında yüksek kaspaz 9 aktivitesine (OD değeri 0,07) sahip olduğu değerlendirilmiştir ($p < 0,05$). Düşük apoptotik etkiye (1,23- zenginleştirme faktörü) sahip

olan G10 canlı bakteri hücrelerinin ise kontrol grubu (OD değeri 0,06) ile karşılaştırıldığında ise HeLa hücreleri üzerine kaspaz 9 aktivitesi göstermediği belirlenmiştir ($p<0,05$). Sonuçlardan elde edilen bir diğer veri ise *L. gasseri* R2 ve H15 suşlarının canlı hücrelerinin, HeLa hücrelerine kaspaz 3 aktivitesinin olmadığıdır. *L. gasseri* H14 suşunun kaspaz 3 aktivitesi, çalışılan suşlar arasında yüksek bulunmuştur (OD değeri 0,07). Canlı bakteri kültürlerinin kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesini değerlendirdikten sonra kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin kanser hücreleri üzerine kaspaz aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmamız sonunda yüksek EPS üretimine sahip bakteri kültürlerinden elde edilen EPS'lerin kontrol grubu (OD değeri 0,06) karşılaştırıldığında, *L. gasseri* H15 EPS'nin yüksek kaspaz 3 aktiviteye (OD değeri 0,07) sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Motevasali ve diğerleri (2013), vajen kaynaklı *L. crispatus* strain SJ-3C-US ve *L. gasseri* ATCC 33323 suşlarının HeLa kanser hücresi üzerine antitümör etkisini belirlemede kaspaz 3 aktivitesini değerlendirmişlerdir. Bu sonuca göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki suşunda kaspaz 3 aktivitesine (OD değeri 1) sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda aynı türe ait suşların farklı kaspaz aktivitelerinin olduğu bulunmuştur. Kaspaz 3 aktivitesi göstermeyen bakteri suşunun (H15) yüksek kaspaz 9 aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin apoptotik etkisi kaspaz aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir. Apoptotik etki ile kaspaz aktiviteleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).

Apoptoz, membran ölüm reseptörleri yolağı veya mitokondriyal yolak ile gerçekleşmektedir. Kaspazlar, gerek ölüm reseptörleri yolağında gerekse de mitokondriyal yolakta görev almaktadırlar. Canlı bakteri kültürleri ve kültür suşlarının ürettiği EPS'lerin HeLa hücre hattı üzerine Gerçek Zamanlı PZR metodu ile gen ifadeleri belirlenmiştir. Apoptoz yolağında yer alan apoptotik genler (kaspaz 3 ve kaspaz 9) çalışmada kullanılmıştır. Sharifi, Hoda ve Noor, 2010 yılında insan sinir hücreleri (PC12) üzerinde lipopolisakkaritin (LPS) sitotoksitesini ve apoptozun etkisini çalışmışlardır. Apoptozda rol oynayan Bax ve Bcl-2, kaspaz 3 protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacı ile çalışmada, 10, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki LPS'yi PC12 hücreleri ile muamele etmişlerdir. 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda LPS ile muamele edilen PC12 hücrelerinde kontrol grubuna göre Bax protein ekspresyon seviyelerinde artış görülmüş; Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde gözle görülür derecede değişiklik gözlenmemiştir. Prokaspaz 3 ekspresyon seviyesinde ise azalma gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonucunda LPS'nin PC12 hücre ölümüne neden olduğunu ve bu hücre ölümünün apoptoz ile

mitokondriyal yolak aracılığı ile gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. *Rheum emodi* bitki türünden elde edilen emodin maddesinin HeLa üzerine apoptotik etkisi gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak kaspaz 9 ve kaspaz 3 mRNA seviyeleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda her iki gen ifade düzeylerinde artış olduğu bulunmuştur. Bu sonucun da emodin maddesinin HeLa hücreleri üzerine antitümör aktivitesi ile ilişkili olduğunu değerlendirmişlerdir (Yaoxian ve diğerleri, 2013). Motevaseli ve diğerleri (2013) vajinal probiyotik mikroorganizmaların (*L. crispatus* strain SJ-3C-US ve *L. gasseri* ATCC 33323 suşlarının) HeLa kanser hücrelerinde kaspaz 3 mRNA seviyelerini araştırmışlardır. Amplifikasyonlar, 20 µL hacimde reaksiyona alınmıştır. Elde ettikleri sonuçta kaspaz 3 gen ifade düzeyinde artış gözlemlenmiştir. Çalışmamız sonunda canlı bakteri kültürleri uygulanan HeLa hücrelerinde (amplifikasyonlar 10 µL hacimde reaksiyona alınmıştır), bakteri kültürleri ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerine oranla kaspaz 3 mRNA'sında artış olmadığı bulundu. Kültür suşlarından elde edilen EPS örnekleri uygulanan HeLa hücrelerinde EPS ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerine oranla G10, R2, S1 ve H15 kültür suşlarından elde edilen EPS'lerin kaspaz 3 gen ifade düzeyinin arttığı belirlendi. EPS'ler arasında G10 EPS'sinin diğer EPS'lere göre daha yüksek kaspaz 3 gen ifade düzeyine sahip olduğu tespit edildi. Canlı bakteri kültür suşları ile kültür suşlarından elde edilen EPS'ler karşılaştırıldığında EPS'lerin daha etkin olduğu ve yüksek kaspaz 3 gen ifade düzeyi gösterdiği değerlendirilmiştir. Örnekler arasında G10 canlı bakteri kültüründe kaspaz 9 mRNA gen ifade düzeylerinin arttığı bulundu. Diğer canlı bakteri kültürlerinin kanser hücreleri üzerinde gen ifadesinin olmadığı tespit edildi. Canlı bakteri kültürleri ile EPS arasında karşılaştırma yapıldığında kaspaz 3 gen ifade düzeyi, kültür suşlarının ürettiği EPS'lerde daha yüksek olup; kaspaz 9 gen ifade düzeyi canlı bakteri kültürlerinde ön planda olduğu değerlendirilmiştir. Çalışmada, hem bakteri canlı hücreleri hem de yüksek EPS üretim seviyelerine sahip suşlardan elde edilen EPS'lerin kullanıldığı hacim miktarı artırılarak, örneklerin HeLa kanser hücreleri üzerine kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen ifade düzeylerinin artabileceği değerlendirilmiştir. Protein seviyelerini takiben yapılan Elisa yöntemi ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen ifade seviyeleri kısmi olarak paralellik göstermiştir. Protein düzeyinde kaspaz aktivitesi ile ön plana çıkan hem canlı bakteri kültürü hem de kültür suşlarından elde edilen EPS'nin gen ifade düzeyinde kanser hücresi üzerine etkili olmadığı görülmüştür. Apoptotik bir hücrede apoptotik genlerin seviyelerinde artış gösterilmesi antiapoptotik genlerin ise seviyelerinde azalış göstermesi beklenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda apoptoz yolağında önemli rol alan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aracılığı

ile apoptozun gerçekleşmediği; başka yolak ya da genler aracılığı ile apoptozun gerçekleşebileceği değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmaları sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuç ve öneriler oluşmuştur. Bunlar;

1) Vajinal florada dominant olarak *L. gasseri* türünün yüksek oranda antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Yine bu çalışma sonuçlarında önemli olacak bir diğer sonuç ise, yüksek EPS üretim kapasitesine sahip suşların (G10, H15 suşları gibi) yüksek antiproliferatif etki göstermesidir. Ayrıca canlı hücrelerin EPS uygulamasına göre daha yüksek antiproliferatif etki göstermesi de canlı bakterinin ürettiği ve saldıdığı metabolitler ile ilgili olduğu düşünülmektedir. G10 ve H15 suşların adezyon indeksinin de yüksek olması, kanser hücrelerine tutunma yeteneğinin de antiproliferatif etkide önemli oranda rol oynadığının göstergesi olmuştur.

2) Farklı suşlardan elde edilen EPS'lerin serviks kanser hücresinde antiproliferatif etkisi bulunmuştur. Aynı tür olmasına rağmen farklı antiproliferatif etki göstermesi ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak antiproliferatif etkinin de artış göstermesi özellikle EPS'nin de antikanser ajanı olarak kullanımını gündeme getirecektir. Her ne kadar sonuçlarımızda EPS, canlı hücreye göre daha düşük antiproliferatif etki gösterse de artan konsantrasyona göre de etkisinin artıyor olması ile; uygulamada, EPS konsantrasyonunun arttırılmasına bağlı olarak yüksek antiproliferatif etkiyi bulmak mümkün olabilecektir. Ayrıca, aynı türün farklı suşlarından elde edilen EPS'lerin farklı antiproliferatif etki göstermelerinin de farklı suşların farklı EPS üretme kapasiteleri ve farklı monomer kompozisyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre, EPS'nin antitümör ajanı olarak kullanılabilmesi için öncelikle en etkili EPS'nin, kanser hücrelerindeki etkileri bakımından taranarak seçilmesinin gerekliliği ispatlanmıştır. Buna göre her EPS'nin aynı sonucu vermeyeceği, en iyi etkiye sahip ve yüksek dozda uygulanacak EPS'nin de önemli bir antikanser etkeni olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

3) Klinik uygulamalarda canlı hücre kullanımının bazı dezavantajları (canlılığının stabilizelesinin sağlanamaması, doz ayarlama zorluğu, ticari preparatların da raf ömrünün kısa olması gibi) düşünüldüğünden ve EPS'nin de canlı hücre kültürü gibi antiproliferatif

etki göstermesi, probiyotik bakterilerden elde edilen EPS'yi probiyotiklere alternatif olmasını sağlayacaktır.

4) Antiproliferatif etki ile apoptoz arasında ilişki bulunamamıştır. Buna göre hücre ölümünün bir kısmının hücrenin nekroza girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5) EPS ve canlı hücre uygulanan HeLa hücrelerinde kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün gen ifade düzeyleri farklılık göstermiştir. Bu sonuç, EPS ve canlı bakterinin kanser hücrelerini farklı yollardan apoptoza götürdüğünü göstermektedir.

6) EPS uygulanmış HeLa hücrelerinde kaspaz 3 gen ifade düzeyinde (özellikle G10 suşundan elde edilen EPS) önemli artış gözlenirken, canlı hücre uygulamalarında kaspaz 3 gen ifade düzeyinde artış gözlenmemiştir. Kaspaz 9 için ise, sadece G10 bakteri kültürü uygulanmış HeLa hücrelerinin gen ifade düzeyinde önemli bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre kaspaz 9 artışı görülmeyen sonuçlarda, apoptozu başlatıcı kaspaz 9'un aktivasyonu ile değil de kanser hücrelerinin apoptoza gitmesinde önemli rolü olan hücre yüzeyindeki hücre ölüm reseptörleri ile etkileşime bağlı hücre ölümü olabileceği düşünülmektedir. Kaspaz 3 aktivasyonunun görülmemesi de kaspaz 3 aktivasyonundan ziyade diğer efektör kaspaz 6 ve 7'nin aktivasyonu ile apoptozun olabileceğini düşündürmektedir. Bir diğer öngörü ise, birçok ilaç denemelerinde p53 seviyesinin artışına bağlı apoptozun görülmüş olması, p53 apoptoz proteininin artışı ve ilgili p53 geninin ifade düzeyine bakılmasının anlamlı olabileceğidir.

7) Tüm çalışmalarda *L. gasseri* G10 suşu (canlı hücre kültürü ve EPS uygulamalarının her ikisinde de) önemli bir şekilde öne çıkmıştır. Şöyle ki; bu suş yüksek EPS üretimine, yüksek adezyon yüzdesine ve indeksine, yüksek antiproliferatif etkiye, yüksek apoptotik etkiye sahip olmakla birlikte; kaspaz 3 ve 9' un gen ifade düzeyinde artış göstermiştir. *L. gasseri* G10 suşu, serviks kanserinde antikanser etkeni olarak kullanılmak üzere geliştirilebilecek potansiyel bir suş olarak önerilebilir. Ticari preparatların geliştirilebilmesi; daha etkin ve stabil sonuç elde edilebilmesi için ilave deneysel çalışmalar yapılmalı ve bu çalışmalar ayrıca *in vivo* deney modeli ile de desteklenmelidir.

Vajen kaynaklı muhtemel probiyotik bakteriler ve bakterilerin EPS'lerin serviks kanseri üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte özellikle EPS'nin serviks

kanserindeki etkisi ile vajinal kaynaklı canlı bakteri ve bu bakterilerin EPS'lerinin mukayese edildiği çalışma mevcut değildir. Türkiye'de yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle, çalışma sonuçları bu alanda yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

Çalışmamızda probiyotik olarak kullanıma uygun olarak kullanılan suşların kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemesi ve antikanser ajanlarda önemli mekanizmaların ortaya konulması, bu suşların klinik preparatlarda kullanılmasını önemli kılacaktır. Ayrıca, kadın ürogenital sistem enfeksiyonlarında, koruyucu ve tedavi amaçlı olarak, vajen kaynaklı laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı ile ilgili çalışmalara etkinliğine olanak sağlayabilecektir. Çalışmamızda kullanılan EPS'ler ile canlı bakteri kullanımı yerine depolama ve uygulama açısından daha uygun olması nedeniyle, serviks kanserinden koruyucu veya tedavi edici destek materyalleri geliştirilebilir. Hem probiyotik kültürlerin hem de probiyotik kaynaklı EPS'nin etki mekanizması tam olarak ortaya konması, ilaç ve destek materyali olarak serviks hastalıklarında kullanımı ve etkinliğinin artmasını mümkün kılacaktır. Çalışmada kullanılan bakterilerin kültür suşlarının ve kültür suşlarından elde edilen EPS'ler, hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine doğal biyolojik ortamı destekleyici bir ürün olarak kullanılabilir. Vajen florasında dengeyi bozup patojen mikroorganizmaların çoğalmasına uygun ortamın oluşması probiyotik desteği ile dengenin kurulup tarafından vajende oluşabilecek enfeksiyonların önüne geçilmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adebayo, B. C. and Onilude, A. A. (2008). Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some Nigerian fermented foods for EPS production. *World Applied Sciences Journal*, 4(5), 741-747.
- Ades, T. and Yarbro, H. C. (2000). Alternative and complementary therapies in cancer management. Yarbro, H. C., Frogge, M. H., Goodman, M., Cancer Nursing Principles and Practice 5th edition, *Jones & Bartlett Publishers*, 617-28.
- Akbulut, H. ve Akbulut, K. G. (2005). Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Antip Yayınları*, Sayfa 23.
- Akhan, S. E. (2007). Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri. *Ankem Dergisi*, 21 (Ek 2), 96-98.
- Altunkaynak, B. Z. ve Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93 -104.
- Antonio, M. A. D., Hawes, S. E. and Hillier, S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal of Infectious Diseases*. 180(6), 1950-1956.
- Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C. and Bisignano, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology*, 6(1), 8–13.
- Arıca, S., Nazlıcan, E., Özer, C., Benk Şilfeler, D., Arıca, V., Özgür, T., ve Özaydın, Ü. (2011). Hatay ilinde 2008 yılı kanser vakaları sıklığı ve dağılımı. *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*, 2(2), 192-195.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A. and Faro, S. (2001). Defense factors of vaginal *Lactobacilli*. *American Journal Obstetrics Gynecology*, 185(2), 375-379.
- Arvas, M. (2007). Human papilloma virüs enfeksiyonu ve aşısı. *Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 59, 25-31.
- Atagün, G., Eren, Z. ve Gürkanlı, İ. (2011). Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 49-53.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F. and Servin, A. L. (2006). Vaginal *Lactobacillus* isolates inhibit uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 257(1), 132-8.

- Audy, J., Labrie, S., Roy, D. and Lapointe, G., (2010). Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. *Microbiology*, 156 (3), 653–664.
- Baer, A. and Ryba, I. (1992). Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples. *International Dairy Journal*, 2(5), 299-310.
- Balcı, O. ve Çapar, M. (2005). Vajinal enfeksiyonlar. *Türk Jinekoloji Ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 2(5), 14-20.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R. and Servin, A. L. (1993). Adhesion of human Bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4121-4128.
- Bolognani, F., Rumney, C. J. and Rowland, I. R. (1997). Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, 35(6), 535-545.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, Wertheim-van Dillen, P. M. and Van der Noordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal Of Clinical Microbiology*, 28(3), 495-503.
- Boris, S. and Barbes, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*, 2(5), 543-546.
- Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., Lara, F., Espin, E., Naval, J., Guarner, F. and Malagelada, J. R. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut*, 51(5), 659-664.
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R. and Cone, R. A. (1999). Acid production by vaginal flora *in vitro* is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection Immunity*. 67(10), 5170–5175.
- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J. and Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, 16(9), 1809-1813.
- Brannon Peppas, L. (1993). Novel vaginal drug release applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1), 169-177.
- Burns, A. J. and Rowland, I. R. (2000). Anticarcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(1), 13-24.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Oberg, C. J. and Welker, D. L. (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 433-439.
- Cabadak, H. (2008). Hücre Siklusu Ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 51 – 61.

- Calvino Fernandez, M. and Parra Cid, T. (2010). *H. pylori* and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 102(1), 41-50.
- Can, Ö. P. 2007. Probiyotik mikroorganizmaların yararları. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*. 6, 194-196.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1-2), 113-130.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 3914-3919.
- Challouf, R., Trabelsi, L., Dhieb, R. B., Abed, O. E., Yahia, A., Ghozzi, K., Ammar, J. B., Omran, H. and Ouada, H. B. (2011). Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by Cyanobacterium *Arthospira platensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 831-838.
- Chabner, B. and Longo, D. L. (2011). Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*, 125-153.
- Chabot, S., Yu, H. L., de Leseleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M. and Daniel, O. (2001). Exopoly- saccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6, and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Le Lait Dairy Science and Technology*, 81(6), 683–697.
- Chan, R. C., Reid, G., Irvin, R. T., Bruce, A. W. and Costerton J. W. (1985). Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infection and Immunity*, 47(1), 84–89.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. (1997). The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection. *Microbiology Therapeutic Volume*. 26, 59-96.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. (1999). Development of agar overlay disc diffusion method for the antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. *The Egyptian Journal of Dairy Science*, 27(1), 71-82.
- Chen, C. C, Lin W. C., Kong, M. S., Shi, H. N., Walker, W. A., Lin, C. Y., Huang, C. T., Lin, Y. C., Jung, S. M. and Lin, T. Y. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *The British Journal of Nutrition*, 107(11), 1623-1634.

- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. and Kim, S. H. (2006). Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, 42(5), 452-458.
- Collins, J. K., Thornton, G. and O'Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, 8(5-6), 487-490.
- Coşkun, T. (2006). Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler. **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi**, 49, 128-148.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. **The New England Journal Of Medicine**, 358(5), 502-511.
- Çakır, İ. (2003). GDM 310 Gıda mikrobiyolojisi. **Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları**, Ankara, 55-76.
- Çolakoğulları, M. (2007). BCL-2 proteininin apoptoz yolları üzerine etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, **Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Bursa.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, 116(2), 205-19.
- Dembele, T., Obdrzalek, V. and Votava, M. (1998). Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. **Zentralblatt für Bakteriologie**, 288(3), 395-401.
- Di Leva, G., Briskin, D. and Croce, C. M. (2012). MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 117(2), 202–216.
- Doğan, M. (2012). Probiyotik Bakterilerin Gastrointestinal Sistemdeki Etki Mekanizması. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 7(1), 21-27.
- Doll, R. and Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal Of The National Cancer Institute**, 66(6), 1191-1308.
- Donnarumma, G., Molinaro, A., Cimini, D., De Castro, C., Valli, V., De Gregorio, V., De Rosa, M. and Schiraldi, C. (2014). *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. **BMC Microbiology**. 14(137), 1-12.
- Dover, S. E., Aroutcheva, A. A., Faro, S. and Chikindas, M. L. (2008). Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**. 3(4), 219-230.
- Dönmez, M., Cankurtaran, M., Diken, F. ve Günendi, P. (2010, 21-22 Ekim). Gıda beslenmesi ve kanser ilişkisi. **Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu**, Düzce.

- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K. and Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research*. 134(5), 664-71.
- Duary, R. K., Bhausahab, M. A., Batish, V. K. and Grover, S. (2012). Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Lp91 in colitis mouse model. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4765-4775.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Pebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Duenas Gonzalez, A. D., Lizano, M., Landelaria, M., Letina, L., Arce, C. and Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer: an overview and therapeutic perspectives. *Biomed Central*, 4(38), 1-24.
- Eren, H. (2007). Serviksin prekanseröz lezyonlarındaki human papilloma virus prevalans. Uzmanlık Tezi, *S.B. Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği*, İstanbul.
- Ernst, E. and Cassileth, B. (1998). The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: A systematic review. *Cancer*, 83(4), 777-782.
- Eryılmaz Turhan, Feriba., (2011). Vajinal sekresyondan izole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı suşların potansiyel probiyotik özelliklerin belirlenmesi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara.
- Evan, G. and Littlewood, T. A. (1998). Matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1321
- Evan, G. I. and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348.
- Fanidi, A, Harrington, E. A. and Evan, G. I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogene. *Nature*, 8(359), 554-556.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-4767.
- Fışkın, K., (2002). Genetik ve kanser, Genetik ve davranış. Genetik Kavramlar, *Palme*, Ankara, 635-651.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Ghoneum, M. and Gimzewski, J. (2014). Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *International Journal Of Oncology*. 44(3), 830-7.

- Gismondo, M. R., Drago, L. and Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287-292.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Science*, 32(1), 37-43.
- Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E. ve Ekmekçi, A. (2011). İnsan servikal kanser HeLa hücrelerinde vinorelbin'in apoptotik etkisi. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(1), 05-14.
- Grasso, S., Carrasco Garcia, E., Rocamora Reverte, L., Gomez Martinez, A., J. A., Ferragut, Menendez Gutierrez, M. P., Mayor Lopez, L., Tristante, E., Martinez Lacaci, I., Garcia Morales, P. and Saceda, M. (2012). Cell Death and Cancer, Novel Therapeutic Strategies. *Apoptosis and Medicine*, 67-110.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 36(2), 120-130.
- Güner, H. ve Taşkıran, Ç. (2007). Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papilloma virüsü. *Türk Jinekoloji Ve Obstetrik Derneği*, 4(1), 11-19.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.*, 100(1), 57-70.
- Hanna, N. F., Taylor Robinson, D., Kalodiki Karamanoli, M., Harris, J. R. and McFadyen, I. R. (1985). The relation between vaginal pH and the microbiological status in vaginitis. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 92(12), 1267-71.
- Hoesl, C. E. and Altwein, J. E. (2005). The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *European Urology*, 47(3), 288-96.
- Hong, H. A., Huang, J.-M., Khaneja, R., Hiep L. V., Urdaci M. C. and Cutting S. M. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 510-520.
- Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T. and Kaminogawa, S. (1997). Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis*, M 101-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 61(2), 312-316.
- Haroun, B. M., Refaat, B. M., El- Menoufy, H. A., Amin, H. A. and El-Waseif, A.A. (2013). Structure Analysis and Antitumor Activity of the Exopolysaccharide from Probiotic *Lactobacillus plantarum* NRRL B- 4496 *In vitro* and *In vivo*. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(1), 425-434.
- Hughenoltz, J. and Kleerebezem, M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and result of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 492-497.

- Iqbal, M. Z., Qadir, M. I., Hussain, Janbaz, K. H., Khan, Y. H. and Ahmad, B. (2014). Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 405-415.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 10932-10937.
- İnternet:'Servikste tümör dokusu' <http://www.nlm.nih.gov> (2014).
- İnternet:'Serviks kanseri oluşum aşamaları' <https://cancercervical.wikispaces.com> (2014).
- İnternet:'HeLa (ATCC® CCL-2™) kanser hücre hattının mikroskopik görüntüsü' <http://www.lgcstandards-atcc.org> (2014).
- Jackisch, C., Hahm, H. A., Tombal, B., McCloskey, D., Butash, K., Davidson, N. E. and Denmeade, S. R. (2000). Delayed micromolar elevation in intracellular calcium precedes induction of apoptosis in thapsigargin-treated breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 6(7), 2844-2850.
- Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K. and Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunology Medicinal Microbiology*, 48(1), 75-83.
- Kagnoff, M. F. and Eckmann, L. (1997). Epithelial Cells as Sensors for Microbial Infection. Perspectives Series: Host/Pathogen Interactions. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(1), 6-10.
- Kanbur, A. ve Çapık, C. (2011). Servikal kanserden korunma, erken tanı-tarama yöntemleri ve Ebe/Hemşirenin rolü. *Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi*, 61-72.
- Kao, Y. T., Liu, Y. S. and Shyu, Y. T. (2007). Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 40(1), 71-79.
- Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmacology*, 15(1), 1-9.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-57.
- Kılıç, E., (2003). İnsan vajinasından izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bazı probiyotik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 45.

- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S. and Kim, S. H. (2010). Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51(12), 123-130.
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E. and Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 167(2), 185-189.
- Kishk, Y. F. M. and Al-Sayed, H. M. A. (2007). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT Food Science & Technology*, 40(2), 270-277.
- Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W. and Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *Journal of Biotechnology*, 98(2-3), 199-213.
- Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 232-237.
- Knezevic, A., Stepanovic, S., Cupic, M., Jevtovic, D., Ranin, J. and Jovanovic, T. (2005). Reduced quantity and hydrogen-peroxide production of vaginal lactobacilli in HIV positive women. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(9), 521-3.
- Kodali, V. P. and Sen, R. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology Journal*, 3(2), 245-51.
- Komaki, R., Paulus, R., Ettinger, D. S., Videtic, G. M. M., Bradley, J. D., Glisson, B. S., Langer, C. J., Sause, W. T., Curran, W. J. and Choy, H. (2012). Phase II study of accelerated high-dose radiotherapy with concurrent chemotherapy for patients with limited small-cell lung cancer: radiation therapy oncology group protocol 0239. *International Journal of Radiation Oncology*, 83(4), 531-536.
- Koontongkaew, S. (2013). The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*, 4(1), 66-83.
- Kopnin, B. P. (2000). Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry*, 65(1), 2-27.
- Kumar, Y., Radha, V. and Swarup, G. (2010). Interaction with Sug1 enables IpaF ubiquitination leading to caspase 8 activation and cell death. *Biochemical Journal*, 427(1), 91-104.
- Kültürsay, H. ve Kayıkçıoğlu, M. (2000). Apoptozis ve Kardiyovasküler Hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 4, 323-329.
- Lahtz, C. and Pfeifer, G. P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(1), 51-58.

- Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial 537 adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 695-701.
- Leach, A. P. (1998). Apoptosis molecular mechanism for physiological cell death in health and disease. *Clinical Laboratory Science*, 11(6), 346-349.
- Leigh, J. A. and Walker, C. G. (1994). Exopolysaccharides of Rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics*, 10(2), 63–67.
- Lepargnuer, J. P. and Rousseau, V. (2002). Protective Role of Doderlien Flora. *The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 31(5), 484-485.
- Li, W., Ji, J., Tang, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M. and Dong, M. (2014). Characterization of an antiproliferative exopolysaccharide (LHEPS-2) from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 105, 334–340.
- Liu, C. T., Chu, F. J., Chou, C. C. and Yu, R. C. (2011). Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(2), 157-162.
- Liu, Z. H., Huang, M. J., Zhang, X. W., Wang, L., Huang, N. O., Peng, H., Lan, P., Peng, J. S., Yang, Z., Xia, Y., Liu, W. J., Yang, J., Qin, H. L. and Wang, J. P. (2013). The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97 (1), 117-126.
- Ljungh, A. and Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 73-90.
- Lopez, P., Monteserin, D. C., Gueimondea, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Suárez, A. and Ruas-Madiedo, P. (2012). Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro response upon *human cells*. *Food Research International*, 46(1), 99-107.
- Madsen, K. (2006). Probiotics and the immune response. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 232-234.
- Marshall, V. M. and Rawson, H. L. (1999). Effects of Exopolysaccharide producing strains of thermophilic lactic acid bacteria and texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science Technology*, 34(2), 137-143.
- McGroarty, J. A., (1993). Probiotic use of *Lactobacilli* in the human female urogenital tract. *Fems Immunology and Medicinal Microbiology*, 6(4), 251-264.
- Mcphie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A. and Neve, R. L. (2003). DNA synthesis and neuronal

- apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 23(17), 6914–6927.
- Melis, G. B., Ibba, M. T., Steri, B., Kotsonis, P., Matta, V. and Paoletti, A. M. (2000). Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment. *Minerva Gynecology*, 52(4), 111–121.
- Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293–299.
- Molassiotis, A., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, J. A., Panteli, V., Margulies, A., Browall, M., Magri, M., Selvekerova, S., Madsen, E., Milovics, L., Bruyns, I., Gudmundsdottir, G., Hummerston, S., Ahmad, A. M., Platin, N., Kearney, N. and Patiraki, E. (2005). Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Annals of Oncology*, 16(4), 655–663.
- Motevaseli, E., Shirzad, M., Akrami, S. M., Mousavi, A. S., Mirsalehian, A., Modarressi, M. H. (2013). Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *Journal of Medicinal Microbiology*, 62(7), 1065-72.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T. and Mori, Y. (1994). Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 17(8), 1012-1017
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens and R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(1), 13-126.
- Nair, S. and Varalakshmi, K. N. (2011). Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts on HeLa cell line. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(3), 138-142.
- Nakajima, H., Toba, T. and Toyoda, S. (1995). Enhancement of antigen-specific antibody production by extracellular slime products from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495 in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 25(2), 153-8.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R. and Khosroushahi, A. Y. (2014). Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells. *Anaerobe*, 28, 29-36.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R. and Khosroushahi, A. Y. (2014). A newly isolated probiotic *Enterococcus faecalis* strain from vagina microbiota enhances apoptosis of human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 498-508.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757-2765.

- Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I. (2012). Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002-14015.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F. and Boerkoel, C. F., (2005). Tibbi genetik. *Güneş Yayınevi*, Türkiye, 311-312.
- Ocana, V. S., de Ruiz Holgado, A. P. and Nader-Macias, M. E. (1999). Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5631–5635.
- Olaoye, O. A. and Ntuen, I. G. (2011). Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives. *International Research Journal of Biotechnology*, 2(1), 33-46.
- Osset, J., Bartolomé, R. M., García, E. and Andreu, A. (2001). Assessment of the Capacity of *Lactobacillus* to Inhibit the Growth of Uropathogens and Block Their Adhesion to Vaginal Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(3), 485-91.
- Otero, M. C. and Nader-Macias, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*, 96(1-2), 35-46.
- Otero, M. C. and Nader-Macias, M. E. (2007). *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 749-757.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Seppo, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9, 43-52.
- Ouwehand, A. C., Seppo, S., Tölkö, S., Robert, P., Ovaska, J. and Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: New model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(1), 184-186
- 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.
- Owen Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W. and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperaturesensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3032–3040.
- Öner, C., (2003). Genetik kavramlar. *Palme Yayınevi*, Türkiye, 635-636.
- Paavonen, J. (1983). Physiology and ecology of the vagina. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum*, 40, 31–35.

- Patel, A. K., Michaud, P., Singhania, R. R., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2010). Polysaccharides from Probiotics: New Developments as Food Additives. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (4), 451–463
- Patel, A. and Prajapat, J. B. (2013). Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1(2), 1-7.
- Pazarbaşı, A. ve Kasap, M. (2003). Kanser genetiği. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*, Adana, 12-38.
- Perdigon, G., Vintini, E., Alvarez, S., Medina, M. and Medici, M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1108-14.
- Pritchard, C. C. and Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60(1), 116-29.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. and Gopal, P. K. (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993-1002.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 2(356), 397-400, 1992.
- Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C. and Badge, R. M. (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques*, 46(4), 277–284.
- Redondo Lopez, V., Cook, R. L. and Sobel, J. D. (1990). Emerging role of Lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(5), 856–872.
- Reid, G. (1996). Probiotics: How microorganisms compete?. *JAMA*, 276(1), 29-30.
- Rönnqvist, P. D., Forsgren-Brusk, U. B. and Grahn-Hakansson, E. E. (2006). Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 85(6), 726-35.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acidbacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163–171.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C. G. and Salminen, S. (2006). Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from “viili” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2355-2358.
- Ruas-Madiedo, P., Moreno, J. A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A. and de los Reyes-Gavilan. (2007). Screening of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus*

- and *Bifidobacterium* Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota. *Applied And Environmental Microbiology*, 73(13), 4385–4388.
- Sharifi, A. M., Hoda, F. E. and Noor, A. M. (2010). Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression. *Toxicology Mechanisms Methods*. 20(6), 316-20.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96–9.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, 107(5), 489-506.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y. K. (1999). Probiotics: How should they be defined?. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 107-110.
- Sankari, S. L., Masthan, K. M., Babu, N. A, Bhattacharjee, T. and Elumalai, M. (2012). Apoptosis in Cancer - An Update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(10), 4873-4878.
- Servin, A. L. and Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-54.
- Shah, N. P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55(11), 46-53.
- Sheikh, M. S., Burns, T. F., Huang, Y., Wu, G. S., Amundson, S., Brooks, K. S., Fornace, A. J. Jr. and el Deiry, W. S. (1998). p53-dependent and-independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Research*, 58(8), 1593–1598.
- Shoji, M., Yukitake, H., Sato, K., Shibata, Y., Naito, M., Aduse-Opoku, J., Abiko, Y., Curtis, M. A. and Nakayama, K. (2013). Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiologyopen*, 2(3), 383-401.
- Sobel, J. D. and Chaim, W. (1996). Vaginal Microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2497–2499.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D., Pandey, A. and Thomaz-Socol, V. (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Soengas, M. S., Alarcon, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W. and Lowe, S. W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53 dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 284(5411), 156–159.
- Somer, A., (2009). Human papillomavirus aşılıarı. *Ankem Dergisi*, 23 (Ek 2), 96-101.

- Srisvastava, J. K. and Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of *chamomile* extract in various human cancer cells. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 55(23), 9470–9478.
- Sutherland, I. W. (1977). Microbial Exopolysaccharide synthesis, In Extracellular Microbiya Polysaccharide. *Journal of the American Chemical Society*, Washington., 40-57.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides. *Trends Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Swapan, K. R., Edward, L. H. and Naren, L. B. (2003). Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Research Reviews*, 42(2), 169-185.
- Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M. A. and Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 20(2), 167-77.
- Tannock, G. W. (2004). A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189–3194.
- Tekin, A., Kaya, E. ve Özbek Yazıcı, S. (2012). Kanserle ilgili alternatif tıp içerikli web sitelerinin içerik analizi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 4(6), 14-34.
- Tekinşen, O. C. and Atasever, M. (1994). Süt ürünleri üretiminde starter kültür. *Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayını*, 150.
- Thompson, E. B., (1994). Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Endocrinology*, 8, 665-73.
- Tomas, J. S. M., Ocana, S. V., Wiese, B. and Nader-Macias E. M., (2003). Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(12), 117-1124.
- Trottier, H. and Franco, E. L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24, 4-15.
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?. *Genes Cell*. 3(11), 697-707.
- Tunail, N., (2009). Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 345-356.
- Türk, M., Kaya, B., Menemen, Y. ve Oğuztüzün, S. 2011. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla L.* species on HeLa cells *in vitro*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4566-4571.

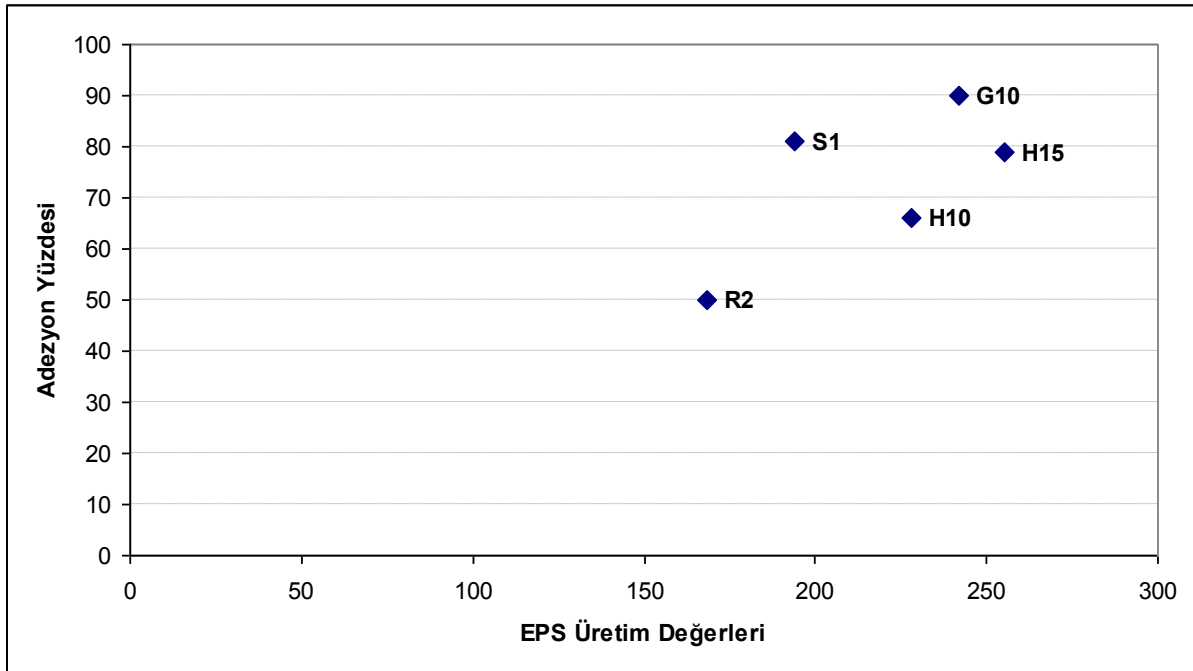
- Ucbek, A., Özünal, Z. G., Uzun, Ö. ve Gepdiremen, A. (2014). Effect of metformin on the human T98G glioblastoma multiforme cell line. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7, 1285-1290.
- Uymaz, B., (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 16(1), 95-104.
- Ünal, E. ve Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu. *Gıda*, 35(4), 297-304.
- Valenta, C., (2005). The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3(57), 1692-1712.
- Vallor, A. C., Antonio, M. A. D., Hawes, S. E. and Hillier, S. L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: Role of hydrogen peroxide production. *The Journal Infectious Diseases*, 184(11), 1431-1436.
- Vasiljevic, T. and Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714– 728.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U. and Molin, G. (2002). Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy swedish women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2746–2749.
- Vermani, K. and Garg, S. (2000). The scope and potential of vaginal drug delivery. *Pharmaceutical Science And Technology Today*, 3(10), 359-364.
- Villarante, K. I., Elegado, F. B., Iwatani, S., Zendo, T., Sonomoto, K. and Guzman, E., (2011). Purification, characterization and *in vitro* cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 975–980.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Walker, N. I., Harnon, B. W., Gobe, G. C. and Kerr, J. F., (1988). Patterns of cell death. *Methods Achievements Experimental Pathology*, 13, 18-54.
- Welman, A. D., Maddox, I. S. and Archer, R. H. (2003). Screening and selection of exopolysaccharide producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1200-6.
- Welman, A. D. and Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306.

- Wolchok, J. D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J. S., Hamid, O., Lebbé, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R. and Hodi, F. S. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical Cancer Research*, 15(23), 7412-7420.
- Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G. and Wu, Xiaoke. (2013). Emodin induces apoptosis of human cervical cancer HeLa cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer Cell International*, 13(71), 1-8.
- Yerlikaya, O., Karagözlü, C., Ender, G. ve Akbulut, N. (2008). Probiyotik Süt Ürünlerinde Ambalajlama. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Yılmaz, M. ve Yuvalı Çelik, G. (2007). Bakteriye Ekstraselüler Polisakkaritler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7-13.
- Zhong, W., K. Millsap, H. Bialkowska Hobrzsanska, G. R., (1998). Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2418–2423.
- Zhong, L., Zhang, X. and Covasa, M. (2014). Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7878-7886.
- Zysk, G., Bejo, L., Schneider-Wald, B. K., Nau R. and Heinz P. (2000). Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical & Experimental Immunology*, 122(1), 61-66.

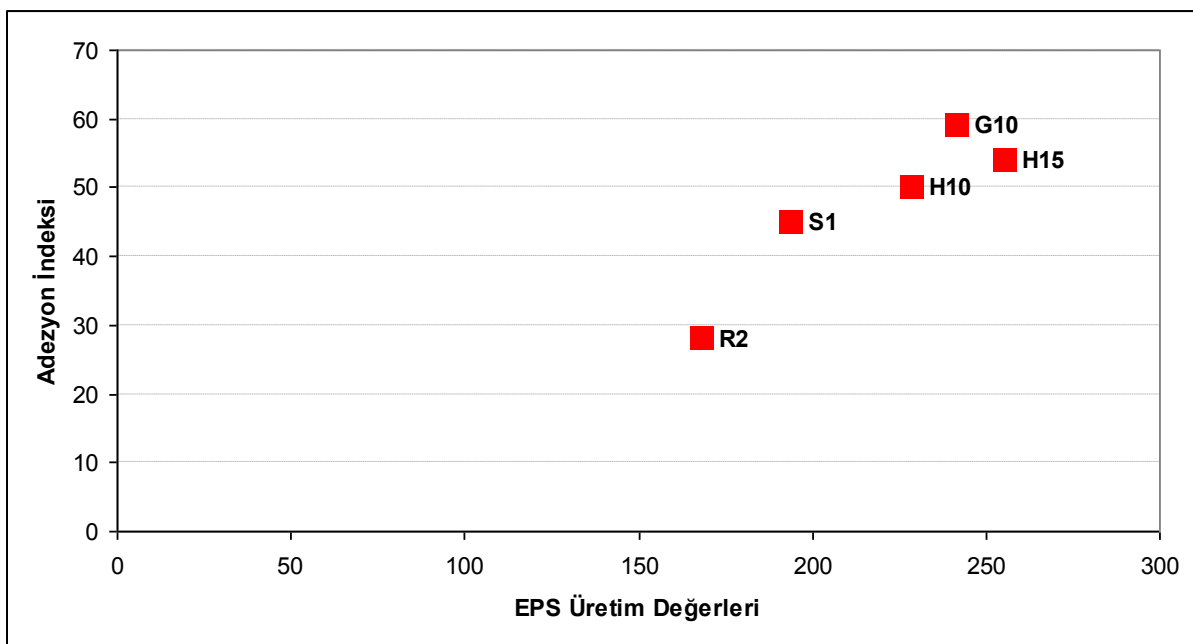
EKLER

EK-1. İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

EPS üretim kapasiteleri ile adezyon yüzdesi arasında 0.68 pozitif yönlü orta düzeyde bir ilişki bulunmuş olup bulunan ilişki anlamlı değildir ($p>0.05$).



EPS üretim kapasiteleri ile adezyon indeksi arasında 0.92 pozitif yönlü orta düzeyde bir anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.05$)



EK-1. (Devamı) İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

Bakteri	N	Ortalama	Std.sapma	Kruskal Wallis Testi	p.	Anlamlı Fark
G10	3	0,490	0,002	22,43	0,002*	*G10 ile G4 *G10 ile H10 *G10 ile H14 *G10 ile H15 *G10 ile H5 *G10 ile R2 *G10 ile S1
G4	3	1,114	0,003			*G4 ile H10 *G4 ile H14 *G4 ile H15 *G4 ile R2 *G4 ile S1
H10	3	1,044	0,003			*H10 ile H14 *H10 ile H15 *H10 ile H5 *H10 ile R2 *H10 ile S1
H14	3	0,754	0,003			*H14 ile H15 *H14 ile H5 *H14 ile R2 *H14 ile S1
H15	3	0,402	0,002			*H5 ile H5 *H5 ile R2 *H5 ile S1
H5	3	1,113	0,003			*R2 ile S1
R2	3	0,937	0,038			
S1	3	1,375	0,004			

*p<0.05

Bakterilere göre kanser hücresi üzerine antiproliferatif ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0.05). Hangi bakteriler arasında fark bulunduğu ise tablonun anlamlı fark sütununda belirtilmiştir.

EK-1. (Devamı) İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

EPS- µg/mL		N	Ortalama	Std sapma	Kruskal Wallis Testi	p	Anlamlı Fark
100	G10	3	1,409	0,001	13,524	0,009*	*G10 ile H10
	H10	3	2,782	0,003			*G10 ile H15
	H15	3	1,749	0,003			*G10 ile R2
	R2	3	1,922	0,002			*G10 ile S1
	S1	3	1,305	0,003			*H10 ile H15
							*H10 ile R2
							*H10 ile S1
							*H15 ile R2
							*H15 ile S1
							*R2 ile S1
200	G10	3	1,352	0,015	13,500	0,009*	*G10 ile H10
	H10	3	2,077	0,003			*G10 ile H15
	H15	3	1,519	0,002			*G10 ile R2
	R2	3	1,907	0,004			*G10 ile S1
	S1	3	1,204	0,018			*H10 ile H15
							*H10 ile R2
							*H10 ile S1
							*H15 ile R2
							*H15 ile S1
							*R2 ile S1
400	G10	3	1,193	0,002	13,500	0,009	*G10 ile H10
	H10	3	1,743	0,004			*G10 ile H15
	H15	3	1,477	0,004			*G10 ile R2
	R2	3	1,807	0,004			*G10 ile S1
	S1	3	1,074	0,033			*H10 ile H15
							*H10 ile R2
							*H10 ile S1
							*H15 ile R2
							*H15 ile S1
							*R2 ile S1

*p<0.05

200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan laktik asit bakteri suşlarından elde edilen EPS'lere göre kanser hücresi üzerine antiproliferatif ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0.05). Hangi EPSler arasında fark bulunduğu ise tablonun anlamlı fark sütununda belirtilmiştir. 400 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan laktik asit bakteri suşlarından elde

EK-1. (Devamı) İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

edilen EPS'lere göre kanser hücresi üzerine antiproliferatif ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Hangi EPS'ler arasında fark bulunduğu ise tablonun anlamlı fark sütununda belirtilmiştir.

	N	Ortalama	Std.sapma	Kruskal Wallis Testi	p	Anlamlı Fark
Kontrol	3	1,041	0,776	8,692	0,034	*Kontrol ile H14
G10	3	0,767	0,318			*Kontrol ile R2
H14	3	2,503	0,228			*G10 ile H14
H15	3	1,632	0,458			
R2	3	2,583	0,468			*G10 ile R2

* $p < 0.05$

Laktik asit bakterilerine göre kanser hücresi üzerine ölçülen apoptotik ölçümler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Hangi bakteriler arasında fark bulunduğu ise tablonun anlamlı fark sütununda belirtilmiştir.

EK-1. (Devamı) İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

EPS- µg/mL		N	Ortalama	Std.sapma	Kruskal Wallis Testi	p	Anlamlı Fark
200	Kontrol	3	1,041	0,776	9,225	0,056	Yok
	G10	3	1,428	0,057			
	H10	3	1,172	0,218			
	H15	3	1,058	0,161			
	R2	3	1,373	0,074			
	S1	3	1,031	0,117			
400	Kontrol	3	1,041	0,776	3,267	0,514	Yok
	G10	3	1,192	0,082			
	H10	3	1,326	0,099			
	H15	3	1,424	0,489			
	R2	3	1,417	0,131			
	S1	3	1,226	0,475			

200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan laktik asit bakteri suşlarından elde edilen EPS'lere göre kanser hücresi üzerine apoptotik ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SUNGUR, Tolga
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 18/04/1977, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (533) 725 05 66
 Fax : 0 (312) 315 19 14
 e-posta : sungur_tolga@yahoo.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2005
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Yahya Kemal Beyatli Lisesi	1994
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2001-devam ediyor	Gensutek	Genel Müdür

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Sungur, T., Kar, S., Güven, E., Aktaş, M., Karaer, Z., ve Vatansever, Z. (2008). *Cryptosporidium* spp'nin Dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi ile Teşhis Edilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32, 305-308

Ulusal Sempozyum Bildirileri

- Sungur, T., Tarançı, Ö., Karaaslan, Ç. ve Aslım, B. (2014). *Vajinal kaynaklı laktobasillerin HeLa kanser hücresinde antikanser etkisinin araştırılması*. 2. Ulusal

Probiyotik Prebiyotik ve Fonksiyonel Gıdalar Biyoloji Kongresi. 30 Ekim-2 Kasım 2014, Antalya (Poster).

Hobiler

Hobi, Doğa sporları, seyahat