

T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Streptococcus salivarius* M18 HÜCRESİZ SÜPERNATANTININ PATOJEN  
BAKTERİLERDE ANTİ-BAKTERİYEL VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE  
ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVİNÇ KARAÇAM

TEZ DANIŞMANI  
DR.ÖĞR.ÜYESİ SİNEM TUNÇER GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
DR.ÖĞR.ÜYESİ RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2021

10373638

T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Streptococcus salivarius* M18 HÜCRESİZ SÜPERNATANTININ PATOJEN  
BAKTERİLERDE ANTİ-BAKTERİYEL VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE  
ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVİNÇ KARAÇAM

TEZ DANIŞMANI  
DR.ÖĞR.ÜYESİ SİNEM TUNÇER GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
DR.ÖĞR.ÜYESİ RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2021

10373638

## BEYAN

“*Streptococcus salivarius* M18 Hücresiz Süpernatantının, Patojen Bakterilerde Anti-Bakteriyel ve Kolon Kanseri Hücrelerinde Anti-Kanser Etkilerinin Araştırılması” adlı yüksek lisans tez projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu tez çalışmasında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) “Fermente Edilebilen Karbonhidratlar Olarak İnülin ve Dirençli Nişasta ile Bunların Biyoaktif Ürünlerinin Kolorektal Kansere Üzerindeki Etkileri” adlı projeden destek alınmıştır.			
<b>DESTEK ALINMIŞTIR</b>	<input checked="" type="checkbox"/>	<b>DESTEK ALINMAMIŞTIR</b>	<input type="checkbox"/>
Destek alındı ise;			
<b>Destekleyen Kurum: Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)</b>			
<b>Destegin Türü</b>		<b>Proje Numarası</b>	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	<input checked="" type="checkbox"/>	2019-02.BŞEÜ.01-05	
2- TÜBİTAK	<input type="checkbox"/>		
Diğer	<input type="checkbox"/>		

Sevinç KARAÇAM

## ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez konumun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar değerli görüş ve önerilerini sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoğun çalışmalarını sırasında sabır gösterdikleri için Dr. Öğr. Üyesi Sinem TUNÇER GURBANOV ve Dr. Öğr. Rafiğ GURBANOV'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN ve Özge KAYGUSUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve laboratuvar çalışmalarımda yanımda olup maddi manevi destek veren ve yalnız bırakmayan Hazel KARADAĞ ve Gizem SAMGANE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok kıymetli annem Gülşen KARAÇAM, çok kıymetli babam Mehmet KARAÇAM, canım kardeşim Alican KARAÇAM, kıymetli dedelerim Hasan ÖZSAN ve Ali KARAÇAM'a sonsuz teşekkür ederim.

Yoğun tempolu bu süreçte desteklerini esirgemeyen, beni hiç yalnız bırakmayan, zor anlarımı paylaştığım, maddi ve manevi yanımda olan Muhammet Emin KOŞ, Ayten KUMAŞ ve Saadet Gizem ERTEKİN'e sonsuz teşekkür ederim.

**Sevinç KARAÇAM**

## ÖZET

### ***Streptococcus salivarius* M18 HÜCRESİZ SÜPERNATANTININ, PATOJEN BAKTERİLERDE ANTI-BAKTERİYEL VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTI-KANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Son yıllarda canlı probiyotik mikroorganizmaların kullanıma alternatif olmak üzere “postbiyotik” olarak adlandırılan mikrobiyal türevli biyomoleküllerin kullanımı oldukça dikkat çekici konulardandır. Hücresiz süpernatantlar söz konusu olduğunda postbiyotikler, probiyotikler tarafından salgılanan enzimler, vitaminler, biyo yüzey-aktif moleküller, amino asitler, peptitler, organik asitler gibi metabolik ürünleri kapsar. İnsanda tükürük, anne sütü, bağırsak ve dışkı örneklerinde varlığı saptanan *Streptococcus salivarius*, Gram-pozitif ve fakültatif anaerobik bir bakteri olup, oral mukozanın baskın bir türüdür. *S. salivarius* yaygın olarak dil dorsumunda ve farengeal mukozada bulunur. *Streptococcus salivarius* M18, sağlıklı bir yetişkinin ağız boşluğundan izole edilmiş bir probiyotik suştur. Bu tez çalışmasında *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının, insanda pek çok farklı enfeksiyondan sorumlu olmanın yanı sıra gıda patojenleri arasında da yer alan iki Gram-negatif patojen, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia*, üzerindeki anti-patojen etkileri araştırılmış olup, probiyotik süpernatantının patojen büyümesini ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, ayrıca patojenleri antibiyotiğe karşı hassaslaştırdığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkileri *in vitro* olarak incelenmiş olup, M18 suşu hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücreleri üzerinde hücre büyümesini inhibe edici ve apoptotik etki gösterdiği ve söz konusu etkinin bir prebiyotik olarak inülin kullanımı ile arttığı görülmüştür. En önemlisi de *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının bu anti-kanser etkisinin kanser mikroçevresine spesifik bir etki olduğu gösterilmiştir. Özetle, tez çalışması ile elde edilen veriler *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının anti-patojen ve anti-kanser etkilerini ortaya koymakta olup, çalışmanın sonuçları kolon kanseri ile ilişkili olmak üzere kolon mikrobiyotası disbiyozunun, oral mikrobiyotadan da etkilendiğinin gösterildiği güncel literatür bilgileri açısından değerlendirildiğinde oldukça önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus salivarius* M18, Hücresiz Süpernatant, Kolorektal Kanser, Patojen, Biyofilm

## ABSTRACT

### THE CELL-FREE SUPERNATANT OF *Streptococcus salivarius* M18, INVESTIGATION OF ANTI-BACTERIAL EFFECTS ON PATHOGENIC BACTERIA AND ANTI-CANCER EFFECTS ON COLON CANCER CELLS

In recent years, there is an increasing attempt to develop potential approaches as an alternative to the use of live probiotic microorganisms. In the case of cell-free supernatants, postbiotics include the secreted metabolic products such as enzymes, vitamins, bio-surface-active molecules, amino acids, peptides, and organic acids. *Streptococcus salivarius*, found in human saliva, breast milk, intestine, and stool samples, is a Gram-positive and facultative anaerobic bacteria. Being the dominant type of oral mucosa, *S. salivarius* is commonly found in the dorsum of the tongue and pharyngeal mucosa. *Streptococcus salivarius* M18 is a probiotic strain isolated from the oral cavity of a healthy adult. The probiotic strain has been shown to reduce dental plaque formation, moderate and severe gingivitis, and periodontitis and prevent the occurrence of new tooth decay through the production of some bacteriocins as well as dextranase and urease enzymes that help reduce dental plaque formation and acidification, respectively. In this thesis, the anti-pathogenic effects of *S. salivarius* M18 cell-free supernatant on two Gram-negative pathogens, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*, which are responsible for many different human infections as well as food borne-diseases, were investigated. The probiotic supernatant was shown to inhibit the growth of the pathogens and biofilm formation and sensitize the pathogens to the antibiotic treatment. In this study, the anti-cancer effects of *S. salivarius* M18 cell-free supernatant on colorectal cells were also investigated in vitro, and the cell-free supernatant of the M18 strain was shown to inhibit cancer cell viability and promote apoptosis. This effect was enhanced by the use of the prebiotic inulin. Most importantly, the observed anti-cancer effect was specific for the cancer microenvironment. In summary, the data obtained through this thesis reveal the anti-pathogenic and anti-cancer effects of the *S. salivarius* M18 cell-free supernatant. These results are important when evaluated in terms of current literature highlighting that colon microbiota dysbiosis, as a contributing factor for colorectal cancer, is affected by oral Microbiota.

**Keywords:** *Streptococcus salivarius* M18, Cell-free Supernatant, Colorectal Cancer, Pathogen, Biofilm

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Kanserin Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. Proliferatif sinyalizasyonun sürdürülmesi.....	6
2.1.2. Büyüme baskılayıcılarından kaçış.....	7
2.1.3. Hücre ölümüne direnç.....	7
2.1.4. Replikatif ölümsüzlük.....	8
2.1.5. Anjiyogenezin indüklenmesi.....	9
2.1.6. İstila ve metastazın etkinleşmesi.....	9
2.1.7. Genom kararsızlığı ve mutasyonu.....	10
2.1.8. İmmün yıkımdan kaçmak.....	10
2.1.9. Hücresel metabolizmanın değişimi.....	11
2.1.10. Tümörü teşvik eden inflamasyon.....	12
2.2. Kolorektal Kanser.....	12
2.3. Bağırsak Mikrobiyotası.....	13
2.4. Probiyotik.....	15
2.5. Prebiyotik.....	19
2.6. Postbiyotikler.....	21

<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2. Hücre İçermeyen Süpernatantların Toplanması</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3. Patojen Büyüme İnhibisyonu Deneyleri</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4. Patojen Biyofilm Deneyleri ve Yüzeğe Tutunma Kabiliyeti Analizi</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5. Kongo Kırmızısı Deneyi</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6. Kanser Hücrelerinin Büyütülmesi, Alt-Kültürlemesi ve Dondurulması</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7. Bağırsak Epitel Bariyer Modelinin Oluşturulması</b> .....	<b>28</b>
<b>3.8. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Deneyi</b> .....	<b>29</b>
<b>3.9. Hücre Canlılığı Tayini</b> .....	<b>30</b>
<b>3.10. Hanging Drop Deneyi</b> .....	<b>30</b>
<b>3.11. Protein İzolasyonu ve Western Blot</b> .....	<b>31</b>
<b>3.12. İstatiksel Analiz</b> .....	<b>32</b>
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. <i>S. salivarius</i> M18 Hücresiz Süpernatantının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Üzerinde Antibakteriyel Etkisi</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2. <i>S. salivarius</i> M18 Hücresiz Süpernatantın, <i>Klebsiella pneumonia</i> Üzerinde Antibakteriyel Etkisi</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3. <i>S. salivarius</i> M18 Hücresiz Süpernatantının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilm Oluşumuna Etkisi</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4. <i>S. salivarius</i> M18 Hücresiz Süpernatantının Kolon Kanseri Hücrelerine Etkisi</b> ...	<b>40</b>
<b>4.5 Prebiyotik Olarak İnülin Ve Tapyoka Nişastasının <i>S. salivarius</i> M18 Hücresiz Süpernatantının Anti-Kanser Aktivitesine Etkisi</b> .....	<b>45</b>
<b>4.6. <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının kolon epitel bariyer bütünlüğüne etkisi</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7 <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücrelerinde (HUVEC) hücre canlılığına etkisi</b> .....	<b>50</b>
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>59</b>

<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>60</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>72</b>



## TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

<b>Tablo 3.1</b> Kullanılan bakteriyel suşlar ve kaynakları .....	<b>24</b>
<b>Tablo 3.2</b> Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500µg / mL).....	<b>32</b>



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kanserın ayırt edıcı özellikleri.....	5
Şekil 2.2. Mikrobiyota ve kolorektal kanser .....	15
Şekil 2.3. Postbiyotiklerin etki mekanizmaları .....	23
Şekil 3.1. BSA standart grafiği .....	32
Şekil 4.1. <i>S. salivarius</i> M18 hücretsiz süpernatantın antibakteriyel etkisinin <i>P. Aeruginosa</i> bakterisinde araştırılması .....	35
Şekil 4.2. <i>S. salivarius</i> M18 hücretsiz süpernatantın antibakteriyel etkisinin ve antibiyotik varlığında antibakteriyel etkisinin <i>Klebsiella pneumonia</i> bakterisinde araştırılması .....	36
Şekil 4.3. <i>S. salivarius</i> M18 hücretsiz süpernatantının, <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm oluşumu üzerine etkisi .....	38
Şekil 4.4. <i>S. salivarius</i> M18 besi yeri miktarının optimizasyonu .....	39
Şekil 4.5. Medium pH'ının hücreler üzerine etkisinin incelenmesi ve probiyotik bakteri hücretsiz süpernatantlarının kolon kanseri hücre canlılığına etkisi .....	42
Şekil 4.6. HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığının tripan mavisi boyaması ile belirlenmesi	43
Şekil 4.7. Hanging drop (asılı damla) yöntemi ile oluşturulan sferoid yapılarına <i>S. Salivarius</i> M18 süpernatantının etkisi.....	43
Şekil 4.8. <i>S. salivarius</i> M18 hücretsiz süpernatantının HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde apoptoza olan etkisi.....	44
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> hücretsiz süpernatantının kolon kanseri hücresi üzerinde etkisi .....	44
Şekil 4.10. İnülin veya tapyoka nişastası ile inkübe edilen <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığına etkisi .....	45
Şekil 4.11. İnülin veya tapyoka nişastası ile inkübe edilen <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının SW480 kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığına etkisi .....	46
Şekil 4.12. Western Blot analizi ile protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi .....	47
Şekil 4.13. <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının kolon epitel bariyer bütünlüğüne etkisi .....	48
Şekil 4.14. Sağlıklı primer hücre olan HUVEC hücre hattında, <i>S. salivarius</i> M18 süpernatantının hücre canlılığına etkisi .....	49

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

**DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit

**TP53:** Tumor Protein 53

**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog

**RB:** Retinoblastoma

**pRb:** Fosforil Retinoblastoma

**VEGF-A:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A

**EMT:** Epitelyal-mezenkimal Geçiş

**KAI1:** Kang-Ai 1

**NDRG1:** N-myc Downstream Regulateg Gene 1

**GI:** Genome Instability

**CIN:** Chromosomal Instability

**ID:** Immune Demolition (Bağıklık Yıkımı)

**PDL:** Programmed Death Ligand (Programlanış Ölüm Ligandı)

**MDSC:** Myeloid-Derived Suppressor Cells

**PI3K:** Phosphatidylinositol 3-Kinase

**Akt:** Protein Kinaz B

**Ras:** Rat Sarcoma Virüs

**MEK:** Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz

**ERK:** Extraculluar Signal Regulated Kinase

**CRC:** Colorectal Cancer (Kolorektal Kanser)

**FAP:** Familial Adenomatous Polyposis (Ailevi Adenomatöz Polipoz)

**HNPCC:** Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (Kalıtsal Polipozsuz Kolorektal Kanser)

**CAC:** Colitis- Associated Cancer (Kolitle İlişkili Kanser)

**TH17:** Treg Helper 17

**16S rRNA:** 16 Structure Ribosomal Ribonucleic Acid

**STAT 3:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**NF- $\kappa$ B:** Nükleer Faktör-kappa Beta

**TLRs:** Tool-Like Receptors

**ETBF:** Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis

**TGF-β:** Transforming Growth Factor Beta (Büyüme Faktörü Beta Dönüşümü)

**IL:** Interlökin

**IBD:** Inflammatory Bowel Disease (Enflamatuar Barsak Hastalığı)

**pH:** Potential of Hydrogen (Hidrojen Potansiyeli)

**FDA:** United States Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç Dairesi)

**BLIS:** Bacteriocin-Like Inhibiting Substances (Bakteriyosin Benzeri Önleyici Maddeler)

**WHO:** World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

**FAO:** Food And Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)

**FOS:** Fructo-Oligosaccharides (Frukto Oligosakkarit)

**GOS:** Galacto-Oligosaccharides (Galakto Oligosakkarit)

**HMO:** Human Milk Oligosaccharides (İnsan Sütü Oligosakkariti)

**SCFA:** Short-Chain Fatty Acid ( Kısa Zincirli Yağ Asidi)

**RS:** Resistant Starch (Dirençli Nişasta)

**CAZymes:** Carbohydrate-Active Enzymes (Karbonhidrat Aktif Enzimler)

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Eksikliği Virüsü)

**ATCC:** American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)

**TSB:** Triptick Soya Broth (Triptik Soya Besiyeri)

**PES:** Polietersülfon

**CFU:** Colony Forming Units (Koloni Oluşturan Birimler)

**NaOH:** Sodyum Hidroksid

**HCL:** Hidroklorik Asit

**dH<sub>2</sub>O:** Distilled Water (Arıtılmış Su)

**CPZ:** Cefaperazone (Sefoperazon)

**TSA:** Triptik Soya Agar

**CV:** Cyrystal Violet

**EPS:** Extracellular Polymeric Substances (Ekstraselular Polimerik Maddeler)

**PBS:** Primer Bilier Siroz

**NIH:** National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüleri)

**HUVEC:** Human Umbilical Vein Endothelial Cells (İnsan Göbek Damarı Endotal Hücreleri)

**NaHCO<sub>3</sub>:** Sodyum Bikarbonat

**FBS:** Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**EDTA:** Etilendiamintetraasetik Asit  
**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
**DMSO:** Dimetil Sülfoksit  
**1X-NEAA:** Non-Essential Amino Acids (Esansiyel Olmayan Amino Asitler)  
**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit  
**EMEM:** Minimum Essential Medium (Minimum Temel Besiyeri)  
**NAD:** Nikotinamid Adenin Dinükleotit  
**PVDF:** Poliviniliden Florür  
**SDS-PAGE:** Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel Elektroforez  
**TBS-T:** Tris-Buffered Saline-Tween  
**HRP:** Horseradish Peroxidase  
**ud:** Dilüye Edilmeyen  
**ECL:** Enhanced Chemi Luminescence  
**XIAP:** X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (X'e Bağlı Apoptoz Protein İnhibitörü)  
**GAPDH:** Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz  
**GRAS:** Generally Recognized as Safe  
**GIT:** İnsan Gastrointestinal Sistemi  
**T:** Treg  
**PM:** Postbiyotik Metabolitler  
**AMP:** Antimikrobiyal Proteinler  
**ATR:** Attenuated Total Reflection (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)  
**FTIR:** Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)  
**TS:** Tapioca Starch (Tapyoka Nişastası)  
**OM:** Only Medium (Sadece Besiyeri)  
**OD:** Optical Density (Optik Yoğunluk)  
**BSA:** Bovin Serum Albumini  
**sup:** Süpernatant  
**C:** Karbon

**V:** Voltaj  
 **$\beta$ :** Beta  
**g/L:** Litre Başına Gram  
**°C:** Santigrat  
**nm:** Nanometre  
**vd:** ve diğerleri  
**%:** Yüzde  
**rpm:** Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)  
 **$\mu$ L:** Mikrolitre  
 **$\mu$ M:** Mikrometre  
 **$\mu$ M:** Mikromolar  
**w/v:** Ağırlıkça yüzde  
 **$\mu$ g/mL:** Mililitre Başına Mikrogram  
**mg:** Miligram  
**L:** Litre  
**mL:** Mililitre  
**mm:** Milimetre  
**cm<sup>2</sup>:** Santimetre Kare  
**□:** Yaklaşık  
**ns:** Non-Significant (Önemsiz)

## 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü, probiyotikleri "Yeterli miktarlarda uygulandığında konağa sağlık yararı canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlar. Probiyotik mikroorganizmaların dış çürüklerinin, gastrointestinal sistem patolojilerinin, akut solunum yolu enfeksiyonlarının yanı sıra otoimmün rahatsızlıkların ve inflamatuvar bozuklukların tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2825). *Streptococcus salivarius* M18, bir grup burun, ağız ve boğaz patojenini inhibe ettiği bilinen, Gram pozitif bir oral probiyotiktir. Olağandışı geniş inhibisyon spektrumu, *S. salivarius* M18'in, ağız boşluğundaki enfeksiyonlara ek olarak farklı enfeksiyon türlerini önleyerek konakçı için ek faydalar sağlayabileceğine işaret etmektedir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2826). 2019'da ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) *S. salivarius* M18'i GRAS (Generally Recognized as Safe; Bildirim No. 807) olarak kabul etmiş olup, bu suşun insan sağlığına bir zararı olmadığı ve gıdalarda güvenle kullanılabileceğini onaylanmıştır (Santagati vd., 2012: 24). *S. salivarius*'un oral kavitenin yanı sıra aynı zamanda gastrointestinal sistem, paranazal sinüsler ve genitoüriner yollarda da kolonize olabildiği bilinmektedir (Hegarty vd., 2016: 6). Oral mikrobiyotanın, zatürre, hepatik veya beyin apseleri, demans, kardiyovasküler hastalıklar, kistik fibroz ve sindirim sistemi kanserleri dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çeşitli patolojilerde rol oynadığı bilinmektedir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2826). Son zamanlarda, kolon mikrobiyotasının disbiyozunun oral mikrobiyotadan da etkilendiği öne sürülmüştür ki ilgili çalışmalar, özellikle oral bakteri aracılı sistemik inflamatuvar yanıtların değerlendirilmesi için oral-kolon etkileşiminin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğine işaret etmektedir. Bu nedenle, sağlıklı bir oral mikrobiyotayı teşvik edebilen fonksiyonel probiyotiklerin ve probiyotik ürünlerin geliştirilmesi, sadece periodontal hastalıkların tedavisi için değil, aynı zamanda sistemik hastalıkların tedavisi için de özel bir ilgi alanıdır (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2826). Oral mikrobiyota konseptinden bakıldığında fonksiyonel probiyotiklerin tanımlanması ve probiyotik-prebiyotik etkilerinin değerlendirilmesi, CRC dahil olmak üzere farklı hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyelinin tanımlanması açısından önemlidir (Kumar, 2013: 90; Wescombe vd., 2011: 1291).

Prebiyotikler insan sindirim sistemi enzimleri tarafından sindirilemeyen karbonhidratları (oligosakaritler veya polisakaritler) kapsar. Bir grup diyet lifi olarak prebiyotikler fermente edildiklerinde, bağırsak mikrobiyotası kompozisyonu içinde ölçülebilir değişikliklere aracılık eder; bifidobakteriler veya bazı bütirat üreticileri gibi probiyotik bakterilerin bolluğunda bir artışa neden olurlar. İnulin, oligofruktoz, galaktofruktoz, galakto-oligosakaritler ve ksilo-oligosakaritler en yoğun olarak çalışılan prebiyotik gruplarıdır (Marchesi et al. 2016: 332). Prebiyotiklerin probiyotikler tarafından fermentasyonu sonucu gastrointestinal mikrobiyotanın kompozisyonunda ve aktivitesindeki spesifik değişiklikler, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler ile kendini gösterir (Marchesi vd., 2016: 332). Prebiyotikler bağışıklık fonksiyonunu doğrudan veya dolaylı etkileyebilir, faydalı mikroorganizma sayısını artırır ve hastalığa neden olan patojenlerin kolonizasyonunu azaltır. Bu etkileri nedeni ile prebiyotiklerin kardiyovasküler bozukluklar ve alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi hastalıklarda olumlu rol oynadığı gösterilmiştir (Khangwal ve Shukla, 2019: 2). Prebiyotiklerin neden olduğu bu etkiler yalnızca kolon için değil, kendine özgü mikrobiyotaya sahip ağız boşluğu, ürogenital sistem ya da deri için de söz konusudur (Valcheva ve Dieleman, 2016: 29).

Bağırsak mikrobiyotası ve sindirim sistemi arasındaki simbiyotik etkileşimler, bağırsak homeostazının korunmasına büyük ölçüde katkıda bulunur, ancak çevresel değişikliklerin (enfeksiyon, diyet ve yaşam tarzı) neden olduğu bu etkileşimlerin değişiklikleri, kolon mukozasında (displazi) hasarı ve kolorektal kanser gelişimini teşvik edebilir (Gagnière vd., 2016: 2). Son zamanlarda, biyoaktif postbiyotik metabolitler (PM) olarak bilinen probiyotik metabolitlerin, özellikle bağırsak sağlığının korunmasında, bağırsak hastalıklarının iyileştirilmesinde ve doğuştan gelen bağışıklığın güçlendirilmesindeki etkileri üzerine yapılan çalışmaların arttığı görülmektedir (Chuah vd., 2019: 2).

Konstantinov ve arkadaşları, kolon sağlığının korunmasında postbiyotiklerin önemi açıklamıştır ve postbiyotiklerin canlı bakterilere kıyasla daha güvenli bir alternatif olabileceğini öne sürmüştür (Konstantinov vd., 2013: 741). Ayrıca, Konstantinov ve arkadaşları postbiyotiklerin kolorektal kanserin geç evrelerinde hastaların yaşam kalitesini iyileştirme olasılığını öne sürerken, Tsilingiri ve arkadaşları, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi bağırsakla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde postbiyotik kullanımını önermiştir (Konstantinov vd., 2013: 741; Tsilingiri vd., 2012: 1008). Kanser veya inflamatuvar hücrelerin aktivitelerinin probiyotik aracılı postbiyotiklerle baskılanması konusunda çalışmalar mevcut olup, bu alanda laktik asit bakterileri (LAB) kaynaklı postbiyotiklerin potansiyeline işaret edilmektedir (Chuah vd., 2019: 2).

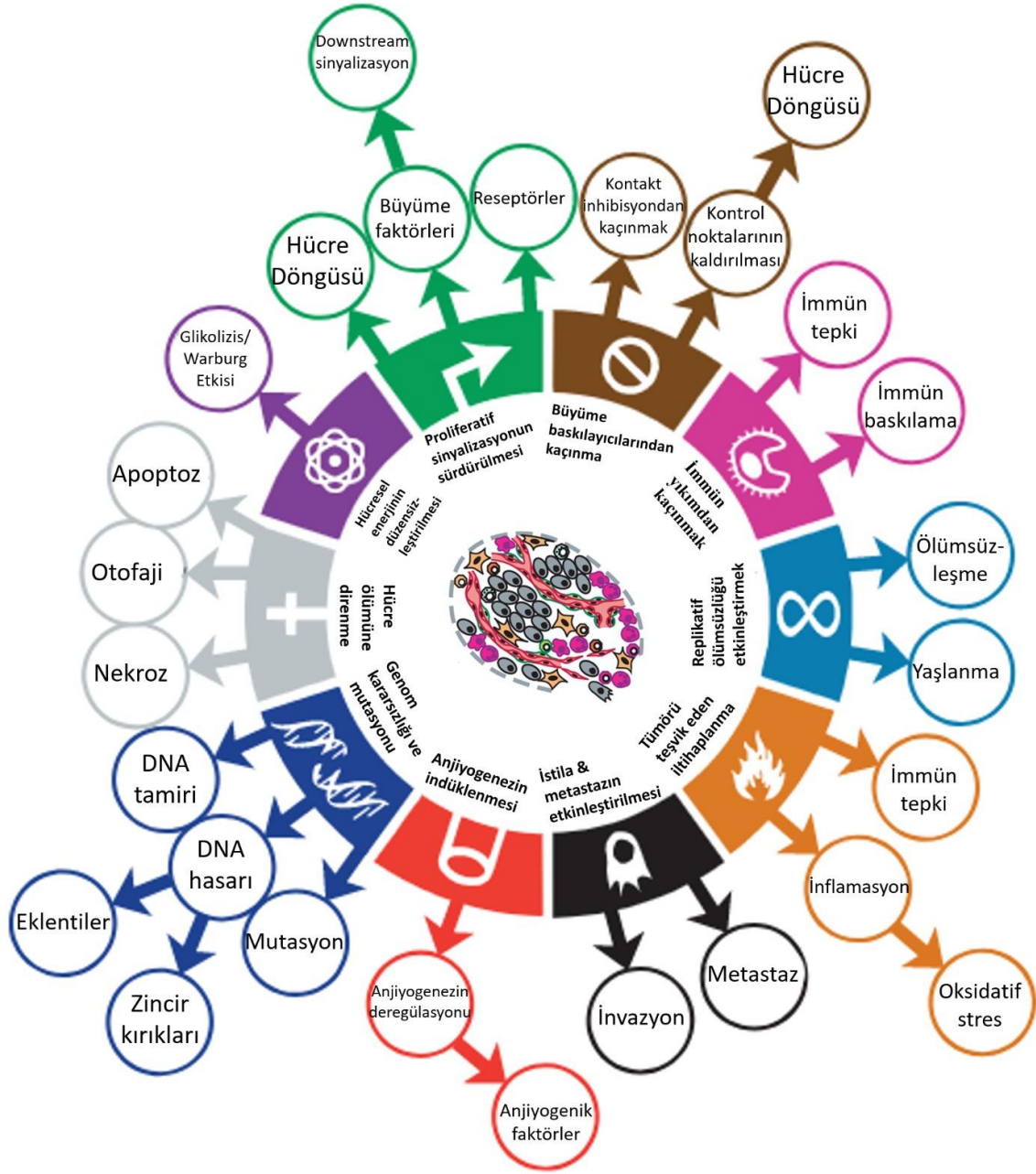
Bu tez çalışmasında bir LAB olarak *Streptococcus salivarius* M18 suşunun hücresiz süpernatantının, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* üzerindeki anti-patojen etkileri ve ayrıca söz konusu postbiyotik ürünlerin kolorektal kanser üzerindeki etkileri incelenmiş olup, bu etkilere fermente edilebilen prebiyotikler olarak inülin ile dirençli nişasta ihtiva ettiği bilinen tapyoka nişastasının katkısı da araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Kanserin Genel Özellikleri

Karsinogenez, tümör başlaması, ilerlemesi ve gelişmesinden oluşan çok aşamalı bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Dorai ve Aggarwal, 2004: 130). Bu süreç, hücresel dönüşüm, hiperproliferasyon, büyüme baskılayıcılardan kaçma, programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) direnç, invazif potansiyelin ve anjiyojenik özellikler kazanımı ve son olarak metastatik lezyonların oluşmasıyla karakterizedir (Hanahan ve Weinberg, 2000: 58, Hanahan ve Weinberg, 2011: 648).

Hanahan ve Weinberg 2000 yılında, tümör oluşumu ve gelişimi sırasında kazanılan bazı özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000: 57): proliferatif sinyal iletimini sürdürme, büyüme baskılayıcılardan kaçma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlük sağlama, anjiyogenezi indükleme, istila ve metastazı aktive etme olarak tanımlamışlar, 2011'de yayınladıkları "Hallmarks of cancer: the next generation" başlıklı çalışmalarında ise bu özelliklere hücresel enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, immün yıkımdan kaçış, genom kararsızlığı ve mutasyon ve tümör teşvik edici inflamasyonu eklemişlerdir. Ayrıca, Hanahan ve Weinberg, tümörlerin geniş hücresel heterojenliğini vurgulamışlar ve kanser hücrelerine ek olarak stromal hücrelerin, kanserin ilerlemesine katkıda bulunan karmaşık bir tümör mikro ortamının oluşumuna katkı sağladıklarına dikkat çekmişlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2011: 647) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Kanserın ayırt edici özellikleri

Kanser hücrelerinin hayatta kalma, çoğalma ve yayılma gibi kazanılmış işlevlerine imkan tanıyan ve bu hücrelerin sağlıklı hücrelerden ayırt edilmesini sağlayan özellikleri, Hanahan ve Weinberg, 2011 çalışmasından modifiye edilmek üzere gösterilmiştir.

**Kaynak:**(Hanahan ve Weinberg, 2011: 652).

### 2.1.1. Proliferatif sinyalizasyonun sürdürülmesi

Gelişmiş ve sürdürülebilir hücre proliferasyonu kanser hücrelerinin en temel özelliğidir ve kanserin en önemli ayırt edici özelliklerinden biridir (Bhatt vd., 2010: 130). Normal hücrelerde bölünme, doku homeostazının sürdürülmesi amacı ile hücre döngüsünün ve büyüme sinyallerinin düzenlenmesi ile sıkı şekilde kontrol altında tutulur. Kanser hücrelerinde ise hücre döngüsü kontrolünün kaybı ve büyüme sinyallerine cevabın deregülasyonu söz konusudur (Hanahan ve Weinberg., 2000: 64).

Fizyolojik koşullarda, hücrenin çoğalması için hücre dışı büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ortamda bulunan polipeptid yapıdaki büyüme faktörleri, hücre içerisindeki sinyal yollarını aktive ederek hücrenin büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmektedir. Bu uyarının uzak hücrelere endokrin yolla, komşu hücrelere parakrin yolla, etkileşim içinde olduğu hücreye jukstakrin yolla veya hücrenin kendisine otokrin yolla iletimi gerçekleşebilir. Sağlıklı hücrelerin aksine, tümör hücreleri hücre içi sinyal yollarını sürekli olarak aktive ederek büyüme faktörü üretimini arttırmakta ve otokrin sinyal iletimi sayesinde hücre dışı büyüme faktörüne ihtiyaç duymadan sağ kalımını ve çoğalmasını sürdürmektedir. Büyüme faktörlerinin anormal şekilde üretimi sayesinde kanser hücrelerinin sürekli olarak bölünmesi gerçekleşmektedir (Hanahan ve Weinberg., 2000: 57). Tipik olarak tirozin kinaz reseptörlerine bağlanmalarını takiben bu büyüme faktörleri, hücrenin hayatta kalmasını, hücre döngüsünü ve hücre büyümesini teşvik eden sinyal yollarının aktive olmasına neden olurlar. Bu yolların aktivasyonu hücrel enerji metabolizmasında da değişikliklere neden olur (Witsch vd., 2010: 87). Reseptör tirozin kinazlardaki mutasyon, genomik amplifikasyon, kromozomal translokasyonlar gibi genetik değişiklikler nedeni ile bu reseptörlerin otokrin aktivasyonu, kanser hücrelerine dönüşüm ile ilgili süreci niteleyen etkiler arasında yer almaktadır (Hernandez vd., 2020: 1). Tümör hücreleri proliferatif sinyalleme için çeşitli yollarla sürdürme yeteneğini elde etmişlerdir: otokrin bir stimülasyon için büyüme faktörlerini ve karşılık gelen reseptör moleküllerini aşırı ifade ederler. Ayrıca bir kanser hücresi sağlıklı çevre hücreleri büyüme faktörleri üretmesi için parakrin yolla uyarabilir (Gutschner ve Diederichs, 2012: 705).

### 2.1.2. Büyüme baskılayıcılarından kaçış

Hücre proliferasyonunun kontrolünün sağlanmasında büyüme önleyici sinyaller önemli olmakla birlikte tek faktör değildir. Postmitotik faktörlerin varlığı bazı durumlarda hücreye farklılaşma talimatı verir ve böylelikle hücre çoğalması kısıtlanır. Tümör hücrelerinin ise bu terminal farklılaşmadan kaçınmak için çeşitli stratejileri vardır: kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve hücre çoğalmasını düzenleyen hücre döngüsü kontrol noktalarından kaçış söz konusudur (Hanahan ve Weinberg, 2011: 652).

Kanser hücrelerinde proliferatif sinyalleme için oldukça tanımlayıcı bir ayırt edici özellik, büyüme baskılamasından kaçma yeteneğidir. Hücresel büyüme ve proliferasyonu inhibe etmek için çeşitli şekillerde çalışan tümör baskılayıcı genler tanımlanmıştır. Bu tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu, dış veya iç uyaranlara bağlıdır ve hücre döngüsünün durmasına yol açabilir veya hücrelerde yaşlanmaya ve hatta apoptoza neden olabilir. Örneğin, bir tümör baskılayıcı gen olarak insan kanserlerinin %50'sinde genomik hasara bağlı olarak hücre döngüsü tutuklanmasında sorumlu *p53* geninin mutasyonu söz konusudur (Gutschner vd., 2012:706).

### 2.1.3. Hücre ölümüne direnç

Sağlıklı hücrelerde onarılamaz DNA hasarı, kontrolsüz proliferasyon veya matristen kopma gibi stres faktörlerine yanıt olarak apoptotik hücre ölümü gerçekleşebilir (Lopez ve Tait., 2015: 959). Kanser hücreleri ise DNA hasarına, onarımına, büyüme faktörü yoksunluğuna ve benzeri hücresel stresörlere duyarlı olmadıklarından apoptozdan kaçarlar (Vogelstein vd., 2013: 1549); böylelikle karsinogenezde sağlıklı doku homeostazı için önemli olan proliferasyon ve hücre ölümü arasındaki denge bozulmuştur (Fouad ve Aanei., 2017: 1026). Ayrıca, kanser hücreleri apoptotik yolağın aktivasyonuna direnen bazı proteinleri aşırı ifade etmektedir (Singh ve Batra, 2020: 355).

Apoptoza direnç, sıklıkla kanserin ilerlemesinin ana itici güçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Apoptoz, kaspazlar adı verilen spesifik sistein proteazları aracılığıyla gerçekleşir. Kaspazlar, hücre ölümü reseptör ligasyonu ile başlatılan ve başlatıcı kaspaz-8'in aktivasyonu ile sonuçlanan dışsal yol ile mitokondriyal dış zarın geçirgen hale getirilmesiyle başlatılan ve kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanan içsel yol olarak iki alternatif yolla etkinleştirilebilir. Sonunda mitokondriyal pro-apoptotik faktörlerin sitozole salınması gerçekleşir. Bu salım, sırasıyla başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonu ve apoptoz inhibitörlerinin (IAP'ler) inaktivasyonu ile sonuçlanır.

Anti-apoptotik Bcl2 proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini ve pro-apoptotik faktörlerin salınımını inhibe ederken, IAP'ler kaspaz aktivitesini inhibe ederek apoptotik kaskad ile etkileşime girer. Kanser hücrelerinde apoptoza direncin altında yatan mekanizmalardan biri, bir veya birkaç IAP'nin aşırı ekspresyonudur (Ayachi vd., 2019: 320). X'e bağlı Apoptoz Proteini İnhibitörü (XIAP), kaspazların güçlü inhibisyonu yoluyla hücre ölümünü baskılayan bir anti-apoptotik proteindir. Bu proteinin yüksek ekspresyonu, birçok kanserde kötü prognoza karşılık gelir ve ayrıca ekspresyon seviyesi, hastalığın ilerlemesi ile pozitif olarak ilişkilidir. Hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmanın yanı sıra, XIAP'nin kemoterapi direncine de katkıda bulunduğu bildirilmiştir ve bu proteinin hedeflenmesinin, hücreleri apoptoza karşı etkili bir şekilde duyarlı hale getirdiği ve tümör ilerlemesini baskıladığı bulunmuştur (Flanagan vd., 2015: 2).

#### **2.1.4. Replikatif ölümsüzlük**

Kanser hücrelerinin büyüme sinyali özerkliği, anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık ve apoptoza direnç yetenekleri, düzensiz proliferasyona neden olarak, kütlesi artmış hücre popülasyonlarının ve makroskopik tümörlerin ortaya çıkmasını mümkün kılar (Hanahan ve Weinberg, 2000: 62).

Hayflick, kültürdeki sağlıklı hücrelerin sınırlı bir çoğalma potansiyeline sahip olduğunu, başka bir ifade ile sağlıklı hücre popülasyonlarında bölünme sayısının sınırlı olduğunu ortaya koymuştur. Hayflick'in tanımladığına göre kültür ortamındaki sağlıklı bir fibroblast hücre popülasyonunda, hücre popülasyonunun ikiye katlanması (doubling) için belirli bir limit vardır ve bu limite ulaşan popülasyonun büyümesi durur. Bu süreç “senesens” olarak adlandırılır. Ancak, *p53* ve *pRb* tümör baskılayıcılarının fonksiyonlarının engellenmesi durumunda söz konusu fibroblast hücreleri, ikinci bir aşama olarak “kriz” durumuna kadar çoğalmaya devam ederler.

Bu “kriz” aşaması karyotipik değişimlerle tanımlanabileceği gibi kitlesel bir hücre ölümünün de gözlendiği aşamadır. Fakat bu hücre popülasyonundaki her  $10^7$  hücreden biri sınırsız (limitsiz) olarak bölünebilme kabiliyeti kazanır ki bu durum ölümsüzleşme (immortalization) olarak adlandırılır (Hanahan ve Weinberg, 2000: 62). Sağlıklı hücrelerin belirli sayıda mitoz geçirmelerinin altında yatan temel neden her mitotik bölünmeden sonra kromozom uçlarının (telomerler) kısalmasıdır. Kanser hücrelerinde artan telomeraz enzim ifadesi ve aktivitesi nedeni ile mitoz bölümünün bir sonucu olarak ortaya çıkan kromozom uçlarının kısalması durumu söz konusu değildir; kanser hücrelerinde Hayflick limiti aşılmıştır (Singh ve Batra, 2020: 357).

### **2.1.5. Anjiyogenezin indüklenmesi**

Tümörlerin normal dokular gibi besinlere, oksijene ve metabolik atıkların ile karbondioksitin uzaklaştırılmasına ihtiyacı vardır (Rashid, 2017: 7). Anjiyogenez, bu ihtiyaçları karşılamak üzere tümörle ilişkili neovasküler sistemin oluşması sürecidir (Hanahan ve Weinberg, 2011: 652). Bu süreç, yeni endotel hücrelerinin oluşumunu ve bu hücrelerin tıpkı embriyonik aşamada vaskülojeneze benzer şekilde tüp formasyonu yoluyla organize olmasını kapsar (Senger ve Davis, 2011: 2). Tümör anjiyogenezinde, yara iyileşmesi ve embriyonik anjiyogenezden farklı olmak üzere, artan neoplastik büyümenin ihtiyaçlarının karşılanması amacı ile süregelen bir damar filizlenmesi söz konusudur (Hanahan ve Weinberg, 2011: 652). Tümör neovasküler sistemi, kıvrımlı ve aşırı dallanmış damarlaşıma, kılcal filizlenme, düzensiz kan akışı, çarpık ve genişlemiş damarlar, mikro kanama, sızıntı ve anormal endotel hücre proliferasyonu (ve apoptozis) ile ayırt edilebilir (Nagy vd., 2010: 4). Bu süreci tetikleyen temel faktörlerden biri Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A (VEGF-A), yaygın adıyla VEGF'dir. Embriyonik ve doğum sonrası gelişim sırasında, yeni kan damarı büyümesi, endotelial hücrelerin homeostazı ve fizyolojik ve patolojik durumlar VEGF tarafından yönetilir. Hipoksi ve onkojen sinyali gibi durumlar VEGF ifadesini artırır (Ferrara, 2009: 789).

### **2.1.6. İstila ve metastazın etkinleşmesi**

EMT (Epitelyal-mezenkimal geçiş), epitel hücrelerinin mezenkimal özellikler kazandığı, göç yetenekleri ile karakterize edilen bir hücresel süreç olup (Bakir vd., 2020: 764) normal embriyonik gelişim, doku rejenerasyonu, organ fibrozu ve yara iyileşmesi sırasında görülür. Kanser etiyopatogenezi açısından değerlendirildiğinde ise EMT'nin tümör ilerlemesi, metastatik özelliklerin kazanımı ve kanser tedavisine dirençte etkin olduğu görülmektedir (Roche, 2018: 1). Ek olarak belirtmek gerekir ki kanserde en önemli ölüm nedeni olarak metastaz, EMT ilişkili faktörlerinden olan integrin, Tetraspanin (KAI1 CD82), N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) gibi genlerin ifadesindeki değişimlerin yanı sıra, hücre-hücre etkileşimlerinin değişimi gibi başka süreçlerle de tetiklenebilir (Singh ve Batra, 2020: 357).

### 2.1.7. Genom kararsızlığı ve mutasyonu

Genomik kararsızlık, neredeyse tüm kanserlerin özelliğidir. Genomik kararsızlığın çeşitli biçimleri vardır. Çoğu kanserde, kromozom yapısının ve sayısının yüksek oranda değişmesini ifade etmek üzere kromozom dengesizliği (Chromosomal Instability-CIN) söz konusudur (Bakhoun ve Cantley, 2018: 1350). İlginç olarak, çoğu kez bu kromozomal değişimlerin bazıları bir tümörün tüm hücrelerinde görülürken, bir başka hastanın aynı tümör türünü oluşturan hücrelerinde görülmez ve bu durum tümör hücrelerinin genetik olarak kararsız tek bir hücreden köken aldığını göstermenin yanı sıra zamanla bu hücrelerde farklı anomalilerin de birikmesinin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. CIN, doku kültüründe büyütülen kanser hücrelerinde de gösterilmiştir (Heng vd., 2013: 338).

Neoplastik hücrelerin genomlarında art arda meydana gelen değişiklikler, bazı hücre alt klonlarına seçici avantaj sağlar (Berdasco, Esteller, 2010: 707). DNA tamir mekanizmaları ve apoptozun tetiklenmesi başta olmak üzere genomik kararlılığı temin eden süreçlerin bozulması da genomik kararsızlığı tetikler ve yeni mutasyonları teşvik eder. Bu şekilde artan mutasyonlar, tümör hayatta kalmasına ve ilerlemesine hizmet eder, ve hatta terapötiklere dirence teşvik eder (Bakhoun ve Cantley, 2018: 1352).

### 2.1.8. İmmün yıkımdan kaçmak

İmmün sürveyans, bağışıklık sistemi elemanlarının kanser hücrelerini ya da kanser hücrelerine dönüşme potansiyali olan hücreleri tanımlaması ve yok etmesi olarak tanımlanır (Singh ve Batra, 2020: 357). *In vivo* fare modelleri ve klinik epidemiyolojik verilerden elde edilen sonuçlar, tümör oluşumu ve ilerlemesinde bağışıklık sisteminin önemli bir engel olarak iş gördüğünü ortaya koymaktadır (Cantor ve Sabatini, 2012: 888). Ancak, immün gözetimine rağmen tümörler, işleyen bir bağışıklık sistemi varlığında dahi ortaya çıkabilir ki bu durum tümör immün düzenlemesi (tumor immuno-editing) ile açıklanır (Swann vd., 2007: 1141).

Bağışıklık sistemi tüm yabancıların, virüslerin, patojenlerin ve tümör hücrelerinin, tanınması ve yok edilmesinden sorumludur. Transmembran proteinleri olarak Programlanmış Ölüm Ligandı 1 (PD-L1) ve PDL2, otoimmün bozukluklar, hepatit ve gebelik gibi süreçlerde bağışıklık sisteminin baskılanmasında rol oynayan fren mekanizmalarındandır (Ostrand-rosenberg, 2008: 13).

Programlanmış Ölüm Proteini 1 (PD-1), genellikle çeşitli antijenlere kronik olarak maruz kalan aktive edilmiş T hücreleri ve antijene özgü T hücreleri tarafından ifade edilir. PD-1'in PD-L1 ile etkileşimi hücre proliferasyonunun ve sitokin salımının inhibe edilmesi ve apoptozun teşvik edilmesi ile sonuçlanır. Kanser hücreleri, PD-L1'i aşırı ifade ederek bağışıklık yanıtlarından kaçarlar (Zhang vd., 2020: 722).

Bazı tümörlerin ortaya çıkışında tümör immün düzenlemenin yanı sıra zayıf bir bağışıklık sistemi nedeni ile kanser hücrelerinin tespiti ve ortadan kaldırılması mümkün olamaz; bu şekildeki kusurlu immün sürveyans, immün sistemi baskılanmış veya zayıf bireylerde bazı kanserlerin daha sık görülme nedenini açıklar niteliktedir (Hanahan ve Weinberg, 2011: 656). Bununla birlikte, sözü geçen kanserlerin büyük çoğunluğunu virüs kaynaklı kanserler oluşturmaktadır ki bu anlamda bağışıklık sisteminin istilacı virüsü ortadan kaldırma kabiliyetinin zayıflamış olması, enfekte bireylerde viral yükün artmasına bağlı olarak viral kökenli kanserlerin ortaya çıkmasını tetikleyebilir (Mlecnik vd., 2014: 204).

### **2.1.9. Hücresel metabolizmanın değişimi**

Kanser hücrelerinde limitsiz büyüme ve bölünmenin sağlanması için metabolizma ile ilgili hücresel süreçlerin yeniden düzenlenmiş olduğu görülür ki bu düzenlemenin temelini artan glikoz alımı ve aerobik glikoliz oluşturur. Normal sağlıklı hücreler, mitokondri içinde piruvatın oksidatif parçalanmasıyla enerji taşıyan molekül Adenozin Trifosfat (ATP) üretir. Kanser hücrelerinde ise "Warburg Etkisi" olarak bilinen bir süreç ile glikozun oksidatif olmayan parçalanmasıyla (anaerobik glikoliz) enerji üretimi söz konusudur (Liberti ve Locasale, 2016: 214).

Warburg etkisi, tümörlerin enerji üretimi için oksidatif fosforilasyon yerine yeterli oksijen varlığında bile anaerobik glikolitik yolu kullanarak laktat üretme eğiliminde olduğunu ortaya koyar. Bazı kanserlerde yüksek laktat seviyeleri, metastaz, tümör nüksü ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Tümör kaynaklı laktat, inflamasyonu ve bağışıklık yetersizliğini tetikler. Laktat, T hücreleri ve makrofajlar tarafından interlökin (IL) -17A üretimini artıran ve tümör mikro ortamlarında kronik inflamasyonun artmasına neden olan bir intrinsik inflamatuvar mediyatör olarak işlev görür ve ayrıca antijene özgü otolog T hücre uyarımı sırasında dendritik hücre aktivasyonunu inhibe eder, tümör hücrelerinin hareketliliğini artırır ve monosit göçünü ve sitokin salınımını inhibe eder. Ayrıca laktat, Nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aracılığıyla IL-8 indüksiyonu ve hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü (HIF) -1 yoluyla da vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF / VEGF-A) ifadesinde artışa neden olarak anjiyogeneze katkıda bulunabilir (Kato vd., 2013: 1).

### **2.1.10. Tümörü teşvik eden inflamasyon**

Kanser hücreleri, büyümelerini ve çoğalmalarını teşvik etmek için inflamasyon süreçlerini kullanır (Mantovani ve Pierotti, 2008: 180). inflamasyon, proliferatif sinyallemeyi sürdüren büyüme faktörleri, hücre ölümünü sınırlayan hayatta kalma faktörleri, proanjiojenik faktörler, anjiyogenez, invazyon ve metastazı kolaylaştıran ekstraselüler matriks değiştirici enzimler de dahil olmak üzere, tümör mikro ortamına biyoaktif moleküller sağlayarak çok sayıda ayırt edici kabiliyete katkıda bulunabilir (Hanahan vd., 2011: 660).

Tümör mikro-çevresinde bağışıklık sistemi hücreleri inflamatuvar bir ortam oluşturur; büyüme faktörleri, hücre ölümünü engelleyici hayatta kalma faktörleri, proanjiojenik faktörler ile metastazı ve invazyonu kolaylaştırmak üzere hücre dışı matriski düzenleyici faktörler salgılayarak tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarını ve metastazını ayrıca EMT'yi destekler (Grivennikov vd., 2011: 892; Mantovani ve Pierotti, 2008: 180).

## **2.2. Kolorektal Kanser**

İnflamatuvar bir kanser olarak tanımlanan kolorektal kanser (CRC), en sık rastlanan kanserlerden biridir (Siegel vd., 2017: 17). Diğer kanserlere benzer şekilde CRC, genetik ve epigenetik değişimlerin kademeli birikimi ile ilişkili olan çok aşamalı bir sürecin sonucudur. Olguların % 90'ından fazlasının sporadik olduğu CRC'de, normal epitelden adenomatöz poliplere ve invaziv karsinomaya ilerleyen bir süreç söz konusudur (Candela vd., 2014: 908).

Kalıtsal kanserler, tüm CRC vakalarının sadece % 5'ini oluşturur. Kalıtsal kanserlerin daha doğru bir şekilde sınıflandırılması için polipoz ve polipoz olmayan formlar olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Polipoz varyantında ailesel adenomatöz polipoz (FAP) mutasyonları söz konusu iken, kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser (HNPCC), DNA onarım mekanizmalarındaki mutasyonlarla ilişkilidir. Lynch sendromu, tüm kolorektal kanser vakalarının % 2-3'ünde bulunabilir ve bu nedenle HNPCC grubunda en yaygın sendromdur (Mármol vd., 2017: 3). CRC vakalarının çoğu sporodiktir. Sıklıkla çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan kronik inflamasyon, CRC'nin başlangıç ve ilerlemesine katkı sağlar (Feagins vd., 2009: 299). Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve inflamatuvar bağırsak sendromuna sahip hastaların, kötü prognozlu kolit ile ilişkili CRC'ler (CAC) geliştirme riski yüksektir (Lakatos ve Lakatos, 2008: 3938).

Konakçı ve mikrobiyota arasındaki simbiyotik ilişkiyi bozan mikrobiyal değişiklikler disbiyoz olarak adlandırılır ve son yıllarda disbiyozun, inflamatuvar bir kanser olarak kabul gören CRC'nin oluşum ve gelişim aşamalarında önemli bir role sahip olduğu kabul görmüştür. Buradan yola çıkılarak CRC'nin mikrobiyom temelli yaklaşımlarla önlenmesi ve CRC tedavisinde mikrobiyom temelli terapötiklerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (Halbrook ve Crawford, 2019:1133). Sağlıklı bir bağırsak epiteli, optimum besin emiliminin yanı sıra etkili bir bağışıklık bariyerinin sağlanması için kritik öneme sahiptir; bağırsak mikrobiyotası, bağırsak epiteli ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki denge ile bağırsak hücrelerinin normal işlevselliğinin sürdürülmesi için önemlidir (Kau vd., 2011: 332).

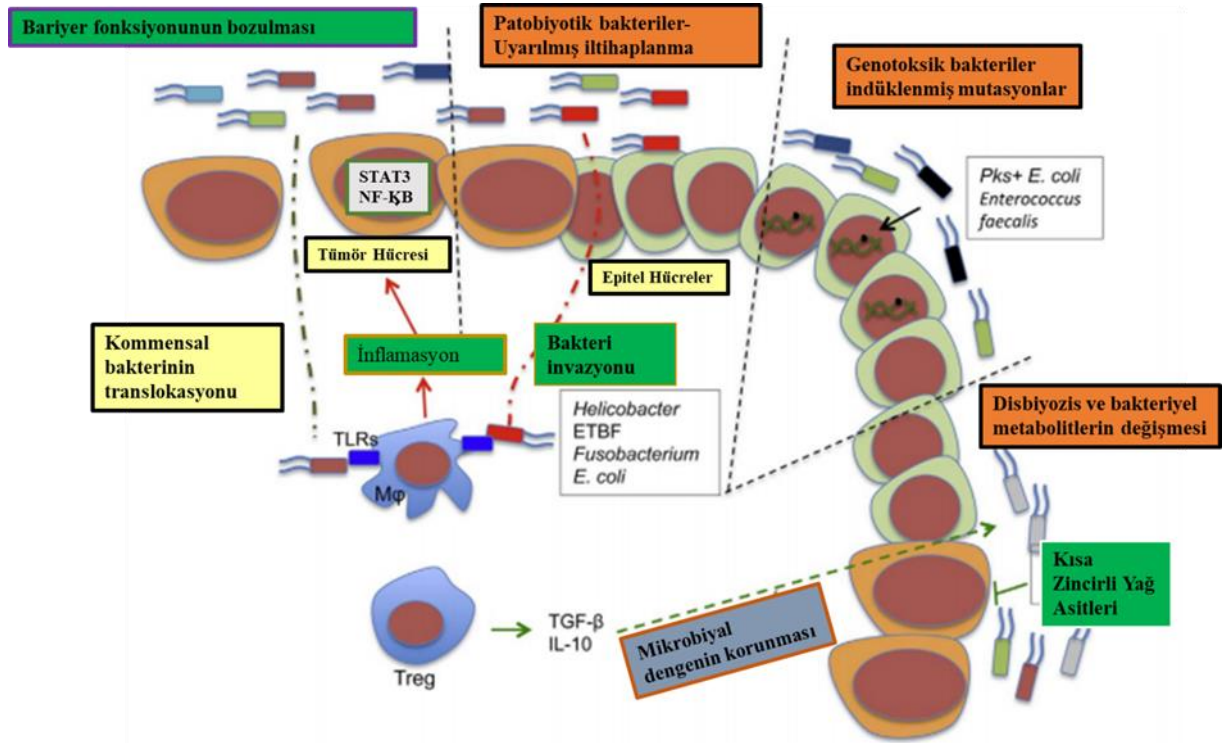
Enfeksiyon, diyet, stres, inflamasyon gibi süreçlerin, mikrobiyota kompozisyonunu etkileyerek ve disbiyozu neden olarak kolon sağlığını olumsuz yönde etkilediği, mikrobiyotaya ait bazı metabolik ürünlerin ise CRC gelişimine karşı koruma sağladığı ve CRC'ye yatkınlığı azalttığı gösterilmiştir (Manzat-Saplacan vd., 2015: 1194).

### **2.3. Bağırsak Mikrobiyotası**

Gastrointestinal sistemin (GI) bir parçası olarak mikrobiyota, konakçı ile doğrudan veya protein, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi salınan ürünler ile dolaylı olarak, doğal reseptörler ve sitoplazmik sensörler aracılığı ile etkileşime girer. Konakçı bağışıklık sistemi ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki fizyolojik etkileşim, patojen kaynaklı enfeksiyonların sebep olduğu, dokuya zarar veren inflamatuvar tepkileri engellemek için önemlidir (Sivamaruthi vd., 2020: 1). Şekil 2'de bağırsak mikrobiyotası ile CRC'nin başlaması ve ilerlemesi arasındaki ilişkiler gösterilmiştir. CRC'nin dışında disbiyoz, patojenik mikroorganizmaları kontrol etmede bir başarısızlığa ve kommensallere karşı düzensiz bir inflamatuvar ve/veya immün tepkiye ve sonuç olarak Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi diğer inflamatuvar bağırsak patojenitelerine sebep olarak, akut ve kronik doku hasarına yol açar (Chen vd., 2017: 482). Disbiyozun önemli bir diğer sonucu ise, patojenik bakterilerce üretilen beta-glukuronidaz ve azoredüktaz gibi enzimlerin artışıdır. Bu enzimler kolonda, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi diyete dahil olan çeşitli karsinojenlerin serbest kalmasına neden olur (Lamichhane vd., 2020: 2). Probiyotik bakterilerin bu enzimlerin salgılanmasını azaltarak bazı diyet yan ürünlerinin karsinojen maddelere dönüştürülmesini sınırladığı, böylelikle de CRC oluşum riskini azalttığı gösterilmiştir (Z. Gao vd., 2015: 6122).

Bağırsak mikrobiyotasının CRC etiyojisine katkısını açıklayan yaklaşımlardan biri bakteriyel sürücü-yolcu modelidir (Bacterial driver-passenger model). Bakteriyel sürücüler, pro-karsinogenik özelliklere sahip intestinal bakterilerdir ki genotoksik ajanların üretilmesi yoluyla DNA hasarı oluşturabilirler. Ya da bir grup bakteriyel sürücü, TH17 tipi inflamatuvar cevabı indükleyerek DNA hasarı ve genomik kararsızlığa neden olabilir. İntestinal bakteriyel yolcular ise sağlıklı bir kolonda kolonizasyonu düşük olan ancak tümör mikro-çevresinde bakteriyel sürücülerle rekabette avantaj sağlayan bakterilerdir. Bu model, yolcu bakteri türlerinin CRC'nin ileri aşamalarında etkin olduğunu öne sürer. CRC'de mikrobiyotada meydana gelen değişimlerin tanımlanması, bakteriyel sürücülerin belirlenmesi ve CRC'nin erken diagnozu ve yeni kanser önleme stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir (Tjalsma vd., 2012: 576).

*In vivo* kanser modelleri disbiyozun, immün ve inflamatuvar yanıtlar aracılığı ile CRC'yi teşvik için yeterli olduğunu önermektedir (Hu vd., 2013: 1). Bu nedenle disbiyozun, bağırsak mikrobiyotası ve CRC arasındaki etkileşimlerde anahtar bir faktör olması muhtemeldir. Fekal veya GI sistem kaynaklı bakterilerin 16S rRNA dizilimi ile incelenmesine dayanan yöntemlerle yürütülen çalışmalarla, CRC'de etkin olduğu önerilen bakteri türleri tanımlanmıştır. Bu türler başlıca; *Streptococcus bovis*, *H. pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium septicum*, *Fusobacterium* spp. ve *Escherichia coli*'dir (Cynthia L ve Wendy S, 2015: 322). Bununla birlikte disbiyozun, CRC'nin bir sonucu olarak ortaya çıkabileceği de önerilmektedir. Buna göre, CRC'de konakçı kaynaklı immün ve inflamatuvar yanıtlar, mikrobiyal regülasyonu etkileyebilen, mikrobiyota kompozisyonunu değiştirebilen ve potansiyel olarak karsinogen etkilere sahip olan spesifik bakterilerin büyümesini destekleyen bir mikro-çevrenin oluşumunu destekleyebilir ve tümör ilişkili belirli bir "temel patojen" örüntüsünün ortaya çıkmasına neden olabilir (Gagnière vd., 2016: 512).



**Şekil 2.2.** Mikrobiyota ve kolorektal kanser

Disbiyozis, patojenik türlerin büyümesi ve çoğalmasıyla ve bağışıklık sisteminin ve mukozal bariyerin homeostazisini bozar. Artmış mukoza geçirgenliğine, bakteriyel translokasyona, immün sistem bileşenlerinin aktivasyonuna neden olarak, kronik inflamasyona neden olur. Disbiyozis, kolorektal adenomlar, kanserin de aralarında bulunduğu inflamatuvar sindirim hastalıkları, obezite, Tip1 diyabet gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Şekil, Chen vd., 2017'den modifiye edilmiştir.

**Kaynak:** (Chen vd., 2017: 2)

## 2.4. Probiyotik

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konağın sağlığı üzerinde avantajlı etkiler gösteren patojen olmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Oelschlaeger, 2010: 59). Probiyotikler, hastalıklara karşı direnci artırarak konakçı üzerinde faydalı bir etki yaratabilmeli, patojenik ve toksik olmamalı, bağışıklık sistemini ve metabolik aktiviteyi konağa faydalı olacak şekilde düzenleyebilmeli, mukozal bütünlüğü koruyabilmeli, düşük pH gibi bağırsak koşullarında hayatta kalarak, bağırsak mikrobiyotasında etkin olabilmelidir. Etkin bir bağışıklık modülasyonu için mukozal ve epitelyal yüzeylere tutunma, patojen tutunmasının ve kolonizasyonunun engellenmesi ve rekabet yoluyla patojenin dışlanması, probiyotiklerin sahip oldukları diğer özellikleridir. Probiyotikler patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, anti-karsinojen ve anti-mutajenik aktiviteye ve kolesterol düşürücü etkilere sahip olan probiyotikler de tanımlanmıştır (Abatenh vd., 2018: 8; Kechagia vd., 2013: 3; Mahasneh ve Mahasneh, 2017: 1678; Pandya, 2016: 12; Yazdi vd., 2017: 186).

Klinik çalışmaların sonuçları, probiyotiklerin GI ile ilgili patolojiler (örneğin irritable bağırsak sendromu, GI bozukluklar, Helicobacter bağlı mide kanseri, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ishaller), alerjik hastalıklar (örneğin atopik dermatit), insülin direnci sendromu, tip 2 diyabet ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde etkili olabileceğini öne sürmektedir. Probiyotiklerin farklı kanser türlerinde profilaktik olarak ya da kanser tedavi sürecinin bir parçası olarak uygulanan tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltmak üzere kullanılabileceği de önerilmiştir (Markowiak ve Ślizewska, 2017: 2).

Kolon kanserinin nedenleri arasına sağlıksız beslenme ve yaşam tarzı, kalıtsal faktörler ve metabolik bozukluklara ek olarak bağırsak mikrobiyotasının bozulması eklenmiştir (Sivamaruthi vd., 2020). Probiyotikler, antimikrobiyal peptitler aracılığı ile ve lümen pH'sını düşürerek ve/veya patojenlerle doğrudan etkileşime girerek patojenik bakterilerin kolonizasyonunu engeller, immünomodülatörler aracılığı ile antitümör bağışıklığı teşvik eder, müsin üretimini ve sıkı bağlantı protein ekspresyonunu artırarak ve epitelyal hücre düzenini destekleyerek CRC'nin önlenmesi ve tedavisi süreçlerine dahil olabilir (Fong vd., 2020: 17). Ek olarak klinik çalışmalar, probiyotik kullanımının CRC tedavi süreçlerinin yan etkileri olarak ortaya çıkan diyare, karın ağrısı, kusma, stomatit, cilt eritemi, atrofi, nöral hasar, vasküler hasar ve bağırsak toksisitesinin şiddetini azalttığını ortaya koymaktadır (Ruotsalainen vd., 2007: 1030).

Belirtilen endikasyonlara rağmen, probiyotiklerin sağlıklı olan insanlar için klinik faydalar sunduğunu kanıtlayan halihazırda büyük, uzun vadeli klinik araştırmalar yoktur (Cohen 2018: 1577). Bununla birlikte probiyotiklerin kullanımı ilgili olarak, bakteriyel translokasyon ve sistemik istila riskinin yanı sıra direnç genlerinin yerleşik mikrobiyotaya potansiyel geçişi ve bu şekilde antimikrobiyal direncin artması gibi güvenlik endişeleri de mevcuttur.

Detaylandırılacak olunursa, probiyotik mikrobiyal suşlarda olası virülans faktörlerinin varlığı; direnç genlerinin bağırsak mikrobiyal popülasyonlarında yayılması; özellikle yeni doğanlarda normal kolonizasyonunu önleyen farklı kolonizasyon modelleri; kadaverin, histamin, tiramin, agmatin ve putresin gibi biyojenik aminlerin probiyotiklerce aşırı üretimine bağlı olarak konakta ortaya çıkabilecek metabolik bozukluklar; alerjik yanıt; ürolojik enfeksiyonlar; sepsis; enfektif endokardit; fırsatçı patojenlere bağlı enfeksiyonlar; iskemi; probiyotik türü, kullanım miktarı ve kullanım süresi ile ilgili klinik bilgilerin yetersizliği; probiyotiklere ait düzenlemelerin yetersizliği ve probiyotik kullanımını sonuçlarına dair kapsamlı ve uzun vadeli klinik bulguların bulunmuyor olması, probiyotik kullanımına dair çekincelerin başında gelmektedir (Appel-da-silva vd., 2017: 16; Doron ve Snyderman, 2015: 130; Ord vd., 2016: 2; Rad, Maleki, vd., 2020: 13).

Probiyotiklerle ilgili olmak üzere bu gibi olası risklerin söz konusu olması, araştırmacıları canlı probiyotik bakterilerin kullanımı dışındaki alternatif uygulamalara yöneltmiştir. Bu tez çalışmasında da bir probiyotik bakteri olarak *Streptococcus salivarius* M18 canlı bakteri formunda kullanılmamış olup, bu probiyotik suşa ait postbiyotik ürünlerin etkinliği incelenmiştir. *Streptococcus salivarius*, ağız boşluğunda doğumdan sadece birkaç saat sonra kolonileşen bir insan komensalidir (Manning vd., 2016: 1). *S. salivarius*'un ağız boşluğunun yanı sıra GI sistem, paranazal sinüsler ve genitoüriner sistemlerde de kolonize olduğu bilinmektedir (Hegarty vd., 2016: 10). *S. salivarius* M18 suşu, ağız boşluğunda kullanım amacı ile üretilen bir probiyotiktir (Hegarty vd., 2016). 2019'da ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), *S. salivarius* M18'in güvenli olduğunu (Generally Recognized As Safe-GRAS; Bildirim No. 807) ve gıda ürünlerinde kullanımının tüketicie zarar vermediği bildirilmiştir (Santagati vd., 2012: 24).

*Streptococcus salivarius*, bir LAB'dir. LAB'leri büyümeleri sırasında, çevrenin pH'sını düşürerek, patojenler de dahil olmak üzere diğer birçok organizma için elverişsiz koşullar yaratan asidik son ürünler üretir. Probiyotik LAB'lerinin patojen inhibitör aktivitesi çoğunlukla organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler (BLIS'ler) dahil olmak üzere çeşitli metabolitlerden kaynaklanır. Bakteriler, mantarlar, hayvanlar ve bitkiler dahil olmak üzere canlı organizmalar, antimikrobiyal proteinler (AMP'ler) olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı konakçı savunma peptitleri üretir (Tunçer ve Karaçam 2020: 2835).

Bakteriyel AMP'ler ribozomal olarak sentezlenmemiş AMP'ler, bu AMP'leri kodlayan yapısal genler ve ribozom olarak sentezlenmiş AMP'ler yani bakteriyosinler (antimikrobiyal aktivite sergileyen geniş bir salgılanmış peptid ailesi) olarak sınıflandırılabilir. Bakteriyosinler, *S. salivarius* dahil olmak üzere farklı LAB türleri tarafından da üretilir ve hem Gram-negatif hem de Gram pozitif gruplardan taksonomik olarak yakın veya ilgisiz diğer bakterileri inhibe edebilir veya öldürebilir. Proteolitik enzimler tarafından kolayca parçalanabilirler ve parçalanma fragmanları insan vücudunda veya çevrede uzun ömürlü değildir; bu nedenle hedef suşların, antibiyotik direncinin gelişmesinin arkasındaki yaygın nedenlerden biri olan bozulmuş antibiyotik fragmanları ile etkileşime girme fırsatını en aza indirilebilir. Buna göre, bakteriyosinlerin, patojenik bakterilerin dirençli hale geldiği antibiyotiklerin yerine kullanılması da önerilmektedir (Tunçer ve Karaçam 2020: 2842). Bakteriyosinlerin fiziksel stabilitelerine ek olarak yukarıda bahsedilen özellikleri onları, antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisi, kanser hücrelerinin seçici olarak öldürülmesi gibi insan sağlığından gıda endüstrisine uzanan çeşitli uygulamalar için çekici kılmaktadır. Modifiye edilmiş amino asit lantiyonin içeren bakteriyosinler, lantibiyotikler olarak adlandırılır. Lantibiyotikler, Gram-pozitif bakterilere karşı aktif olan antimikrobiyal peptitlerdir, ancak çoğu Gram-negatif bakteriye karşı nispeten zayıf aktivite gösterirler. *S. salivarius* bakteriyosinleri, salivarisin olarak adlandırılır (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2829). *S. salivarius* M18, salivarisin A2, 9, MPS ve M olmak üzere dört bakteriyosin içerir (Wescombe vd., 2006: 1295). İyi karakterize edilmiş bakteriyosinler olan, salivarisin A2 ve 9, *S. pyogenes* ve üst solunum yolunu enfekte eden diğer patojenlere karşı etkilidir ve salivarisin MPS, daha az karakterize olmakla birlikte, *S. pyogenes*'e karşı aktivite göstermiştir. Salivarisin M, mutans streptokoklara karşı aktiftir (Heng vd., 2011: 6402).

*S. salivarius* M18'in anti-patojen etkisi, esas olarak diş çürüklerinin gelişimi ile ilişkili olduğu varsayılan bakteri türleri kullanılarak araştırılmıştır ( Santagati vd., 2012: 28). *S. salivarius* M18'in *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactecalactiae*, *Streptococcus agalacteciae*, *Staphylococcus cohnii* ve *Staphylococcus saprophyticus* gibi çok çeşitli burun, ağız ve boğaz patojenini inhibe ettiği gösterilmiştir (Wescombe vd., 2012: 1362). Aynı zamanda ürettiği dekranaaz ve ureaz enzimleri ile diş yüzeylerinde plak oluşumunu önlediği bildirilmiştir (Heng vd., 2011: 1366).

Bu az rastlanır geniş patojen inhibisyon spektrumu *S. salivarius* M18'in, ağız boşluğuna ek olarak başka enfeksiyonlarında etkili patojenlerin büyümesini de sınırlayabileceğini ve böylelikle konağa ek faydalar sağlayabileceğini düşündürmüştür. Destekler şeklinde bu tez kapsamında laboratuvarımızca yürütülen çalışmalarda literatürde ilk kez olmak üzere, *S. salivarius* M18 hücreli süpernatantının, iki Gram-negatif insan patojeni *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* üzerinde de inhibe edici bir aktiviteye sahip olduğunu ve aynı zamanda *P. aeruginosa*'da antibiyofilm etkisinin olduğunu gösterilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2836). *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*, özellikle bağışıklığı zayıflamış kişilerde bakteremi, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen Gram-negatif fırsatçı patojenlerdir (El-Mokhtar vd., 2020: 544). Her iki patojen aynı zamanda biyofilm oluşturma potansiyelleri ile bilinmektedir. Biyofilmlerdeki bakteriler bağışıklık tepkilerine ve antimikrobiyal tedaviye aşırı toleransa sahip olmaları açısından planktonik bakterilerden farklıdır. Bu nedenle biyofilm oluşumu, kronik enfeksiyonların tedavisinde daha yüksek dozlarda antibiyotik ve daha uzun süreli tedavi gerektirir (Wannigama vd., 2020: 1).

## 2.5. Prebiyotik

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) / Dünya Sağlık Örgütü (WHO) prebiyotikleri, mikrobiyotayı modüle ederek konakçıya sağlık yararları sağlayan gıda bileşeni olarak tanımlar (Pandey vd., 2015: 7578). Bir gıda içeriğinin prebiyotik olarak değerlendirilmesi için üst GI sistemde hidrolize veya absorbe edilmemesi, Bifidobakteriler ve laktobasil gibi faydalı bakterilerin kolonizasyonunu teşvik etmesi ve konağın sağlığına faydalı fizyolojik etkiler oluşturması gereklidir (Departamento vd., 2015: 102).

Laktuloz, inülin, frukto-oligosakkaritler (FOS), galakto-oligosakkaritler (GOS) ve anne sütü oligosakkaritleri (HMO) genel olarak kabul görmüş prebiyotikler arasındadır (Míguez vd., 2016: 302). Prebiyotik ve probiyotiklerin birlikte kullanımı "sinbiyotik" olarak adlandırılır. Sinbiyotik kelimesi sinerjizmi ima ettiğinden bu terim, prebiyotik bileşiğin / bileşiklerin seçici olarak probiyotik organizma(lar)ı tercih ettiği ürünler için kullanılır (Pandey vd., 2015: 7782). Prebiyotikler bağırsaktaki spesifik bakteriyel popülasyonların artmasına olanak tanımalarının yanı sıra, bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilerek bütirik asit ve propiyonik asit dahil olmak üzere fizyoloji üzerinde yararlı etkileri bulunan kısa zincirli yağ asitlerini (SCFA'lar) üretirler. SCFA'lar kan dolaşımına katılabilir ve böylece sadece GI sistemi değil, aynı zamanda diğer organlarını da etkileyebilir (Davari vd., 2019: 2).

Kısa zincirli şekerler söz konusu olduğunda ki bunlar disakkaritler olan sukroz, maltoz ve laktoz gibi moleküllerdir, aradaki glikozidik bağın yıkımı ve monosakkaritlerin oluşumu söz konusudur. Nişasta ise sindirilme anlamında disakkaritlerden farklıdır. Nişasta  $\alpha$ -D-glukoz ünitelerinden oluşsa da bu ünitler  $\alpha$  (1-4) bağı ile bağlı uzun lineer amiloz zincirleri ya da  $\alpha$  (1-6) bağı ile daha kısa amiloz zincirleri oluşturabilir. Nişastaların %70 kadarı dallanmış amilopektin yapıdadır. Hem amiloz hem de amilopektinin yapısındaki uzun glukoz üniteleri, nişasta zincirleri arasında interaksiyona neden olarak bölgesel psödokristalin bölgeler oluşturarak, amilaz enziminin sterik olarak ulaşmasını engelleyebilir (Ai ve Jane, 2018: 162). Genel olarak, sindirilebilir nişastalar ince bağırsakta  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz ve sükraz izomaltaz tarafından parçalanır ve sonrasında emilir. Ancak, diyetteki tüm nişastaların parçalanması ve ince bağırsakta emilimi yapısal nedenlerden dolayı söz konusu değildir. Bu nedenle bu karbonhidratlar gastrointestinal sistemden geçerken sindirilmeden kalır ki bu tip nişastalar "dirençli nişasta; Resistant Starch-RS" olarak adlandırılır. Dirençli nişasta (RS), prebiyotik olmasından ve kilo kontrolü ve kan glukoz düzeyinin kontrolünü sağladığından dolayı fonksiyonel bir nişasta türüdür (Kasote ve Nilegaonkar, 2014: 3; Li vd., 2011: 1705). RS dört grupta sınıflandırılır: R1-R4 (Sajilata vd., 2006: 5). RS1, amilolizize imkan vermeyecek şekilde organize olmuştur; hücre duvarı ve besin matriksinde bulunur. RS2 granüler formdaki nişastadır ve enzim sindirimine dayanıklıdır. RS3, jelatinleştirilmiş nişastanın soğutulması sonucu ortaya çıkan (retrograded) kristalin granül olmayan nişastadır. RS4 grubu nişastalar ise kimyasal olarak değiştirilmiş veya yeniden polimerize edilmiş nişastaları içerir (Fuentes-Zaragoza vd., 2011: 407;Sajilata vd., 2006: 6).

İnsan genomu sınırlı sayıda glikozid hidrolaz kodlar; bununla birlikte polisakkarit liyazları kodlamaz. Polisakkarit liyazlar topluca "karbonhidrat aktif enzimler carbohydrate-active enzymes-CAZymes" olarak adlandırılır (Cantarel vd., 2012: 1). İnülin ve oligofruktoz, hindiba, soğan, pırasa, sarımsak, kuşkonmaz, muz ve enginar gibi çeşitli yiyeceklerde bulunur. Bir ucunda bir glikoz alt birimi olan veya olmayan doğrusal bir fruktoz zincirinden oluşan fruktanlardır. İnülinin zincir uzunluğu 2–60 fruktoz veya glikoz alt birimidir, oligofruktoz ise inülinin enzimatik hidroliz ürünüdür ve zincir uzunluğu 2–20 alt birimdir. Fruktoz alt birimlerini birbirine bağlayan bağlar, insan ince bağırsağındaki enzimler tarafından parçalanamaz. Sonuç olarak, inülin ve oligofruktoz, bifidojenik etkiye sahip oldukları bilinen kalın bağırsağa ulaşır (Clark vd., 2012: 439). Bu nedenden dolayı RS, inülin, lignin, pektin, selüloz ve FOS gibi glikanlar, kalın bağırsağa sindirilmemiş formlarında ulaşır. Halbuki insan genomunun aksine, mikrobiyom onbinlerce tip CAZym kodlar (Cantarel vd., 2012: 1).

Glikanların parçalanması ile ortaya çıkan glikozun mikrobiyom üyeleri tarafından fermentasyon ile bozumu sonucu asetat, propiyonat, format, bütirat, laktat ve süksinat gibi SCFA'lar oluşur. Fermentasyon sonucu oluşan hidrojen gazı ise bağırsaktaki sülfat indirgeyici bakteriler, metanojen ve asetojenler tarafından kullanılır (Sonnenburg, 2012: 337).

## 2.6. Postbiyotikler

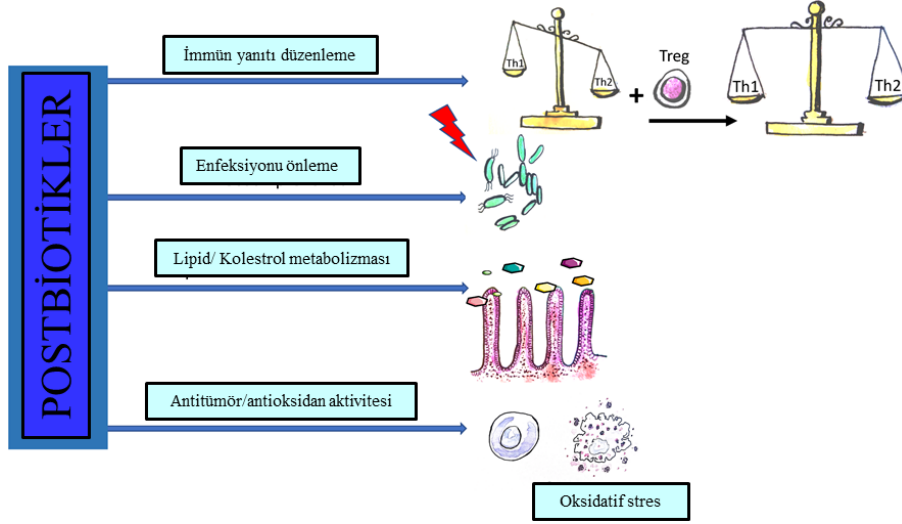
"Postbiyotik" terimi, canlı probiyotik bakteriler tarafından hücre dışına salınan metabolitleri ve/veya hücre ve hücre duvarı ile ilişkili biyomolekülleri ifade eder. Son yıllarda hem klinik, hem teknolojik hem de ekonomik açılardan, canlı probiyotik mikroorganizmaların kullanıma alternatif potansiyel yaklaşımların geliştirildiği görülmektedir. Bu yaklaşımlardan biri prebiyotik olarak sindirilmeyen liflerin tüketiminin teşviki iken bir diğeri "postbiyotik" olarak adlandırılan mikrobiyal türevli biyomoleküllerin kullanımınıdır. Probiyotiklerle ilgili olarak "cansız" fraksiyonları özellikli olarak ifade etmek için postbiyotik teriminin yanı sıra, "biyojenik", "hücresiz süpernatant", "abiyotik", "metabiyotik", "paraprobioyotik", "hayalet probiyotikler" ve "psödoprobioyotik" terimleri de kullanılmaktadır (Rad, Aghebati-maleki, vd., 2020: 2). Postbiyotik bileşenler, proteinleri (laktosepin, p40, p75 gibi çözünür proteinler), lipidleri (butirat, propiyonat, asetat, laktat, dimetil asetil türevli plazmalojen), karbonhidratları (galaktoz açısından zengin polisakkaritler ve teikoik asitler), organik asitleri (propiyonik ve 3-fenil laktik asit), vitaminleri (B grubu vitaminler) ve lipoteikoik asitler ve peptidoglikan türevi muropeptitler gibi karmaşık molekülleri kapsar (Tsilingiri ve Rescigno 2013: 1009).

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan probiyotikler kendi türündeki başka yararlı bakterilerin artışını teşvik edecek ve / veya bakteriler arası iletişimasyonu sağlayacak moleküller salgılayabilir, bu moleküller ayrıca konakta hücresel fonksiyonlar ve metabolik yolları etkileyerek biyolojik fayda sağlayabilir (Fong vd., 2020: 2; Rad, Aghebati-maleki, vd., 2020: 2). Örneğin *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ve *Bifidobacterium breve*'nin hücresiz süpernatantlarının TLR (Toll-like receptor) aktivasyonuna bağlı inflamasyonu engellediği ve bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Bermudez-brito vd., 2013: 1; J. Gao vd., 2019: 477; Marco vd., 2018: 4). GI sistemini kaplayan mukus tabakası, enfeksiyon ve yaralanmaya karşı ilk bağırsak savunması görevi görür (Wang vd., 2014: 20234). EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) aktivasyonunun goblet hücrelerinde müsin üretimini arttırdığı bilinmektedir. *Lactobacillus rhamnosus* GG'den türetilen p40 adlı çözünür bir proteinin sitokin kaynaklı epitel apoptozu ve dolayısıyla bağırsak bariyeri bozulmasını inhibe ettiğini ve EGFR'nin transaktivasyonu yoluyla immünoglobulin A sekresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Fong vd., 2020: 4930).

*Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* süpernatantlarının proinflamatuvar TNF- $\alpha$  (Tümör Nekroz Faktörü  $\alpha$ ) sitokin salgılanmasını azaltarak ve anti-inflamatuvar sitokin salgılanmasını artırarak intestinal epitel hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller üzerinde anti-inflamatuvar ve antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Marco vd., 2018: 9). Bir diğer çalışmada *Lactobacillus sp.*'nin hücresiz süpernatantının kolorektal hücre invazyonunu azalttığı belirtilmiştir (Escamilla vd., 2012: 871). Bu çalışmaların verileri göstermektedir ki bazı probiyotik hücresiz süpernatantları antitümör etki göstererek belirli kanserlerin önlenmesinde ya da tedavisinde kullanım potansiyeline sahiptir (Amaretti vd., 2013: 812).

Postbiyotiklerle ilgili olarak yapılan araştırmalar son dönemde artış gösterirken, terapötik etkiden sorumlu metabolit ve / veya metabolitlerin tanımlanması önemli olmakla birlikte güçtür ancak söz konusu metabolitlerin ve etkin olduğu moleküler mekanizmaların tanımlanması ve bu metabolitlerin klinik uygulamalarda kullanılmak üzere izolasyonu ve üretimi de oldukça sofistike aşamaları kapsayacaktır (Fong vd., 2020: 4). Kanser gibi hedefli terapötik yaklaşımların gereksinime ihtiyaç duyulduğu düşünüldüğünde, bu moleküllerin tümör seçiciliği ve risk-yarar konseptinde güvenilirliği de önemlidir.

Mevcut klinik literatürde, doğuştan veya edinilmiş bağışıklığın zayıf olduğu durumlarda, kalp anomalilerinde, kemo ve radyoterapilerde, cerrahi uygulamalar sonrasında, HIV enfeksiyonunda, organ nakli sonrasında, otoimmün hastalıklarda, nötropeni, antibiyotikle ilişkili diyare ve aktif ülseratif kolit varlığında, istenmeyen yan etkilere neden olabileceğinden dolayı probiyotik kullanımına karşı uyarıda bulunan çalışmalar mevcut olup, bu çalışmalar probiyotik kullanımında risk-yarar dengesinin önemine işaret etmektedir (Lerner vd., 2019: 104 ; Rad, Aghebati-maleki, vd., 2020: 4). Oysa ki belirli probiyotikler için, görülen olumlu etkiye neden olanın canlı bakteri değil, bu bakterilere ait hücresiz kültür süpernatantları olduğu belirlenmiştir (Konstantinov vd., 2013: 742) ki bu sonuçlar probiyotiklerle ilgili olmak üzere konağın sağlığı üzerindeki yararlı etkilerin her zaman canlı bakteri varlığını gerektirmediğini ortaya koymaktadır.



**Şekil 2.3.** Postbiyotiklerin etki mekanizmaları

Postbiyotikler pleiotropik özellikler gösterir. T düzenleyici lenfositlerin farklılaşmasının induksiyonu ve anti-enflamatuvar sitokinlerin sentezine bağlı olarak, postbiyotikler, Th1 ve Th2 lenfositleri tarafından temsil edilen iki ana bağışıklık sistemi kolu arasındaki dengesizliği onarır. Th1 ve Th2 lenfositleri arasındaki denge, immüno-regülasyon için hayati öneme sahiptir ve bozukluğu, atopik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli immün hastalıklara neden olur. Antibakteriyel aktiviteye muhtemelen postbiyotiklerin enterositlerin moleküler yapısı üzerindeki etkisi aracılık eder ve bu da bağırsak bariyerinin kapatılmasına neden olur. Postbiyotiklerin "Statin benzeri" aktivitesi ve metabolik ve ilgili hastalıklarda gelecekteki terapötik uygulaması büyük ölçüde tahmin edilmektedir. Şekil Marzec ve Feleszko, 2020 makalesinden modifiye edilmiştir.

**Kaynak:** (Marzec ve Feleszko, 2020).

Şekil 2.3'te postbiyotiklerin etkilediği süreçler yer almaktadır (Marzec ve Feleszko, 2020: 8). Buna göre postbiyotikler bağırsak epitelinin korunmasını sağlarken, immün düzenleyici ve anti-tümör etkiler gösterebilirler. Bağırsak mikrobiyotasına ait ürünlerin immünomodülatör etkileri son zamanlarda yoğunlukla çalışılan konulardan biridir. Örneğin, SCFA'ler olarak bütirat ve propiyonatın, sırası ile bağırsakta ve periferdeki düzenleyici T hücrelerini (Treg'ler) arttırdığı gösterilmiştir. *Lactobacillus casei* ATCC334'ün kültür süpernatantının kolon kanseri hücreleri üzerinde güçlü bir tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Konishi vd., 2016: 7). İnflamasyon, karsinogenez ile ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğundan, inflamasyonu engelleyen herhangi bir ajan da anti-kanser potansiyele sahip olabilir. Örneğin *L. lactis* NCDO 2118'in kültür süpernatantlarının, bir CRC hücre hattı olan Caco-2 hücrelerinde IL-1 $\beta$  ile indüklenen IL-8 sekresyonunu azaltabildiğinden, inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) tedavisinde kullanılabileceği önerilmiştir (Luerce vd., 2014: 33). Bir başka postbiyotik ürün olarak SCFA'lar ise immün düzenleyici fonksiyonlarının yanı sıra epigenetik modifikasyonlar yoluyla onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesini etkileyerek anti-kanser etki gösterebilirler (Corcos, 2012: 7).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları

**Tablo 3.1.** Kullanılan bakteriyel suşlar ve kaynakları

Kullanılan Bakteriler	Kaynak
<i>Streptococcus salivarius</i> M18 (BLIS M18™)	Blis Technologies (New Zealand)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	American Type Culture Collection-ATCC (Manassas, Virginia, USA)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	ATCC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	ATCC

Bu çalışmada kullanılan bakteriler olarak *S. salivarius* M18, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2827) triptik soya besiyeri (TSB, Kazein 17 g/L, Soya peptonu 3 g/L, Sodyum klorür 5 g/L Dipotasyum fosfat 2.5 g/L, Dekstroz 2.5 g/L, Merck Cat No: M105459.0500) ortamında orbital olarak çalkalanarak ya da TSB içine agar eklenerek hazırlanan agar plakalarda 37°C'de kültürlenmiştir. Bakterilerle inoküle edilmeyen ancak aynı koşullar altında inkübe edilmiş besiyeri (TSB), deneylerde “sadece besi yeri (Only medium-OM) kontrolü” olarak kullanılmıştır. Belirtildiği durumlarda *S. salivarius* M18, inülin ve tapyoka nişastasının TSB içinde % 0.5 ve % 1.0 (v/w) oranları ile inkübe edilmiştir. İnokülasyondan önce inülin ve tapyoka nişastası içeren besi yerleri 120°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilmiştir. Prebiyotiklerin kullanıldığı deneylerde OM kontrolü olarak % 0.5 veya % 1.0 tapyoka nişastası veya inülin içeren TSB besiyeri kullanılmıştır. Süpernatant eldesi için, gece boyunca büyütülen *S. salivarius* M18 kültürlerinin optik yoğunlukları 600 nm'de (OD) 0.1'e ayarlanmış, çalkalamalı inkübatör (160 rpm) kullanılarak 37°C'de 24 saat süreyle büyütülmüştür. İnkübasyon boyunca minimal oksijenlenme koşullarının sağlanması için bakteriler hava kalmayacak şekilde besi yeri ile doldurulmuş ve kapakları sıkıca kapatılan ve parafilmelenen tüplerde büyütülmüştür (Gurbanov vd., 2020; 1).

#### 3.2. Hücre İçermeyen Süpernatantların Toplanması

24 saatlik inkübasyonun sonunda kültürler, süpernatantları toplamak için 4°C, 5000 rpm'de (1844 xg) 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş, ardından 0.22 µM PES membran filtreler kullanılarak steril edilmiştir. Hüresiz süpernatantlar ya hemen kullanılmıştır ya da alikotlanarak daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

### 3.3. Patojen Büyüme İnhibisyonu Deneyleri

Bu tez çalışmasının bir parçası olarak *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının *P. aeruginosa* veya *K. pneumoniae* patojenleri üzerindeki etkileri yakın zaman önce yayınlanan çalışmamızda belirtildiği şekilde araştırılmıştır (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2827). Bunun için, gece boyu inkübe edilen patojenler  $10^6$  koloni oluşturan birim CFU/mL olacak şekilde seyreltilerek, 96 kuyulu düz tabanlı polistiren hücre kültürü plakalarında (Nest Scientific, Maryland, ABD) her bir kuyuda  $100 \mu\text{L}$  *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı (SsM18 sup.) veya probiyotik bakteri ile inoküle edilmemiş TSB besi yeri (OM) içerisinde,  $37^\circ\text{C}$ 'de 8 saat veya 24 saat boyunca çalkalamadan inkübe edilmiştir. Ortam pH'sının süpernatantın patojen büyüme üzerindeki etkisini araştırmak için, sırasıyla steril 1.0 N NaOH solüsyonu veya steril 1.0 N HCl solüsyonu kullanılarak *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatant ortamının pH'sı 7.0'ye veya OM ortamının pH'sı 5.0'e ayarlanmıştır. pH'ın ayarlanmadığı durumda eşit hacimde steril  $\text{dH}_2\text{O}$  (% 2.0 v/v) eklenmiştir. Antibiyotik duyarlılığını değerlendirmek için ise, *P. aeruginosa* ( $10^6$  CFU/mL) veya *K. pneumoniae* ( $10^6$  CFU/mL), belirtilen miktarda Sefoperazone sodyum tuzu (CPZ; Kat no: C4292) içeren *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, absorbanslar  $\text{OD}_{600}$ 'de çok kuyucuklu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Bakteri ile inoküle edilmemiş besi yerinin 600 nm'de optik yoğunluğu blank olarak kullanılmıştır. Damlatma testleri için ise, *P. aeruginosa* veya *K. pneumoniae*, 96 kuyulu plakalarda CPZ varlığında veya yokluğunda *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı (veya kontrol büyüme ortamı; OM) ile inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda patojenler TSB içerisinde belirtilen oranlarda seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ve seyreltilmemiş bakterilerin  $3.0 \mu\text{L}$ 'si, TSA petrilere damlatılmış ve agar petrilere gece boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Petrilere GeneSys yazılımına sahip G: BOX (Syngene, İngiltere) görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

### 3.4. Patojen Biyofilm Deneyleri ve Yüzeye Tutunma Kabiliyeti Analizi

*P. aeruginosa* biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilen patojen bir bakteridir ve biyofilm oluşumu için model olarak kullanılmaktadır (Pericolini vd., 2018: 2). *S. salivarius* M18 suşunun hücresiz süpernatantının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine etkisi, statik biyofilm modeli kullanılarak incelenmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2828).

Özetle, *P. aeruginosa* ( $10^6$  CFU/mL), 96 kuyulu düz tabanlı polistiren hücre kültürü plakalarında (Nest Scientific) 24 saat kültürlenmiş *S. salivarius* M18'den elde edilen 100 µL hücresiz süpernatanta inoküle edilmiş ve plakalar 37°C'de çalkalanmadan 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besi yeri uzaklaştırılmış ve kuyular, planktonik bakterileri uzaklaştırmak amacı ile üç kez dH<sub>2</sub>O ile yıkanmıştır. Fiksasyon için kuyulara 150 µL metanol eklenmiş ve plakalar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Metanolün uzaklaştırılmasını takiben kuyuların kuruması beklenmiştir. Her bir kuyuya 130 µL % 0.1 (w/v, dH<sub>2</sub>O içinde) kristal viyole (crystal violet-CV) solüsyonu ilave edilmiştir ve plakalar, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Boyayı uzaklaştırmak için plakalar dH<sub>2</sub>O içeren kaplara daldırılarak yıkanmıştır. Havayla kurutulduktan sonra CV'yi çözmek için her kuyuya 130 µL % 30 asetik asit (v/v, dH<sub>2</sub>O içinde) ilave edilmiştir. Her boyanmış kuyunun OD'si, 550 nm'de çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. İnoküle edilmemiş kültür ortamı içeren kuyular, blank olarak kullanılmıştır. Biyofilm, materyallerin veya dokuların yüzeyine yapışan bir mikroorganizma koleksiyonudur. Bu mikroorganizmalar, hücre dışı bakteriyel DNA, proteinler, ekzopolisakkaritler ve enzimlerden oluşan, bir hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matrisine gömülüdür (Tran vd., 2018: 2). Tez çalışmasında probiyotik hücresiz süpernatantının biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak *P. aeruginosa*'nın yüzeye tutunma kabiliyetine etkisi, DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) boyamasıyla araştırılmıştır. Önceden sterilize edilmiş lameller, 6 kuyulu bir plakanın kuyularına yerleştirilmiştir. Her bir kuyuya *S. salivarius* M18'in hücresiz süpernatantı (veya kontrol büyüme ortamı; OM) içerisinde *P. aeruginosa* ( $10^6$  CFU / ml) eklenmiştir. 37°C'de 24 saat çalkalamasız inkübasyonun sonunda planktonik hücreler uzaklaştırılmış ve kuyular üç kez PBS ile yıkanmıştır. Lameller, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 5 µM DAPI ile inkübe edilmiştir. Üç kez PBS yıkamasını takiben lameller lam üzerine alınmış ve oje kullanılarak kapatılmıştır. Preparatlar, DAPI filter U-FUNA (eksitasyon: 358 nm, emisyon: 461 nm; Olympus) filtresine sahip floresan mikroskobu (Olympus BX53, Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir. DAPI boyalı numunelerin görüntüleri 100X büyütmede alınmış ve floresan intensiteleri ImageJ (NIH) kullanılarak analiz edilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2828).

### 3.5. Kongo Kırmızısı Deneyi

*S. salivarius* M18 süpernatantı ile inkübe edilen *P. aeruginosa*'da ekzopolisakkarit üretimindeki değişiklikleri belirlemek için, Kongo kırmızısı testi kullanılmıştır. Kongo kırmızısı agar petripleri, tripton (10 g/L) ve % 1.0 (w/v) agardan oluşan otoklavlanmış besi yerine, steril Kongo kırmızısı (40 µg/mL) ve Coomassie brillant mavi G250 (20 µg/mL) eklenerek hazırlanmıştır. 200 µL *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı (veya kontrol büyüme ortamı), Kongo kırmızısı petrilere yayılmış, ardından 3.0 µL *P. aeruginosa* ( $4 \times 10^8$  CFU/mL) agar yüzeylerine damlatılmıştır. 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyon sonunda oluşan koloniler, stereomikroskop (LEICA DM750, Wetzlar, Almanya) kullanılarak gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir. Kongo kırmızısı yoğunluğunun kantifikasyonu için ImageJ programının (NIH, ABD; <https://rsbweb.nih.gov/ij/>) renk eşiği aracı, spot alanı ölçümlere katılarak kullanılmıştır. Görüntünün renk eşiği aşağıdaki parametreler kullanılarak ayarlanmıştır: ton = 0–255, doygunluk = 0–255, parlaklık = 130–255, eşik rengi = kırmızı, arka plan = koyu ve renk alanı = HSB (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2828).

### 3.6. Kanser Hücrelerinin Büyütülmesi, Alt-Kültürlemesi ve Dondurulması

Tez çalışmasında insan CRC epitel hücre hatları HCT-116 (DSMZ, Almanya) ve SW-480 (ATCC) ile sağlıklı göbek kordonu endotel hücre hattı HUVEC (ATCC) kullanılmıştır. HCT-116 ve SW-480, % 10 FBS (Fetal Sığır Serumu), % 2.8 (v/v) NaHCO<sub>3</sub> (stok % 7.5 w/v) ve % 1 pen/strep ile takviye edilerek hazırlanan, dH<sub>2</sub>O'da çözünen (10.5 g/L) NaHCO<sub>3</sub> içermeyen ve pH'sı derişik HCl kullanılarak 7.5'e ayarlanan RPMI-1640 toz besi yerinde (Kat. No: 11-100; Biological Industries, İsrail) büyütülmüştür. Tümör mikro çevresinin mimik edildiği deneylerde CRC hücrelerinin süpernatant ile muamelesinde pH 5.5 RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. pH 5.5 için gerekli NaHCO<sub>3</sub> miktarı, Henderson-Hasselbalch Denklemi (% 5 CO<sub>2</sub> ortamında) ile belirlenmiştir; buna göre pH 7.5 için 1 L'lik tam RPMI-1640 büyüme ortamına 33 µL derişik HCl, pH 5.5 için ise 73.3 µL derişik HCl eklenmiştir. 0.22 µM PES-filtre kullanılarak besiyeri sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. HUVEC hücre hattı ise 2 mM L-Glutamin, %1 pen/strep, %10 FBS ile takviye edilen DMEM (Kat. No: 01-053-1A; Biological Industries, İsrail) besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Hücreler, % 95 hava, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, 37°C'de büyütülmüştür. Tripsin-EDTA (% 0.05), alt kültürleme veya hücre toplanması sırasında hücreleri yüzeyden ayırmak için kullanılmıştır.

Hücre metabolizmasının tayini, hücre canlılığının belirlenmesi ve protein eldesi deneylerinde kullanılmak üzere hücre ekimi için hücreler, tripsin muamelesi ile kaldırılmış ve tripsinin besiyeri ile inhibisyonunu takiben 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından taze besi yeri içinde süspansiyon edilen hücreler tripan mavisi kullanılarak thoma lamında sayılmış, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) indirgenme deneyleri için 96 kuyulu plakanın her bir kuyusunda  $10 \times 10^3$  hücre, hücre canlılığı ve protein eldesi deneyleri için ise 12 kuyulu plakanın her bir kuyusunda  $50 \times 10^4$  hücre olmak üzere ekim yapılmıştır. Ertesi gün hücreler Metod 3.2'de anlatıldığı gibi elde edilen süpernatantlar ile inkübe edilmiştir.

Deneyleerde 30 pasajın üzerinde hücre kullanılmamıştır (Rosenthal vd., 1977: 150). Hücreler %5 DMSO içeren soğuk besiyeri içinde vial kapaklı tüplere aktarıldıktan sonra -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.7. Bağırsak Epitel Bariyer Modelinin Oluşturulması**

Bağırsak epitel bariyer modeli daha önce tanımlandığı şekli ile spontan farklılaşma modeli kullanılarak oluşturulmuştur (Tunçer ve Banerjee, 2017). Caco-2 , (ŞAP Enstitüsü, Ankara, Türkiye) hücreleri, % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin, 1X-NEAA (Esansiyel Olmayan Amino Asitler) ve 1 mM sodyum piruvat içeren EMEM-Minimum Essential Medium'da, 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütülmüştür. En çok %70 konfluensi halindeki hücreler alt kültürlenmiştir.

Spontan hücre farklılaşması 12 kuyulu plakada yapılmıştır. Hücreler, iki gün sonrasında % 100 konfluensiye ulaşmak üzere yaklaşık  $3.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  olacak şekilde ekilmiştir. %100 konfluensiye ulaşılan gün 0. gün olarak kabul edilmiştir. Takip eden 10 gün boyunca her iki günde bir besi yeri yenilenmiştir (Tunçer ve Banerjee, 2017). 10 günlük spontan farklılaşmanın sonunda hücre farklılaşmasının doğrulanması için farklılaşan ve farklılaşmayan (prolifere olan) hücrelerdeki CEA (Karsino Embyonik Antijen) ifadesi (Tunçer ve Banerjee, 2017; Tunçer vd., 2019: 19; Tunçer vd 2020: 6) sonraki bölümlerde belirtildiği şekli ile western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının bariyer bütünlüğünü etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi amacı ile 10 günlük farklılaşma süresinin sonunda farklılaşan ve proliferasyon durumundaki (farklılaşmamış) hücreler CV ile boyanmıştır. CV boyaması Herzog et al. tarafından belirtildiği gibi, ancak bazı modifikasyonlar uygulanarak yapılmıştır (Herzog vd., 2008. 5).

Bunun için farklılaşan hücrelerin bulunduğu kuyulardan besi yeri uzaklaştırılmış ve kuyulara %20 (v/v) oranında OM ve SsM18 sup eklenmiştir. 2 ve 4 saatlik inkübasyon sonunda OM veya SsM18 sup içeren besi yeri uzaklaştırılmış, farklılaşmış ve farklılaşmamış (proliferasyon halinde, ~%70 konfluent) hücrelerin bulunduğu kuyular oda sıcaklığındaki PBS ile yıkanmıştır. PBS'in uzaklaştırılmasını takiben hücreler %4 formaldehit (PBS içinde) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Formaldehit uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanmış ve her kuyuya % 0.2 (v/w, dH<sub>2</sub>O içinde) CV (Sigma-Aldrich) eklenerek, plakalar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda CV uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamada kuyular fotoğraflanmıştır. Kantitatif veri eldesi için kuyulardaki CV, 2 ml %1 SDS (v/w, dH<sub>2</sub>O içerisinde) ile çözülmüştür. %30 CV %70 SDS (%1) oranlarında dilüsyon yapılan örneklerdeki renk yoğunluğu, 550 nm'de, çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.8. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Deneyi**

*S. salivarius* M18 suşunun hücre metabolizmasında neden olduğu değişiklikler, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) indirgenme deneyi ile araştırılmıştır. Bu kolorimetrik test, sarı bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen, NAD (P) H'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimlerini içerir. Bu indirgenme, yalnızca mitokondriyal redüktaz enzimleri aktif olduğunda gerçekleşir (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>). Bu formazan kristalleri uygun bir çözeltisi kullanılarak çözdürülür ve renk değişimi 500-600 nm'de ölçülür. Çözelti ne kadar koyu olursa, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olur (Mosmann, 1983: 59).

MTT deneyi için 96 kuyulu plakanın her bir kuyusunda  $10 \times 10^3$  hücre/100 µl olacak şekilde ekilen hücreler, deney günü OM ya da SsM18 sup ile muamele edilmiştir. Belirtildiği durumlarda, pH 7.5 besi yerinin yanı sıra, tümör mikro-çevresini taklit etmek üzere pH 5.5 pH değerine sahip RPMI-1640 besi yeri kullanılmıştır. OM ya da SsM18 sup içeren besi yeri içerisinde 2, 4 veya 24 saatlik inkübasyonun sonunda MTT deneyi, daha önce belirtildiği şekilde uygulanmıştır (Tunçer vd., 2019: 7).

Bunun için besi yerleri uzaklaştırılmış, her bir kuyuya 1:10 oranında besi yeri içerisinde seyreltilmiş, stok konsantrasyonu 0.5 mg / mL olan MTT reaktifinden 100 µL eklenerek, plakalar 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonra her bir kuyuya % 10 SDS (v/v) içeren 0.01 N HCl çözeltisi eklenmiş ve plakalar 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyudaki renk değişimi 570 nm absorbansta, mikrolaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Blank olarak MTT ajanı ve SDS eklenmiş ancak hücre içermeyen kuyulardan alınan absorbans değerleri kullanılmıştır.

### **3.9. Hücre Canlılığı Tayini**

Tripan mavisi boyaması, ölü hücreleri tanımlamak için uzun süredir devam eden ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Sadece zarları bozulmamış hücreler boyayı etkili bir şekilde dışlayabilir, böylece zararı bozulmuş ölü hücreler boyanır (Strober, 2019: 1178). Bu amaçla 12 kuyulu plakaların her bir kuyusunda  $50 \times 10^4$  hücre/mL olacak şekilde ekim yapılmış, hücreler gece boyu 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün kuyulardaki besi yeri uzaklaştırılmış ve kuyulara pH 7.5 ya da pH 5.5 pH değerine sahip RPMI-1640 içerisinde % 20 (v/v) hücresiz OM ya da SsM18 sup içeren, taze hücre kültürü besiyeri eklenmiştir. 2 ve 4 saat inkübasyon sonunda besi yerleri toplanmış ve hücrelerin kuyulardan kaldırılması için kullanılan tripsinin inhibisyonu için kullanılmıştır. Bu şekilde hücre ölümüne bağlı olarak kuyu yüzeyinden kalkmış olup, besi yeri içerisinde yüzer halde bulunan hücrelerin de tespit edilmesi amaçlanmıştır. Thoma lamında hücre sayımını yapmak için hücre süspansiyonu 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılmıştır.

### **3.10. Hanging Drop Deneyi**

Hanging drop-asılı damla deneyi için  $3 \times 10^3$  hücre/mL olacak HCT-116 hücre süspansiyonu hazırlanmış ve plastik steril petri kaplarının kapaklarına damla başına 30 µl olacak şekilde damlatılmıştır. Petri kabının alt kapağına 5 ml steril PBS eklenmiş ve petri kapağı dikkatlice ters çevrilip kapatılarak 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. 48 saat sonra sferoid yapılar zarar vermeden damlalardaki sıvı uzaklaştırılmış ve sferoidler, %20 oranında OM ve / veya SsM18 sup ile pH 7.5 veya pH 5.5 ortamında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sferoidler ışık mikroskopunda gözlenmiş ve fotoğraflamıştır.

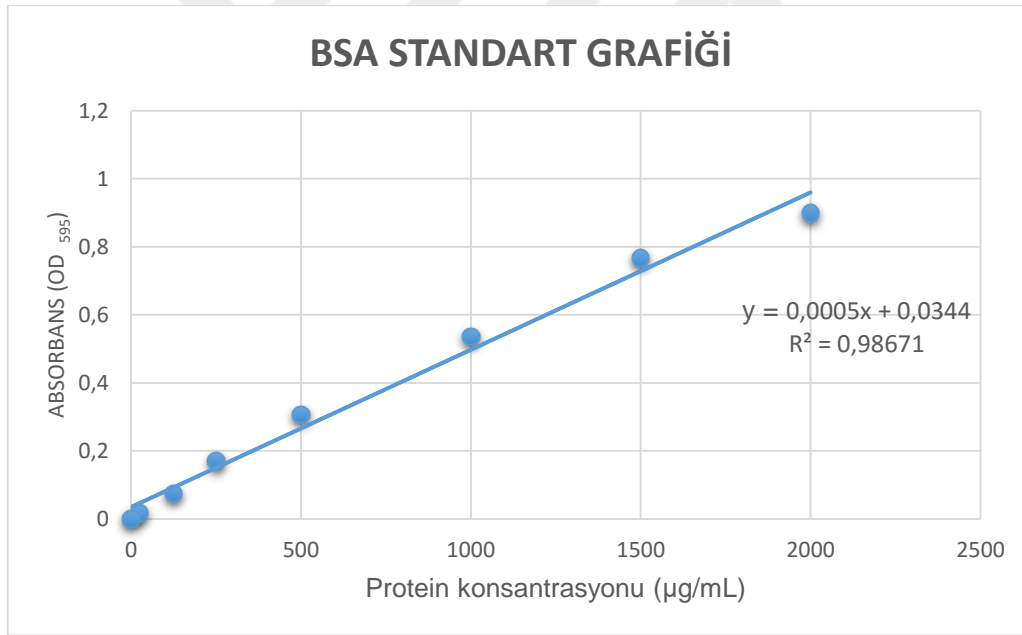
### 3.11. Protein İzolasyonu ve Western Blot

2 saat boyunca SsM18 sup veya OM ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinden protein izolasyonu proteaz (Thermo Scientific) ve fosfataz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific) içeren T-PER (Thermo Scientific) protein lizis tamponu kullanılarak yapılmıştır. Besi yerinin uzaklaştırılmasını takiben hücreler buz üzerinde, soğuk PBS kullanılarak yıkanmıştır. Lizis tamponu eklenen hücrelerin kuyulardan kaldırılması için scraper kullanılmıştır. Lizis tamponu içindeki hücreler 1.5 ml ependorf tüplerine toplandıktan sonra, 5'er dakikalık zaman aralıklarında vortekslenmek üzere 30 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda proteinler, 14000xg'de, 4°C'de, 15 dakika boyunca santrifüj uygulanarak toplanmıştır.

Western blot'ta kullanılacak proteinlerin miktar tayini için Bradford ajanı (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için öncelikli olarak BSA (Bovin Serum Albumin)'nın bilinen konsantrasyonları ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulmasında üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Kullanılan BSA dilüsyonları Tablo 3.2'da verilmiştir. 30 µL standart üzerine 1.5 mL Coomassie Reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon sonunda absorbanslar 595 nm de spektrofotometre cihazında belirlenmiş, standart eğrinin formülü bu ölçümlere göre oluşturulmuştur. Western blot'ta SDS jele yüklenecek proteinlerin miktarını belirlemek amacı ile protein konsantrasyonu, elde edilen bu standart eğriye göre belirlenmiştir (Şekil 3.1). Western blot için, proteinler %10'lik ayırma (separating) jeli ve %4'lik yığılma (stacking) jeli olacak şekilde hazırlanan SDS-PAGE'e yüklenmiş ve jel, örnekler yığılma jeline varana kadar jel 70 V'da, ardından 100 V'da yürütülmüştür. Jellerdeki proteinlerin Poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarımından önce membran 30 saniye metanol ile aktive edilmiş ardından 5 dakika transfer tamponunda bekletilmiştir. Transfer işlemi ıslak transfer yöntemi ile 115 V'da 90 dakika olarak yapılmıştır. TBS-T (Tris-Buffered Saline- % 0.1 Tween) içerisinde hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 1 saat boyunca inkübe edilen membran, takiben 4°C'de gece boyu primer antikor ile muamele görmüştür (XIAP; sc-11426, GAPDH; sc-25778). Primer antikor toplandıktan sonra membran 3 kez 15 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkanmış ardından HRP konjuge ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. 3 kez 15 dakika boyunca 1XTBS-T ile yıkanan membran, ECL solüsyonu kullanılarak Syngene G: BOX görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Gerektiği durumlarda membran mild koşullarda strip edilmiş, takiben birincil antikor uygulaması yapılmıştır.

**Tablo 3.2** Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500µg / mL)

Ependorf etiketi	Dilüsyon miktarı	BSA(2mg/mL) kaynağı ve hacmi	Final BSA konsantrasyonu
A	0	300 µL stok BSA	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL stok BSA	1500 µg/ mL
C	325 µL	325 µL stok BSA	1000 µg/ mL
D	175 µL	175 µL B dilüsyonu	750 µg/ mL
E	325 µL	325 µL C dilüsyonu	500 µg/ mL
F	325 µL	325 µL E dilüsyonu	250 µg/ mL
G	325 µL	325 µL F dilüsyonu	125 µg/ mL
H	400 µL	100 µL G dilüsyonu	25 µg/ mL
I	400 µL	0	0 µg/ mL =Blank



**Şekil 3.1** BSA Standart Grafiği

### 3.12 İstatiksel Analiz

Sonuçlar, ortalamanın ortalama  $\pm$  standart hatası (SEM) olarak ifade edildi. Karşılaştırmalar için Prism 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak t testi uygulandı. Anlamlılık derecesi \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  olarak gösterildi.

## 4. BULGULAR

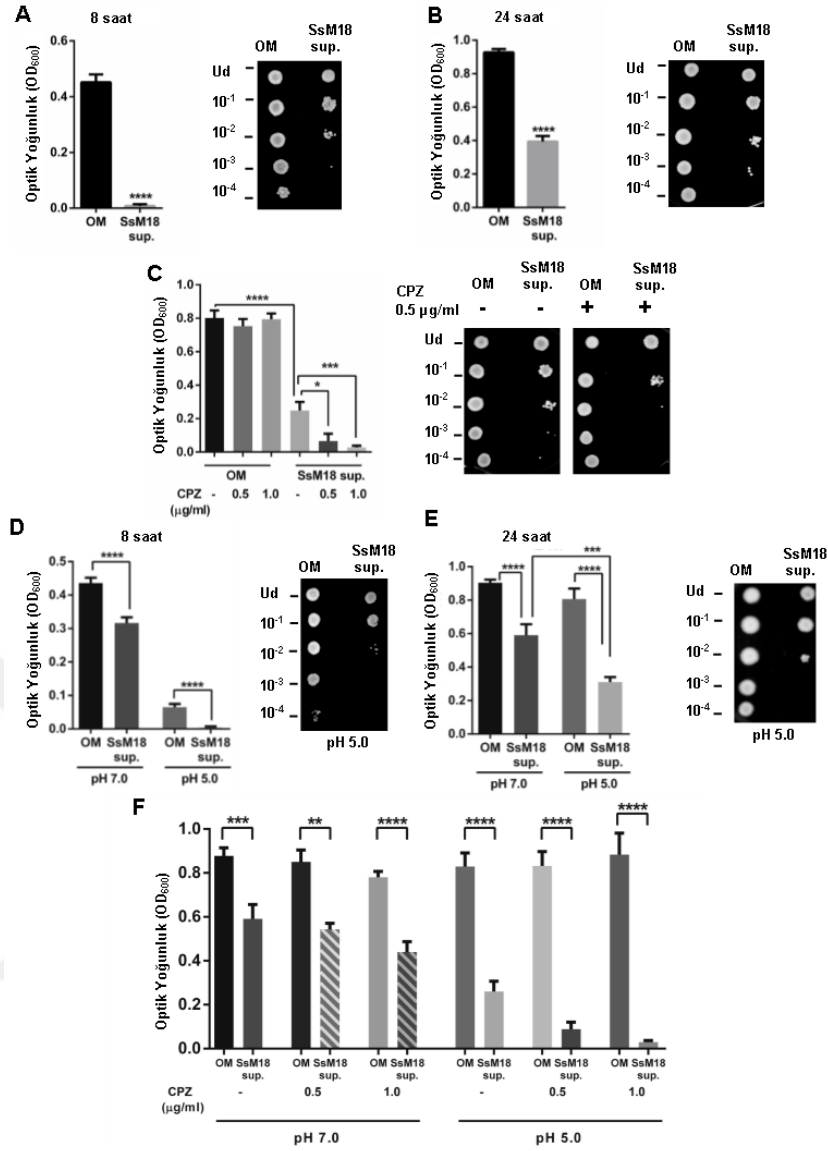
### 4.1. *S. salivarius* M18 Hücresiz Süpernatantının *Pseudomonas aeruginosa* Üzerinde Antibakteriyel Etkisi

*P. aeruginosa*, 96 kuyulu plakada 8 saat ve 24 saat boyunca *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı (SsM18 sup.) ile inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda OD<sub>600</sub>'de optik yoğunluk belirlenmiştir. Şekil 4.1A ve B'de gösterildiği gibi, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının, sadece besiyeri (OM) kontrolü ile inkübe edilen *P. aeruginosa* ile karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa*'nın büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Probiyotik süpernatantının *P. aeruginosa* üzerindeki büyüme inhibe edici etkisi, agar damlatma deneyleri ile de gösterilmiştir. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının *P. aeruginosa* antibiyotik cevabına etkisi de incelenmiştir. Bunun için *P. aeruginosa*, 24 saat boyunca 0.5 µg / ml veya 1.0 µg / ml sefoperazon (CPZ) içeren *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile 8 ve 24 saat boyunca inkübe edilmiş, probiyotik süpernatantının patojen büyümesi üzerindeki etkisi OD<sub>600</sub> ölçülerek ve agar damlatma yöntemleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.1.C'de gösterildiği gibi, CPZ'nin kullanılan dozlarının *P. aeruginosa* büyümesi üzerine etkisi gözlenmezken, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile birlikte uygulanan CPZ'nin patojenin antibiyotik duyarlılığını dramatik bir şekilde arttırdığı görülmüştür.

*S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının pH'sı 5.0, OM kontrolünün pH'sı ise 7.0 olarak ölçülmüştür. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının antipatojen etkisinin asidik ortamdan kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılması için; *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının (SsM18 sup.) pH'sı pH 7.0'ye ve kontrol ortamının pH'sı (sadece besi yeri; OM) ise pH 5.0'e ayarlanmıştır. Şekil 4.1.D ve E'te gösterildiği gibi, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının asidik ortamda antibakteriyel etkisinin daha yüksek olduğu, pH'sı 7.0'ye ayarlanan *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının antibakteriyel etkisinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, Şekil.4.1.F'de görüleceği gibi pH 7.0 ve pH 5.0 ortamında *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı (SsM18 sup.) ve kontrol besiyerinin (sadece besiyeri; OM), sefoperazone (CPZ; 0.5 µg / mL veya 1.0 µg / mL) varlığında *P. aeruginosa* büyümesi üzerindeki etkisi de incelenmiş olup patojenin CPZ antibiyotığına olan duyarlılığı, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının varlığında, ortam pH'sının asidik olduğu durumda daha yüksek olduğu görülmüştür. CPZ varlığında pH 7.0'ye ayarlanan *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının antibakteriyel etkisinin, pH 5.0 ortamına göre daha az olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca asidik kontrol ortamının, 8 saatte *P. aeruginosa* büyümesini etkilediği, ancak bu etkinin muhtemel tolerans mekanizmaları ile 24 saatte ortadan kaybolduğu görülmüştür. Böylelikle 24 saat sonunda, asidik çevresel pH'nın *P. aeruginosa* büyümesi üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı, gözlenen inhibitör etkinin *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.



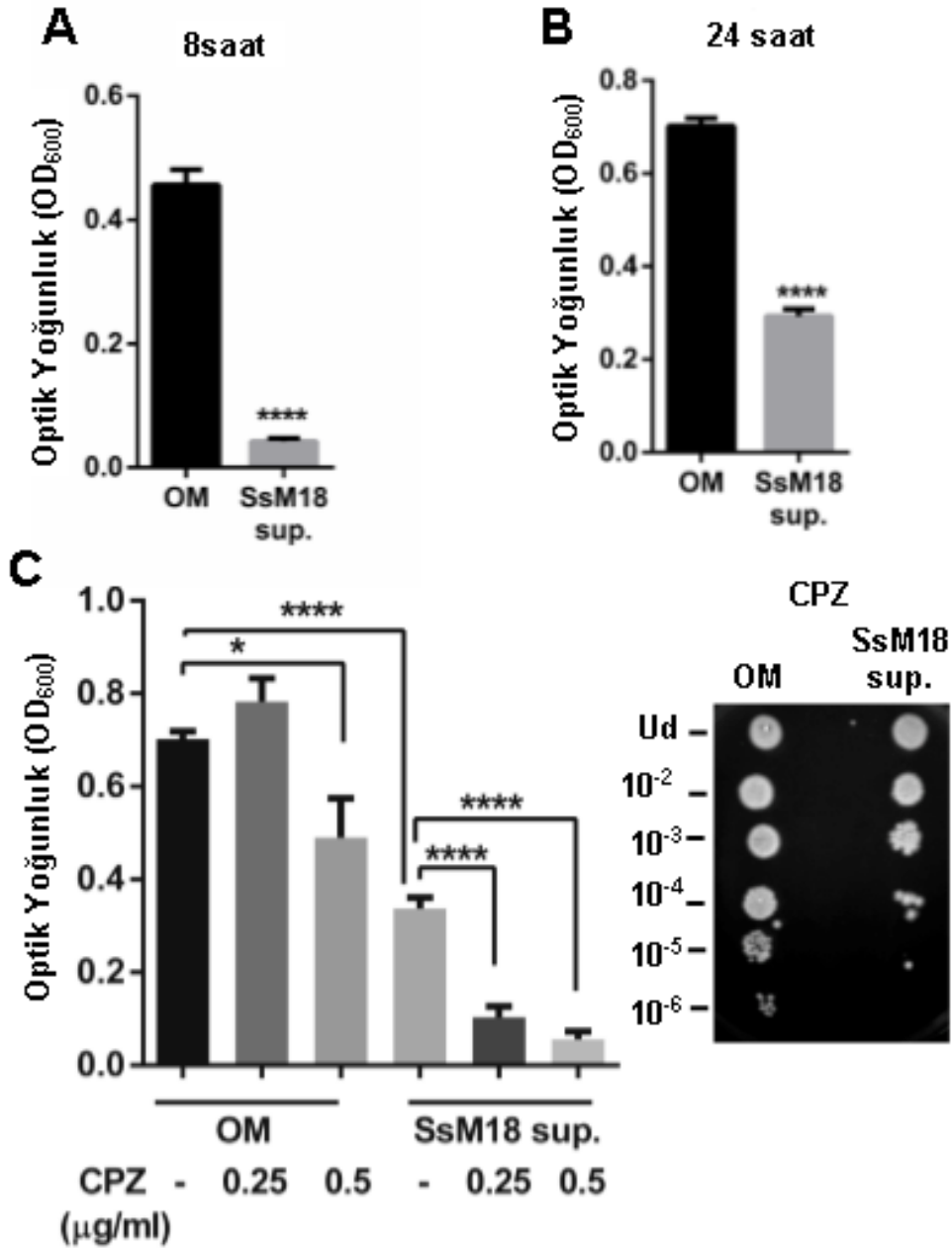


**Şekil 4.1.** *S. salivarius* M18 hüresiz süpernatantın antibakteriyel etkisinin *P. aeruginosa* bakterisinde araştırılması

A. *P. aeruginosa*, *S. salivarius* M18 süpernatantı (SsM18 sup.) ile veya kontrol besi yeri (OM) ile 8 saat ve B. 24 saat inkübe edilmiş, bakteriyel büyüme OD<sub>600</sub>'de belirlenmiştir. C. *P. aeruginosa*, 24 saat boyunca 0.5 µg / mL veya 1.0 µg / mL sefoperazon (CPZ) içeren *S. salivarius* M18 hüresiz süpernatantı ile inkübe edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın antibiyotik duyarlılığındaki değişim OD<sub>600</sub> ölçülerek belirlenmiştir. D. *S. salivarius* M18 hüresiz süpernatantın (SsM18 sup.) pH'sı pH 7.0'ye, kontrol besi yerinin pH'sı 5.0'e ayarlanmış, *P. aeruginosa* büyümesi 8 saat ve E. 24 saat inkübasyondan sonra OD<sub>600</sub> ölçülerek araştırılmıştır. F. pH ayarlı *S. salivarius* M18 hüresiz süpernatant (SsM18 sup.) ve kontrol medyumunun (sadece medyum; OM) sefoperazon (CPZ; 0.5 µg /mL veya 1.0 µg /mL) varlığında *P. aeruginosa* büyümesi üzerindeki etkisi ml) OD<sub>600</sub> ölçümü ile belirlenmiştir. Ayrıca absorbans değerlerini desteklemek için, agar damlatma deneyleri ile de gösterilmiştir (ud: dilüe edilmeyen). Deneyler, her birinin sekiz teknik kopyası ile üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama(mean) ± SEM olarak verilmiştir. Sonuçların analizi için t test kullanılmıştır (\*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001, \*\*\*\* p≤0.0001).

#### **4.2. *S. salivarius* M18 Hücresiz Süpernatanın, *Klebsiella pneumonia* Üzerinde Antibakteriyel Etkisi**

*S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının (SsM18 sup.) *K. pneumonia* patojeni üzerindeki etkisi, probiyotik süpernatantı ve kontrol besi yeri ile, 96 kuyulu plakalarda 8 ve 24 saatlik inkübasyonun ardından OD<sub>600</sub> değerleri ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 4.2.A ve Şekil 4.2.B' de gösterildiği gibi, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı, sadece OM kontrolüne inoküle edilen *K. pneumonia* ile karşılaştırıldığında *K. pneumonia* büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Probiyotik süpernatantının büyüme inhibe edici etkisi, agar damlatma deneyleri ile de gösterilmiştir. Şekil 4.2.C'de ise *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantın *K. pneumonia* büyümesi üzerindeki etkisinin CPZ antibiyotiği varlığında araştırıldığı deneylere ait sonuçlar görülmektedir. Buna göre *P. aeruginosa* ile yapılan deney sonuçlarına benzer şekilde *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı *K. pneumonia* üzerinde de antipatojen etkiye sahip olduğu ve bu etkinin CPZ varlığında arttığı görülmüştür.

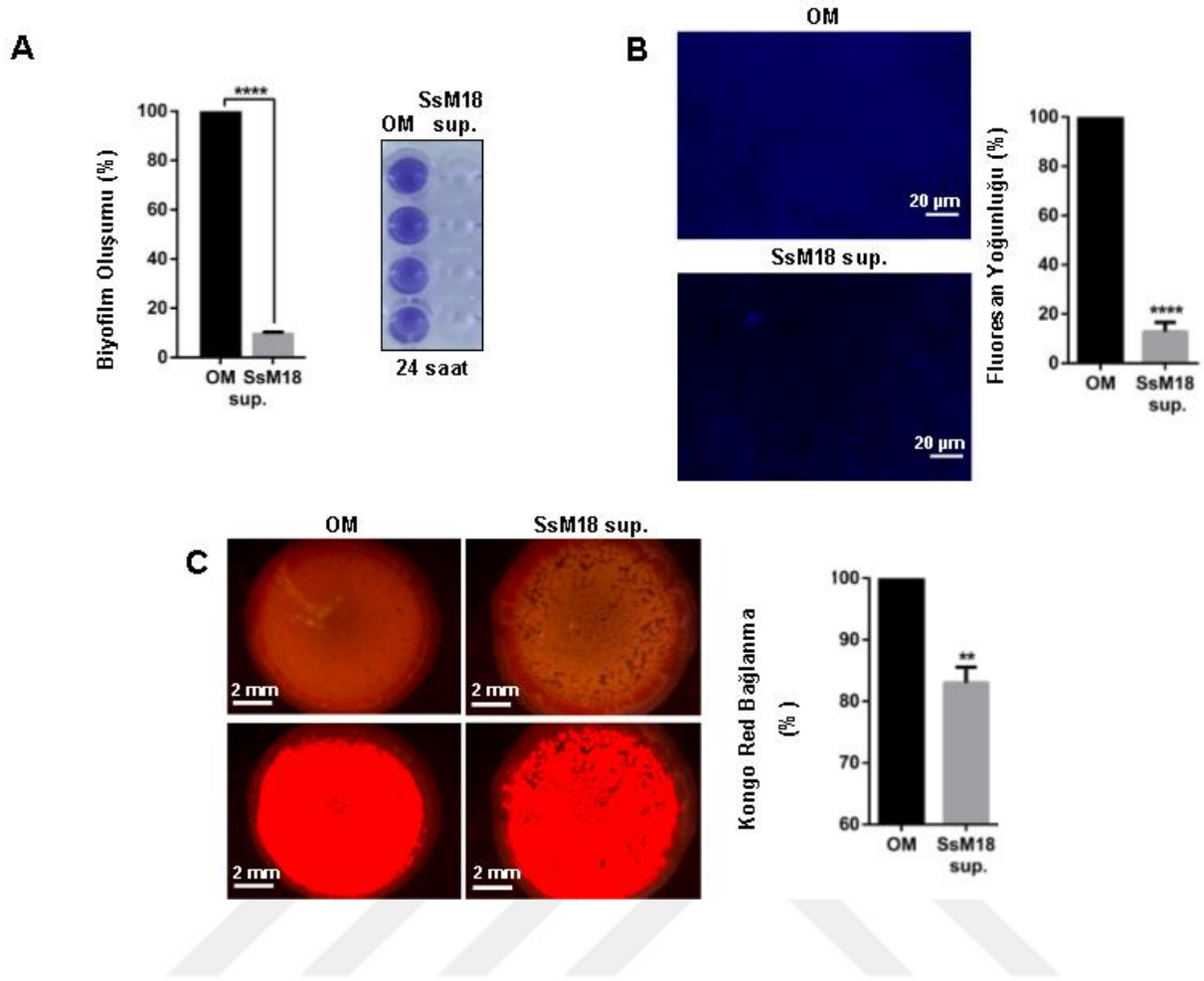


**Şekil 4.2.** *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantın antibakteriyel etkisinin ve antibiyotik varlığında antibakteriyel etkisinin *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde araştırılması

A. 8 ve B. 24 saat boyunca SsM18 süpernatantı veya kontrol besi yeri ile inkübe edilen *Klebsiella pneumoniae*'nin OD<sub>600</sub>'de belirlenen optik yoğunluk ölçümleri verilmiştir. C. SsM18 süpernatantının, sefaperazon (CPZ) varlığında, 24 saat sonunda *Klebsiella pneumoniae*'nin büyümesi üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Ayrıca absorbans değerlerinde belirlenen etki, agar damlatma deneyleri ile doğrulanmıştır (ud: dilüe edilmeyen). Deneyler, her biri sekiz teknik replikeden oluşmak üzere, en az üç biyolojik replike olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama (mean) ± SEM olarak gösterilmiş olup, gruplar arası istatistiksel anlamlılık t test ile belirlenmiştir (\*\* p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.001, \*\*\*\* p ≤ 0.0001).

### **4.3. *S. salivarius* M18 Hücresiz Süpernatantının *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşumuna Etkisi**

*S. salivarius* M18 süpernatantının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi, CV boyama kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.3.A'da *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının (SsM18 sup.) *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu dramatik şekilde inhibe ettiği (yaklaşık % 90) görülmektedir. *S. salivarius* M18 süpernatantı ya da kontrol besi yeri ile inkübe edilen *P. aeruginosa* bakterilerinin, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak yüzeye tutunma kabiliyetleri, nükleik asitlere bağlanan DAPI floresan boyası kullanılarak araştırılmıştır. Lamel yüzeyine tutunan bakterilere ait floresan yoğunluğu, *S. salivarius* M18 süpernatantı ile inkübe edilen örnekler için kontrol grubuna kıyasla önemli ve anlamlı ölçüde azalmıştır (Şekil 4.3.B). Polisakkaritler biyofilmin önemli yapısal bileşenleridir. Buradan yola çıkılarak *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının *P. aeruginosa* polisakkarit üretimine etkisi, polisakkaritlerin Kongo kırmızısına bağlanma özelliklerinden yola çıkılarak araştırılmış olup, *S. salivarius* M18'in hücre dışı bileşiklerinin varlığında büyüyen *P. aeruginosa* kolonilerinde polisakkarit içeriğinin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.3.C).

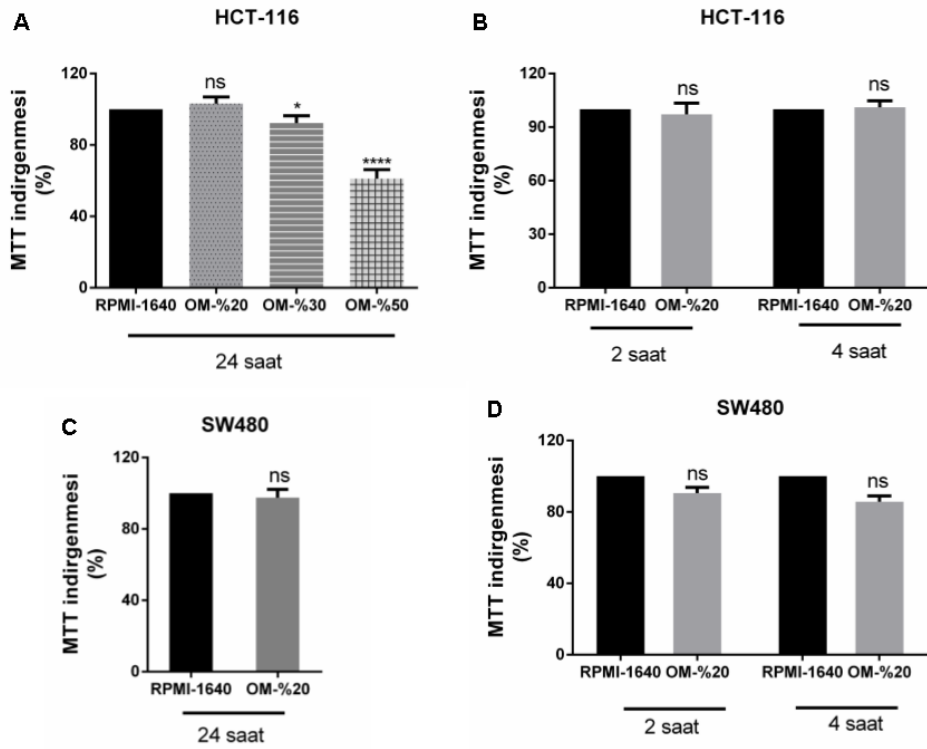


**Şekil 4.3.** *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının, *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu üzerine etkisi

A *S. salivarius* M18'den toplanan hücresiz süpernatant (SsM18 sup) ile inkübe edilen *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişimi CV boyama ile incelenmiştir. Kantitatif sonuçlar, OM kontrolüne kıyasla yüzde (%) olarak verilmiştir. Kuyu boyamaları temsili deney sonuçlarıdır. B. SsM18 sup. veya kontrol besi yeri (OM) ile inkübe edilen *P. aeruginosa*'nın yüzeye tutunma kabiliyeti DAPI boyaması ile araştırılmıştır. Floresan yoğunluğundaki değişiklik, OM ile inkübe edilmiş kontrol hücrelerinin ortalama floresansına göre yüzde (%) olarak verilmiştir. C. SsM18 sup. veya kontrol besi yeri (OM) varlığında büyüyen *P. aeruginosa*'nın Kongo kırmızısı bağlama kapasitesi gösterilmiştir. Bağlanmanın yoğunluğu ImageJ (NIH, ABD; <https://rsbweb.nih.gov/ij>) renk eşiği eklentisi kullanılarak analiz edilmiştir. Ekzopolisakarit üretimi için bir gösterge olarak Kongo kırmızısı bağlanmasındaki değişiklik, kontrole (OM) göre değişim yüzdesi olarak verilmiştir (sağ panel). Sonuçlar ortalama (mean)  $\pm$  SEM olarak sunulmuş olup, en az üç biyolojik replikeye aittir. İstatistiksel analiz t test ile yapılmıştır (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

#### 4.4. *S. salivarius* M18 Hücresiz Süpernatantının Kolon Kanseri Hücrelerine Etkisi

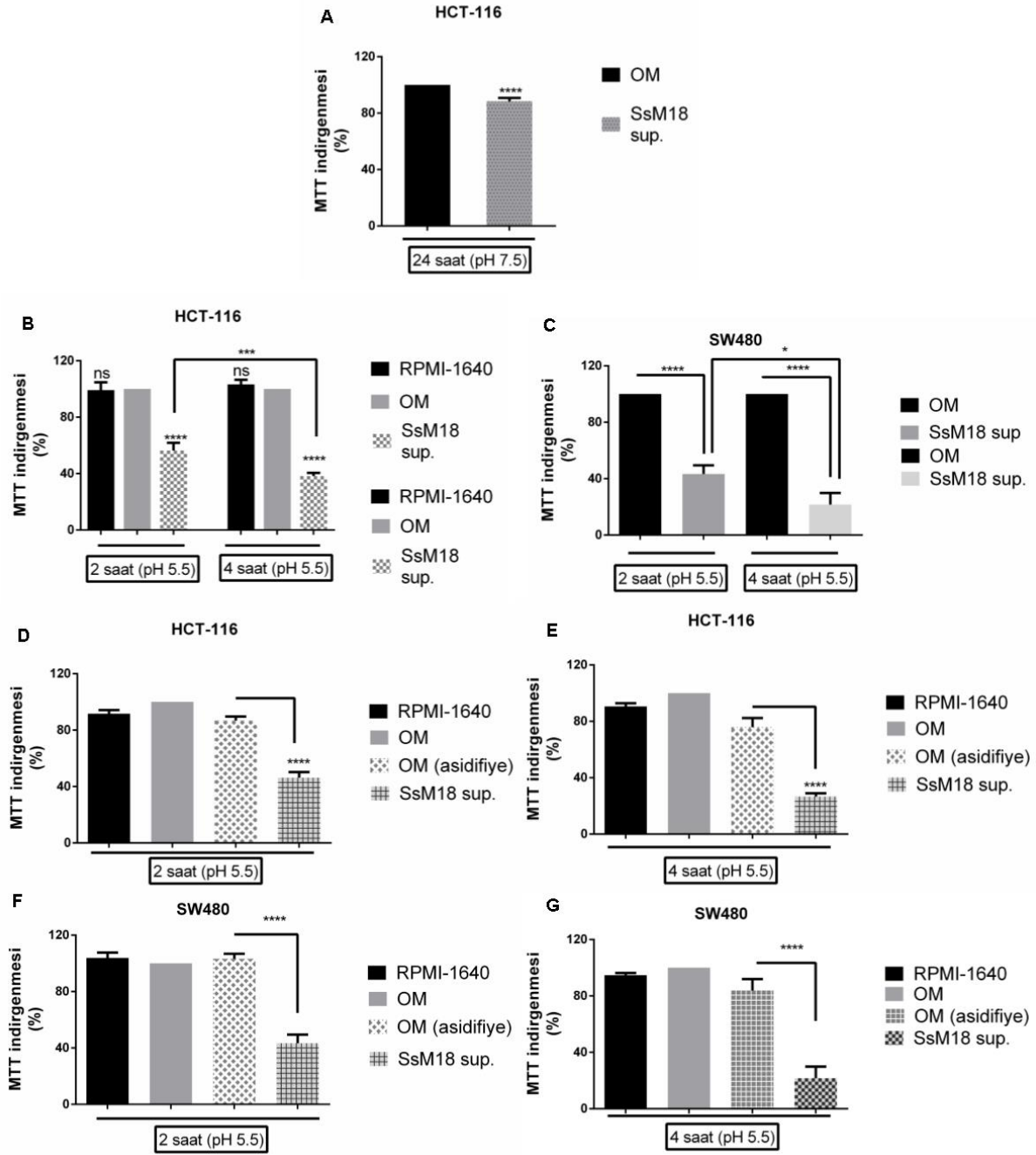
Probiyotik süpernatantının HCT-116 ve SW480 kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılacak çalışmalar için öncelikli olarak kontrol besi yerinin kullanılabilir miktarı, hücre canlılığının metabolizma temelli olarak araştırıldığı MTT deneyi ile belirlenmiştir: MTT tuzunun indirgenme düzeyindeki değişim, metabolik olarak aktif hücre sayısı ile ilişkilidir Burada amaçlanan, kontrol besi yerinin kanser hücre canlılığını tek başına inhibe etmeyeceği miktarının belirlenmesidir. Yapılan optimizasyon çalışmaları Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Buna göre probiyotik bakteri etkisinin araştırılacağı bundan sonraki deneylerde, 2, 4 ve 24 saatlik hücre inkübasyonları için %20 oranında hücresiz probiyotik süpernatantı ya da kontrol besi yeri (probiyotik bakteri inoküle edilmemiş ancak bakteri büyüme koşullarına ve süpernatant eldesi aşamalarına tabi tutulmuş) kullanılması uygun görülmüştür.



Şekil 4.4. *S. salivarius* M18 besi yeri miktarının optimizasyonu

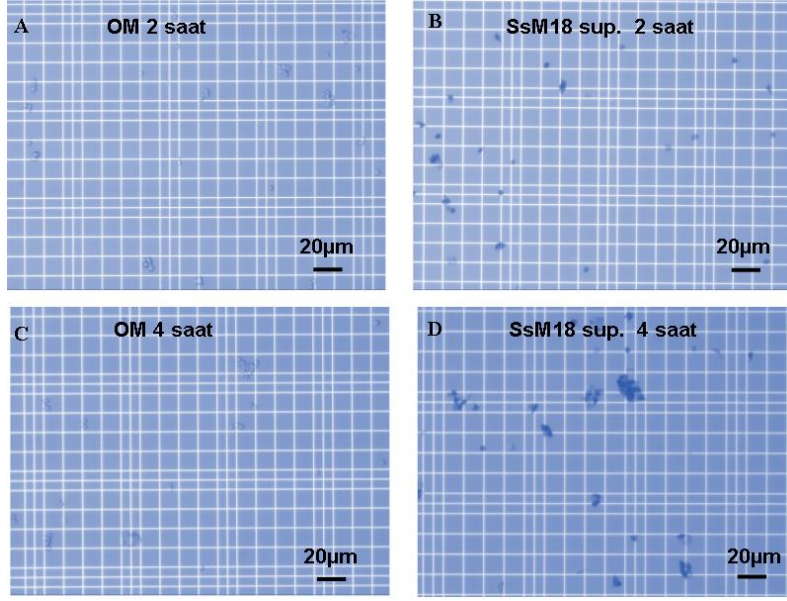
A. TSB besi yerinin RPMI-1640 besi yeri içerisindeki hacimce %20, %30 ve %50'lik oranlarının, 24 saat sonunda HCT-116 kanser hücrelerinde hücre metabolizmasına etkisi, sadece RPMI-1640 besi yeri içerisinde inkübe edilen hücrelere kıyasla %'de olarak verilmiştir. B. HCT-116 hücrelerinde hacimce %20'lik TSB besi yerinin kanser hücreleri metabolizmasına etkisi 2 ve 4 saatlik inkübasyonun sonunda incelenmiştir. C. SW480 hücrelerinde TSB besi yerinin hacimce %20'lik oranının, 24 saat ve D. 2 ve 4 saat sonunda hücre metabolizmasına etkisi, sadece RPMI-1640 ile inkübe edilen hücrelere kıyasla, %'de olarak verilmiştir. Deneyler her biri en az dört teknik replikeden oluşmak üzere en az üç biyolojik replike olacak şekilde yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık t-test ile belirlenmiştir (Ortalama(Mean) $\pm$ SEM; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

Kullanılacak kontrol besi yeri miktarına dair gerekli optimizasyonun yapılmasını takiben, *S. salivarius* M18'in hücresiz süpernatantının HCT-116 ve SW480 kolon kanseri hücre hatlarında etkisi, MTT deneyi ile incelenmiştir. Şekil 4.5.A'da görüldüğü gibi, normal doku ortamı pH'sı olarak pH 7.5 ortamında *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı, 24 saat inkübasyon sonunda dahi biyolojik olarak aktif hücre sayısı açısından önemli bir değişime neden olmamıştır. Probiyotik süpernatantının patojen üzerindeki etkisini incelediğimiz çalışmaların sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının asidik ortamda daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğundan yola çıkılarak (Şekil 4.1), SsM18 sup.'un kanser hücreleri üzerindeki etkisi, tümör dokusu ortamını taklit etmek üzere pH 5.5'da incelenmiştir. Şekil 4.5 B ve C'de sırası ile HCT-116 ve SW480 hücrelerinde *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının pH 5.5 ortamında kolon kanseri hücre canlılığına etkisi, kontrol besi yeri (OM) ile inkübe edilen hücrelere kıyasla %'de olarak verilmiştir. Buna göre asidik bir mikroçevrenin söz konusu olduğu tümör koşullarını taklit etmek üzere tasarlanmış bu yaklaşımda, probiyotik süpernatantının 2 ve 4 saat gibi kısa süreli inkübasyonlarda dahi kanser hücre canlılığında önemli ve anlamlı azalmaya neden olduğu görülmektedir; bu etki morfolojik olarak da belirgindir (Şekil 4.8). Ayrıca söz konusu inhibisyon, inkübasyon süresine bağlı olarak da artmaktadır: SsM18 sup. ile 4 saat boyunca inkübe edilen HCT-116 ve SW480 hücrelerinde canlı hücre sayısı, probiyotik süpernatantı ile 2 saat boyunca inkübe edilen hücrelere kıyasla düşüktür. pH'sı pH 5.0'e ayarlanan OM süpernatantı ile yapılan deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, bu sonuçlar gözlenen inhibitör etkinin *S. salivarius* M18 süpernatantının asidik pH'sından kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.5.D;E;F;G). Sonuç olarak pH 7.5 ortamında gerçekleştirilen deneyler ile karşılaştırıldığında verilerimiz, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının asidik tümör mikroçevresinde seçici bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu etki sadece iki boyutlu hücreler için değil, üç boyutlu sferoid kolon kanser modeli için de söz konusudur: Şekil 4.7'de görüldüğü gibi pH 5.5 asitliğindeki ortamda 24 saat boyunca kontrol besiyeri (OM) ile muamele edilen HCT-116 sferoidleri, invaziv ve kemo-dirençli bir özellik olarak sıkı (kompakt) bir yapıya sahipken SsM18 hücresiz süpernatantıyla inkübe edilen sferoidlerinin gevşek ve tabaka benzeri bir morfolojide olduğu gözlenmiştir.



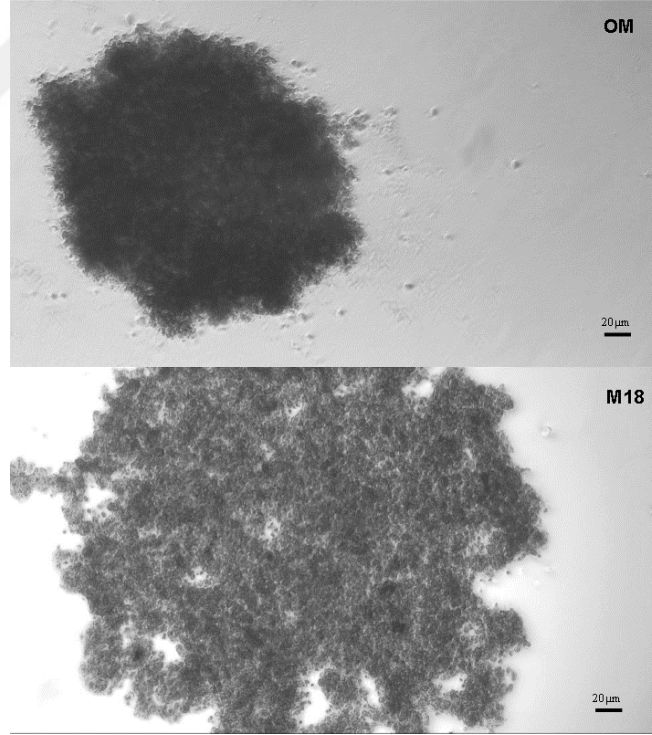
**Şekil 4.5.** Medium pH'nin hücreler üzerine etkisinin incelenmesi ve probiyotik bakteri hüresiz süpernatantlarının kolon kanseri hücre canlılığına etkisi

A. pH 7.5 besiyeri kullanıldığında *S. salivarius* M18 hüresiz süpernatantının 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığına olan etkisi gösterilmektedir. B. pH 5.5 ortamında, HCT-116 hücrelerinde ve C. SW480 hücrelerinde, 2 saat ve 4 saat SsM18 süpernatant ile inkübasyonun etkisi verilmiştir. D. Asidifiye edilmiş OM süpernatantının HCT-116 hücrelerinde 2 saat ve E. 4 saat; F. SW480 hücrelerinde 2 saat G. ve 4 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir. Sonuçlar bakteri kontrol besi yerine (OM) göre normalize edilmiştir. Deneyler, her biri en az dört teknik replike olmak üzere en az iki biyolojik replike şeklinde yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık t test ile belirlenmiştir. Ortalama(Mean) $\pm$ SEM; \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .



**Şekil 4.6.** HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığının tripan mavisi boyaması ile belirlenmesi

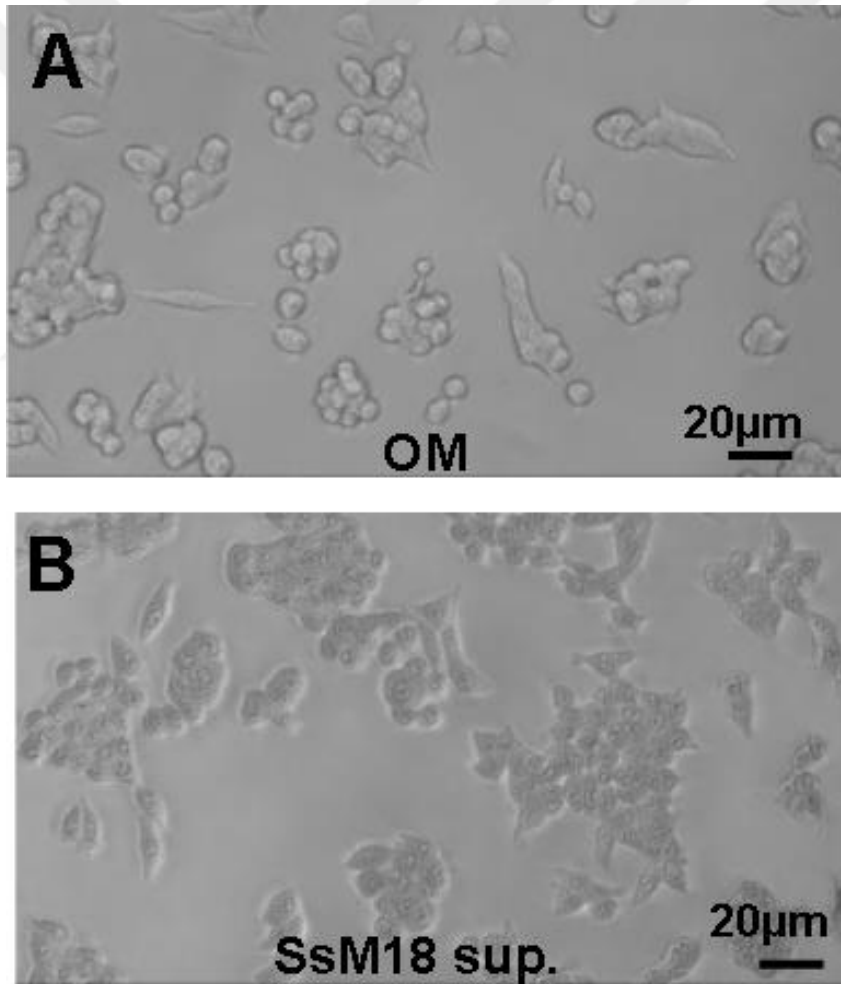
A. OM ile veya B. *S. salivarius* M18 hüresiz supernatantı ile 2 saat inkübe edilen hücrelerin; C. OM ile veya D. *S. salivarius* M18 hüresiz supernatantı ile 4 saat inkübe edilen hücrelerin tripan mavisi ile boyanmaları thoma lamı kullanılarak gözlenmiştir.



**Şekil 4.7.** HCT-116 hücrelerinde Hanging drop (asılı damla) yöntemi ile oluşturulan sferoid yapılarına *S. salivarius* M18 süpernatantının etkisi

Hanging drop yöntemi ile oluşturulan çok hücreli tümör sferoidlerinin, kontrol besi yeri veya SsM18 sup ile muamele edildikten 24 saat sonraki morfolojileri, ışık mikroskobu kullanılarak gözlenmiştir.

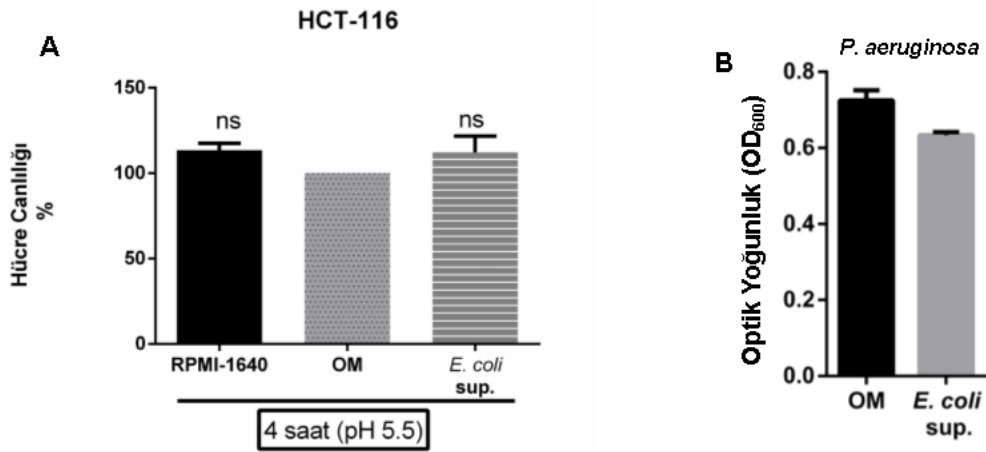
Asidik çevrede SsM18 sup. ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığındaki değişim, tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılarak da araştırılmıştır. Şekil 4.6'da 2 ve 4 saat boyunca kontrol besi yeri (OM) ya da SsM18 sup. ile inkübe edilen HCT-116 hücre örneklerinin, tripan mavisi ile boyama ardından thoma lamındaki mikroskop görüntüleri yer almaktadır: tripan mavisi sadece ölü hücelere penetre olabildiğinden canlı hücreler mikroskop altında renksiz görülmektedir. Yapılan sayım sonucu, 2 saat inkübasyon sonunda OM ile inkübe edilen HCT-116 hücreleri için ölü hücre sayısı  $2 \times 10^4$  hücre/mL iken, bu sayı probiyotik süpernatantı ile inkübe edilen hücreler için  $100 \times 10^4$  hücre/mL'dir. 4 saat sonunda SsM18 sup. ile inkübe edilen hücrelerdeki ölü hücre sayısının  $125 \times 10^4$  hücre/mL'e ulaştığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.8.** *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde apoptoza olan etkisi

pH 5.5 mediumu içinde A. OM ve B. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile 2 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler ışık mikroskopunda gözlenmiş olup, 10X büyütme objektif kullanılarak fotoğraflanmıştır.

Ek olarak, bu çalışmada bir insan kommensali olan *E. coli* ATCC8739 suşundan elde edilen hücresiz süpernatant da kullanılmış olup, SsM18 sup. uygulaması ile aynı *in vitro* koşullar altında (pH 5.5) *E. coli* hücresiz süpernatant muamelesinin (%20 v/v), HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.9.A). Aynı zamanda *P. aeruginosa* büyümesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.9.B). Bu sonuç, görülen anti-kanser ve anti-patojen etkinin *S. salivarius* M18 probiyotik suşuna özgü olduğunu ortaya koymaktadır.



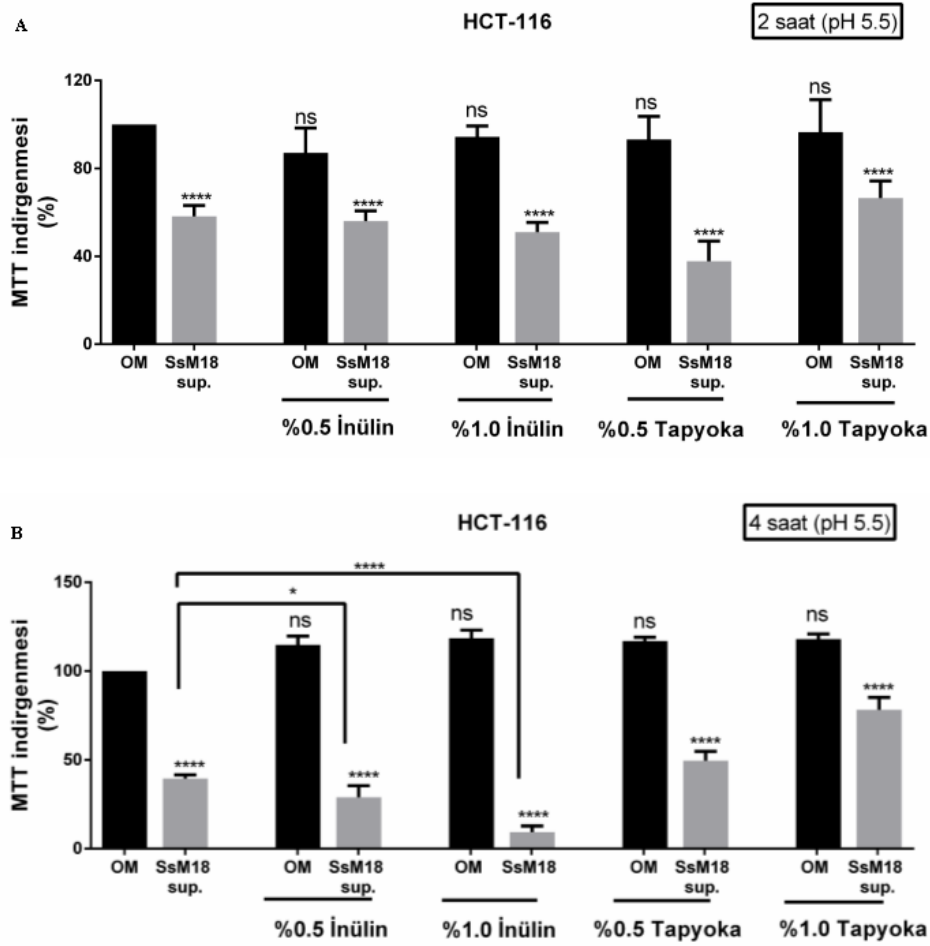
**Şekil 4.9.** *E. coli* hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücresi üzerindeki ve *P. aeruginosa* büyümesi üzerine etkisi

A. Kommensal *E. coli* suşundan toplanan hücresiz süpernatant ile 4 saat boyunca pH 5.5 kültür ortamında inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığı, %20 (v/v) oranında TSB içeren RPMI-1640 besi yeri (OM) ile inkübe edilen hücrelere kıyasla %'de olarak verilmiştir. B. Kommensal *E. coli* suşundan toplanan hücresiz süpernatantının *P. aeruginosa* büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. Deneyler her biri dört teknik replike içermek üzere yapılan iki biyolojik replikeye aittir (Ortalama(mean)±SEM; ns=non-significant).

#### 4.5 Prebiyotik Olarak İnülin Ve Tapyoka Nişastasının *S. salivarius* M18 Hücresiz Süpernatantının Anti-Kanser Aktivitesine Etkisi

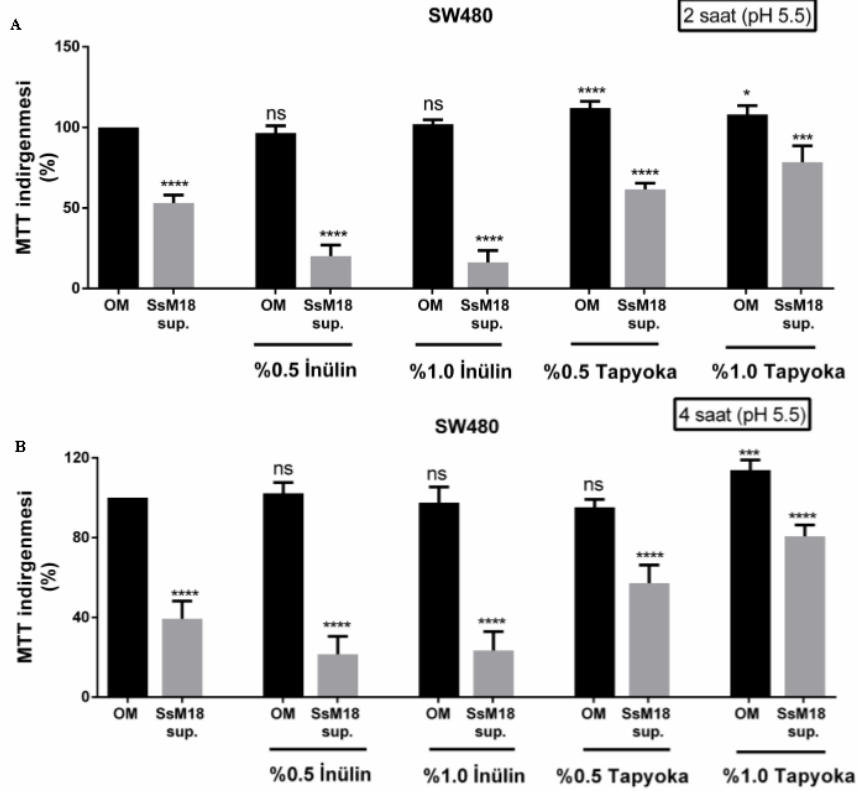
Tapyoka nişastası (Tapioca Starch-TS) ve inülin, prebiyotik aktiviteleri laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda da gösterilmiş olan gıda ürünleridir (Gurbanov vd., 2020: 2). Bu tez çalışması kapsamında, tapyoka nişastası ve inülin prebiyotikleri ile inkübe edilen *S. salivarius* M18'in hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisi, prebiyotik ile inkübe edilmemiş *S. salivarius* M18 bakterilerinden toplanan süpernatantın etkisi ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

% 0.5 (v/w) ve % 1.0 (v/w) inülin ile inkübe edilen *S. salivarius* M18 bakterilerinden toplanan hücresiz süpernatant ile pH 5.5 kültür ortamında inkübe edilen HCT-116 hücrelerinin canlılığında, inülin prebiyotiği ile inkübe edilmeyen *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Benzer trend, SW480 hücreleri için de geçerlidir. Tapyoka nişastasının ise, özellikle % 1.0 (v/w) konsantrasyonu için, *S. salivarius* M18 süpernatantının kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki inhibe edici etkisini azaltacak bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Hatta tapyoka nişastası içeren TSB kontrol besi yeri ile inkübe edilen hücreler için, sadece TSB ile inkübe edilen hücrelere kıyasla hücre proliferasyonunda bir artış trendi söz konusudur.



**Şekil 4.10.** İnülin veya tapyoka nişastası ile inkübe edilen *S. salivarius* M18 süpernatantının HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

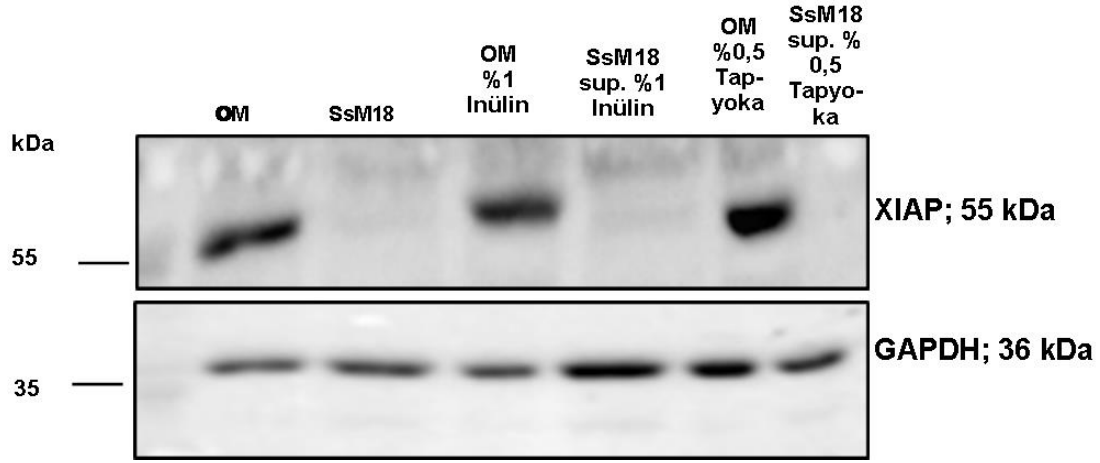
İnülin veya tapyoka nişastasının % 0.5 veya % 1.0 (v/w) konsantrasyonları ile inkübe edilen *S. salivarius* M18 bakterilerinden elde edilen hücresiz süpernatantın, A. 2 saat sonunda B. 4 saat sonunda HCT-116 hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir.



**Şekil 4.11.** İnülin veya tapyoka nişastası ile inkübe edilen *S. salivarius* M18 süpernatantının SW480 kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

İnülin veya tapyoka nişastasının %0.5 veya %1.0 (v/w) konsantrasyonları ile inkübe edilen *S. salivarius* M18 bakterilerinden elde edilen hücresiz süpernatantın, C. 2 saat D. 4 saat inkübasyonundan sonra SW480 hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir. Sonuçlar kontrol besi yeri ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen absorbans değerlerine göre normalize edilmiş ve %'de olarak verilmiştir. Her biri en az 4 teknik replikeden oluşmak üzere, en az iki biyolojik replikeye ait sonuçlar Ortalama(mean) $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık t test ile belirlenmiştir. (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .)

MTT deneyleri, tripan mavisi boyama sonuçları ve ayrıca morfolojik gözlemler, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığını inhibe edici etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu inhibitör etkinin ortaya çıkmasında apoptozun rol oynayıp oynamadığının belirlenmesi için, 2 saat boyunca inülin ve tapyoka nişasta ile inkübe edilen ya da edilmeyen *S. salivarius* M18 probiyotik bakterisinden toplanan hücresiz süpernatant ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerindeki XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ifadesindeki değişim incelenmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü üzere prebiyotik ile inkübe edilen ya da edilmeyen *S. salivarius* M18 probiyotik bakterisinin hücresiz süpernatantı, bir anti-apoptotik protein olan XIAP'nin ifadesinde dramatik bir azalmaya neden olmuştur; başka bir deyişle SsM18 sup. ile inkübe edilen kolon kanseri hücrelerinde apoptoz meydana gelmektedir.

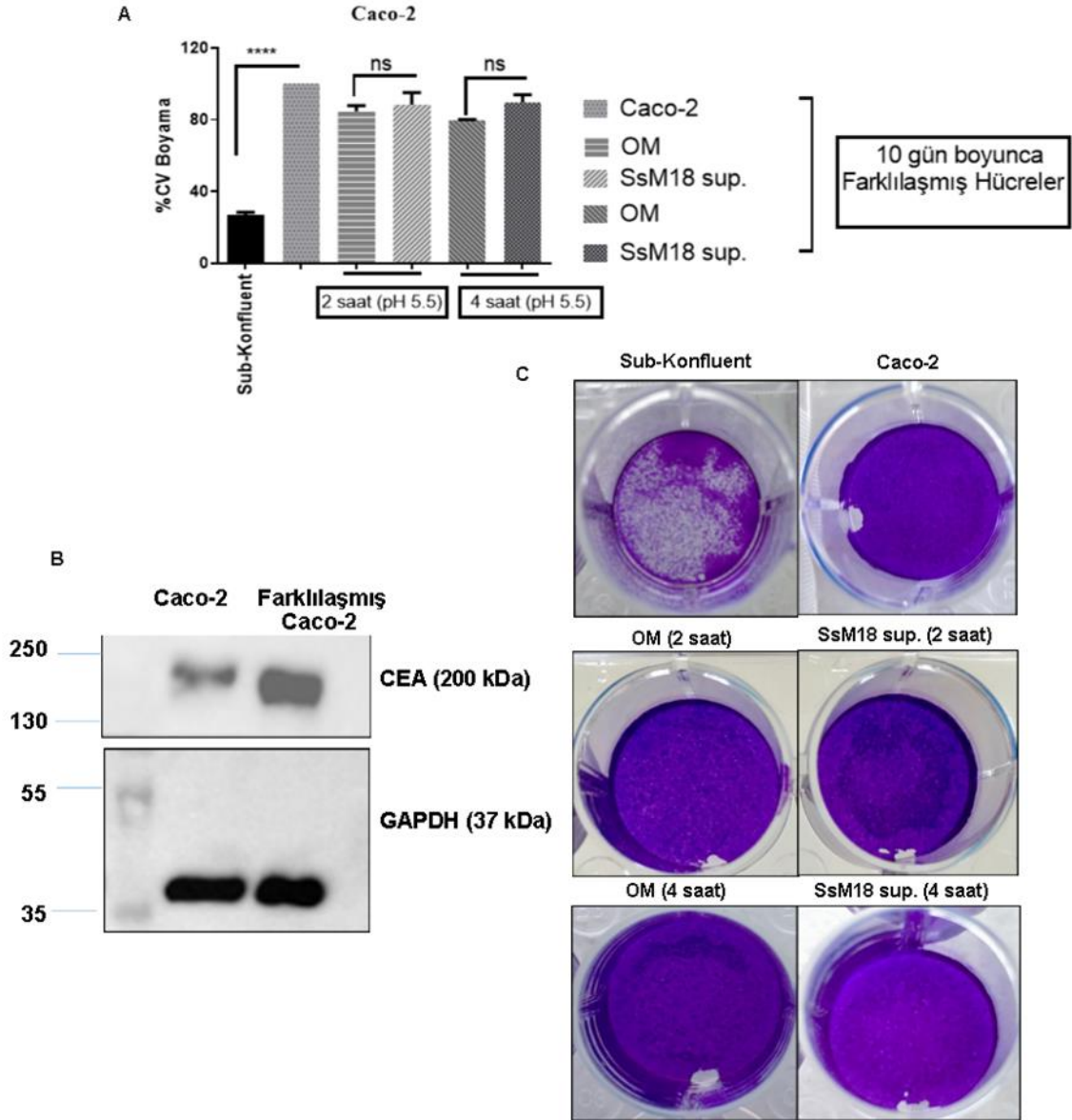


**Şekil 4.12.** HCT-116 hücrelerinde Western Blot analizi ile protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Anti-apoptotik bir protein olarak XIAP ifadesinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolüdür.

#### 4.6. *S. salivarius* M18 süpernatantının kolon epitel bariyer bütünlüğüne etkisi

Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı, bağırsak epitel hücre farklılaşması ve bariyer işlevi için bir model olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu hücreler konfluensiye ulaşmayı takiben kendiliğinden enterosit benzeri hücelere farklılaşır; bağırsağa özgü enzimlerini sentezler ve salgılar ve emilim fonksiyonuna sahip “kubbe” yapıları oluşturur. Söz konusu farklılaşma modeli “spontan farklılaşma” olarak adlandırılır (Tunçer ve Banerjee, 2017: 6). *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının sağlıklı bir kolon epitel modelinde, bariyer bütünlüğüne zarar verip vermediği, CV boyaması kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.13.A’da görüldüğü üzere, 10 gün sonunda Caco-2 hücrelerinde farklılaşma, farklılaşan hücrelerde sub-konfluent (farklılaşmamış; proliferasyon durumunda) hücelere kıyasla artmış karsino embriyonik antijen (CEA) ifadesinin analizi ile doğrulanmıştır (Tunçer ve Banerjee, 2017: 8). Şekil 4.13.B’de pH 5.5 ortamında kontrol besi yeri ya da *S. salivarius* hücresiz süpernatantı ile 2 ve 4 saat boyunca inkübe edilen farklılaşmış Caco-2 hücrelerinden elde edilen CV absorbans değerleri, pH 7.5 ortamında Caco-2 besi yeri inkübe edilen, farklılaşmış hücrelerin bulunduğu kuyulardan elde edilen absorbans değerleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Beklendiği üzere farklılaşmamış hücrelerden elde edilen absorbans değerleri, farklılaşmış hücelere göre daha düşüktür. Ancak SsM18 sup. ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen CV absorbans değerleri ile kontrol besi yeri ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Bu sonuç, hücresiz probiyotik besi yerinin, kolon epitel bariyer bütünlüğünü etkilemediğini göstermektedir. Deneye ait CV kuyu boyama görüntüleri Şekil 4.13.C’de verilmiştir.

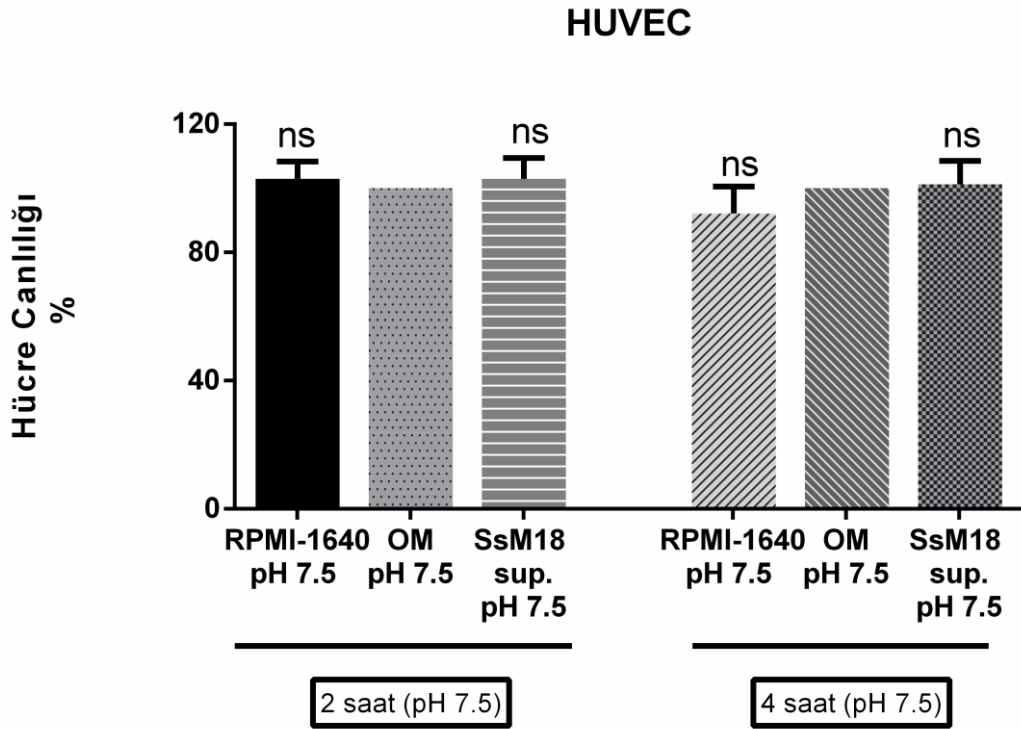


**Şekil 4.13.** *S. salivarius* M18 süpernatantının kolon epitel bariyer bütünlüğüne etkisi

A. Caco-2 hücrelerinde farklılaşma belirteci olarak artan CEA ekspresyonu gösterilmektedir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının pH 5.5 kültür ortamında farklılaşmış Caco-2 hücrelerine etkisi CV boyama ile incelenmiştir. Boyama görüntüleri temsilidir.

#### 4.7 *S. salivarius* M18 süpernatantının İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücrelerinde (HUVEC) hücre canlılığına etkisi

Buraya kadar elde edilen bulgular, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının, asidik tümör mikroçevresinde seçici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Normal doku pH'sında (pH 7.5) M18 suşundan elde edilen postbiyotik ürünlerin hücre canlılığına önemli bir etkisi belirlenmemiştir. Buradan yola çıkılarak, sağlıklı doku pH çevresinde *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının sağlıklı, primer hücreler olarak HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.14'da görüleceği gibi sağlıklı doku çevresinde SsM18 sup. muamelesinin HUVEC hücre canlılığı üzerinde bir etkisi bulunmamaktadır.



**Şekil 4.14.** Sağlıklı primer hücre olan HUVEC hücre hattında, *S. salivarius* M18 süpernatantının hücre canlılığına etkisi

2 ve 4 saat *S. salivarius* M18 süpernatantıyla (% 20 v,v) inkübe edilen HUVEC hücrelerinde hücre canlılığındaki değişim MTT yöntemi ile incelenmiş olup, sonuçlar OM ile inkübe edilen hücrelere kıyasa %'de olarak verilmiştir. ns=non-significant

## 5. TARTIŞMA

Probiyotikler, vücut üzerinde yararlı bir etkiye sahip olan sağlıklı bakterileri tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Gogineni vd., 2013; 101). Probiyotikler, immün yanıtları düzenler, besinler ve bağırsak-epitel yapışma bölgeleri için patojenlerle rekabet ederek ve antimikrobiyal maddeler salgılayarak enteropatojenik mikroorganizmaları inhibe eder veya doğrudan ortadan kaldırır. Probiyotikler, sıkı bağlantı oluşumunu teşvik ederek, mukus üretimini artırarak ve anti-epitel hücre apoptozunu artırarak bağırsak epitel homeostazının korunmasına yardımcı olur ve bağırsak mikrobiyotasının ve konağın metabolik profilini doğrudan etkileyebilir, böylece kolon hücre çoğalmasının düzenlenmesini teşvik edebilir (Lamichhane vd., 2020: 1162).

Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyomunu modüle etmeleri nedeni ile sağlık açısından faydalı etkilerinden söz etmek mümkün olmakla birlikte, takviye şeklinde ya da gıda katkısı olarak kullanıldığı durumlarda bakteri canlılığının azalması, gıda ve ilaç sektörlerinde probiyotiklerin tam potansiyelleri ile uygulanabilirliğini engellemektedir. Bu nedenle son dönemlerde canlı probiyotik bakterilerden çok paraprobiyotiklere ve / veya probiyotik kaynaklı biyomoleküllere ilgi artmıştır. Paraprobiyotikler cansız mikrobiyal hücreler veya ham hücre ekstraktlarını ifade ederken (Nataraj vd., 2020: 6), postbiyotikler probiyotik enzimler, salgılanan proteinler, kısa zincirli yağ asitleri, vitaminler, yüzey aktif molekülleri, amino asitler, peptitler, bakteriyosinler, organik asitler dahil olmak üzere probiyotikler tarafından salgılanan metabolik ürünleri tanımlar (Zendeboodi vd., 2020: 112). Postbiyotikler, probiyotiklere göre çeşitli avantajlar sağlar. Saf haliyle elde edilebilirlik, üretim ve depolamada kolaylık, spesifik etki mekanizması, konak bağışıklık sistemi açısından mikroplarla ilişkili moleküler modelin ve Örüntü Tanıma Reseptörleri (PRR; Pattern recognition receptor) ile etkileşim yollarının öngörülebilir olması, ayrıca belirli ligand-reseptör etkileşimleriyle hedeflenebilir yanıtları tetikleyebilmeleri postbiyotiklerin avantajlarından. Ek olarak endüstriyel anlamda büyük ölçekli olarak da üretilebilirler (Nataraj vd., 2020: 7). Bu tez çalışmasında bir LAB türü olan *Streptococcus salivarius* M18 bakterisinde elde edilen hücresiz süpernatantın antibakteriyel, antibiyofilm ve antitümör etkinlikleri araştırılmıştır.

LAB'den türetilmiş hücresiz süpernatantların düşük moleküler ağırlıklı (hidrojen peroksit, reuterin, organik asitler, karbon dioksit ve di-asetilen gibi) metabolitler ve nispeten yüksek moleküler ağırlıklı (bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri moleküller) biyomolekülleri içerdiği bilinmektedir (Siedler vd., 2019: 140). LAB'leri, patojenik bakterileri inhibe eden bir dizi hücre dışı antimikrobiyal peptitler (AMP) üretir. Çok çeşitli mikroorganizmalar bakteriyosin üretmesine rağmen, LAB tarafından üretilenler, doğal biyo-koruyucular olarak gıda işleme ve gıda fermantasyonlarındaki kapsamlı uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Bakteriyosinler, hem Gram-pozitif bakteriler hem de yakından ilişkili türleri inhibe etmek üzere Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyal peptidlerdir (Drider vd., 2016: 179). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, genellikle sitoplazmik membranlar üzerinde gözenekler oluşturmak üzere etki gösteren katyonik peptidlerdir. Membran yapısındaki bu değişim, hücre içi hayati bileşenlerin hücre dışına sızmasını tetikler. LAB bakteriyosinlerinin, çeşitli antibiyotiklere dirençli patojenlere karşı inhibe edici potansiyelleri olduğu ortaya konduğundan, LAB bakteriyosinleri sadece gıda sektöründe değil, klinikte de uygulama potansiyeline sahiptir (Mokoena, 2017: 1255).

Mikroorganizmalar, olumsuz ortamlarda hayatta kalmaya yardımcı olan, adeta bir "çok hücreli" yaşam tarzını benimsedikleri sabit, yerleşik topluluklar oluşturabilir ki bu form "biyofilm" olarak adlandırılır. Biyofilmler, kendi kendine üretilen hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matriksine gömülü olan mikroorganizmalardan oluşan, mimari olarak karmaşık yapılardır. Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tutunduğu "ilk yapışma" aşaması, bakterilerin bölündüğü ve hücreleri konumlandıran ve yapışmayı artıran EPS üretmeye başladığı "mikro koloni oluşumu" aşaması, EPS matrisinin çok işlevli ve koruyucu bir iskelet şeklinde üç boyutlu bir yapı oluşturduğu "biyofilm olgunlaşması" aşaması, bakterilerin planktonik aşamaya yeniden girmesiyle biyofilmden ayrılarak yeni alanlarda yeniden kolonileşebildiği "ayrılma" (dağılma da denir) aşamalardan oluşur (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2831). Biyofilmlerle başa çıkmak için iki strateji vardır: biyofilm oluşumunun önlenmesi veya gelişen biyofilmin ortadan kaldırılması. Postbiyotiklerin antibiyofilm etkileri belirli bir bileşenle (bakteriyosin veya organik asitler gibi) sınırlı değildir. Postbiyotik moleküller olarak bakteriyosinler, organik asitler, hidrojen peroksit, biyo yüzey aktif maddeler (Biosurfactanlar yani BS'ler) ve EPS gibi metabolitlerin antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak birden çok postbiyotik bileşen antibiyofilm aktiviteden sorumlu olabilir ve sinerjik olarak etki gösterebilirler (Moradi vd., 2020: 3403). Probiyotik LAB suşları, çok çeşitli biyofilm üreten patojenlere karşı anti-biyofilm etkinlikleri açısından araştırılmıştır.

Örneğin, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *S. typhimurium* biyofilmine karşı inhibe edici aktivite gösteren lektin benzeri moleküller üretir ( Petrova ve diğerleri, 2016: 130). *L. brevis* DF01'den elde edilen ham bakteriyosin, paslanmaz çelikte *S. typhimurium*'un biyofilm oluşumunu inhibe edebilir ( Kim, Kim & Kang, 2019: 557). Organik asitler, yani laktik asit, asetik asit ve sitrik asit, *Salmonella*'ya karşı etkili inhibitörlerdir. Bu organik asitler, *Salmonella* biyofilmlerinin ana bileşeni olan ekzopolisakkarit üretimini azaltarak biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (Amrutha, Sundar & Shetty, 2017: 154). Normalde organik asitler, tüm LAB'lerinin antimikrobiyal aktivite için kullandığı ve fermente gıdalarda pH'yı düşüren ana metabolitlerdir. Laktik asit ve asetik asit gibi organik asitlerin varlığında hücrelerin inaktive olabileceği ve biyofilm oluşum süreçlerinin inhibe olabileceği öne sürülmektedir. LAB suşları, fermente gıdalarda raf ömrünü uzatmanın ve besin değerini ve duyuşal özelliklerini iyileştirmenin bir yolu olarak kullanılır. LAB tarafından üretilen bazı biyomoleküller patojenik bakterilerin büyümesini inhibe ederek fermente gıdalardaki bozulmasını geciktirir (Quinto vd., 2014: 174; Pandey vd., 2015: 7580).

Bu tez çalışmasında, *S. salivarius* M18'in hücresiz süpernatantının; *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* patojenleri üzerindeki antipatojenik özelliklerini analiz edilmiştir. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantın, *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia*'nın büyümesini inhibe ettiği ve antibiyotik uygulanmasına duyarlılıklarını arttırdığı bulunmuştur. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının biyofilm oluşumuna etkisi de incelenmiştir. Tez çalışmasında *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantın, biyofilm geliştirme modeli için yaygın olarak kullanılan bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın (Ryder vd., 2007: 646) yüzey bağlanma yeteneği ve biyofilm oluşturma kapasitesini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur.

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, biyoaktif postbiyotik metabolitlerin bağırsak sağlığının korunmasında, bağırsak hastalıklarının iyileştirilmesinde ve doğuştan gelen bağırsıklığın güçlendirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kanserin veya inflamatuvar hücrelerin probiyotik aracılı postbiyotiklerle baskılanması ve LAB kaynaklı postbiyotiklerin, anti-kanser ve anti-inflamatuvar etki gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Chuah vd., 2019: 9).

Konstantinov ve arkadaşları, kolon sağlığının korunmasında postbiyotiklerin önemi açıklamıştır ve postbiyotiklerin canlı bakterilere kıyasla daha güvenli bir alternatif olabileceğini öne sürmüştür (Konstantinov vd., 2013: 745). Ayrıca, postbiyotiklerin kolorektal kanserin geç evrelerindeki hastaların yaşam kalitesini arttıracak, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi bağırsakla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde postbiyotiklerin kullanılabilirliği önerilmiştir (Konstantinov vd., 2013: 745; Tsilingiri vd., 2012: 1009). *Lactobacillus* suşlarından elde edilen ekzopolisakkaritin, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kromatin yapısında değişikliklere neden olduğu ve ayrıca anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Tukenmez vd., 2019: 2) *Clostridium butyricum* sp. bakterileri tarafından üretilen bütiratın, HCT-116, Caco-2 ve HCT-8 kolorektal kanser hücre hatlarında Wnt /  $\beta$ -katenin sinyal yolunu baskıladığı ve bağırsak mikrobiyota bileşimini modüle ettiği (Chen vd., 2020: 457), *Lactobacillus plantarum* hücresiz süpernatantının, MCF-7 hücre hattında apoptotik genlerinin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Sentürk vd., 2020: 45). *Lactobacillus pentosus* B281 ve *Lactobacillus plantarum* B282 kaynaklı hücresiz süpernatantların, Caco-2 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarında, hücre proliferasyonunun azalmasında ve hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmasında rol aldığı bildirilmektedir (Saxami ve ark. 2016: 461). *Lactobacillus casei* ve *Bifidobacterium bifidum* sp kaynaklı hücresiz süpernatantın, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptozu arttırdığı (Arun vd., 2019: 15), *Bifidobacterium* spp kaynaklı hücresiz süpernatantının, SW742 kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (Bahmani vd., 2019: 841). *Lactobacillus plantarum* sp hücresiz süpernatantı, MCF-7 (meme kanseri), HT-29 (kolon kanseri), HepG2 (karaciğer kanseri), HL60 (lösemi) ve K562 (lösemi) hücre hatlarında apoptozu indüklemiştir (Chuah vd., 2019: 9). *Lactobacillus fermentum* sp., hücresiz süpernatantı, HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklerken (Lee vd., 2019: 9), *Lactobacillus rhamnosus* MD'nin hücresiz süpernatantının Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Sharma vd., 2020: 117). Benzer şekilde *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212'nin hücresiz süpernatantı Caco-2, HT-29 ve SW480 kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu azaltmıştır (Kim vd., 2008: 472).

*In vivo*'da fizyolojik, iyi perfüzyonlu koşullar altında, normal dokuların hücre dışı pH'sı, stabil olup kan pH'sına yakın bir değere sahiptir (Boedtkjer ve Pedersen, 2020: 110). HCT-116 ve SW480 kolon kanseri hücrelerinde; normal doku ortamı pH'sı olarak pH 7.5 ortamında *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı, 24 saat inkübasyon sonunda dahi biyolojik olarak aktif hücre sayısı açısından önemli bir değişime neden olmamıştır. Probiyotik süpernatantının patojen üzerindeki etkisini incelediğimiz çalışmaların sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının asidik ortamda daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğundan yola çıkılarak, SsM18 sup.'un kanser hücreleri üzerindeki etkisi, tümör dokusu ortamını taklit etmek üzere pH 5.5'da incelenmiştir. Buna göre asidik bir mikroçevrenin söz konusu olduğu tümör koşullarını taklit etmek üzere tasarlanmış bu yaklaşımda, probiyotik süpernatantının 2 ve 4 saat gibi kısa süreli inkübasyonlarda dahi kanser hücre canlılığında önemli ve anlamlı azalmaya neden olduğu görülmektedir.

pH'sı pH 5.0'e ayarlanan OM süpernatantı ile yapılan deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, bu sonuçlar gözlenen inhibitör etkinin *S. salivarius* M18 süpernatantının asidik pH'sından kaynaklamadığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak pH 7.5 ortamında gerçekleştirilen deneyler ile karşılaştırıldığında verilerimiz, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının asidik tümör mikroçevresinde seçici bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu etki sadece iki boyutlu hücreler için değil, üç boyutlu sferoid kolon kanser modeli için de söz konusudur: pH 5.5 asitliğindeki ortamda 24 saat boyunca kontrol besiyeri (OM) ile muamele edilen HCT-116 sferoidleri, invaziv ve kemo-dirençli bir özellik olarak sıkı (kompakt) bir yapıya sahipken (Sodek vd., 2009: 2065), SsM18 hücresiz süpernatantıyla inkübe edilen sferoidlerinin gevşek ve tabaka benzeri bir morfolojide olduğu gözlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının, asidik tümör mikroçevresinde seçici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Normal doku pH'sında (pH 7.5) M18 suşundan elde edilen postbiyotik ürünlerin kolon kanseri hücre canlılığına anlamlı bir etkisi belirlenmemiştir; ayrıca sağlıklı, primer hücreler olarak HUVEC hücreleri üzerinde de sitotoksik bir etkisi bulunmamıştır. *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının in vitro epitel bariyer bütünlüğünde de bir değişime neden olmadığı gösterilmiştir.

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının apoptotik, anti-proliferatif ve antioksidan etkileri dolayısıyla kolon kanseri tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. LAB suşlarının, Bax gibi hücre döngüsüne dahil olan pro-apoptotik proteinlerin etkisini arttırdığı ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri aşağı regüle ettiği gösterilmiştir (Ghosh vd., 2019: 502). Her ne kadar söz edilen bu apoptotik etkilere neden olan bileşen/bileşenler tam olarak tanımlanmamış olsa da, bu bakteriler tarafından üretilen SCFA'ların, özellikle de butirik asitin etken olabileceği düşünülmektedir (Lamichhane vd., 2020: 1162). SCFA, sindirilemeyen karbonhidratların bakteriyel fermentasyonunun ürünleridir (Gill vd., 2018: 22). Normal hücreler tipik olarak butirik asidi enerji üretimi için bir karbon kaynağı olarak kullanır. Butirik asitin kanserli hücrelerin çoğalmasını önlediği gösterilmiştir (Sean ve Tara, 2017: 1348). Moleküler düzeyde, butirik asidin kanser hücrelerinde bir histon deasetilaz inhibitörü olarak fonksiyon gördüğü ve pro-apoptotik genlerin asetilasyonuna yol açarak ekspresyonlarını artırdığı kaydedilmiştir (Eckschlager vd., 2017: 1414).

Butirik asitin ayrıca CRC patogenezinde önemli bir rol oynadığı varsayılmış olan siklin D1 (hücre döngüsünün G1 ve S fazında hücre ilerlemesinin bir düzenleyicisi) ekspresyonunu azalttığı ve bağırsaklarda, patojenik bakterilere karşı koruyucu bir bariyer görevi gören müsin üretimini de uyardığı gösterilmiştir (Cornick vd., 2015: 2). SCFA'lar ayrıca sağlıklı hücrelerin çoğalmasına yardımcı olan bir enerji kaynağıdır. Bu nitelikler nedeniyle, yeterli SCFA üretimi sağlıklı mikrobiyotanın önemli bir göstergesidir (Sivamaruthi vd., 2020: 10). Bu tez çalışmasında *S. salivarius* M18 probiyotik bakterisinden toplanan hücresiz süpernatantı ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerindeki XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ifadesindeki değişim incelenmiş olup, probiyotik süpernatantının bir anti-apoptotik protein olan XIAP'nin ifadesinde dramatik bir azalmaya neden olduğu; *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantı ile inkübe edilen kolon kanseri hücrelerinde apoptoz meydana geldiği gösterilmiştir.

Son yıllarda, probiyotiklerin prebiyotiklerle birlikte kullanımına dair yapılan çalışmalar artmıştır (Almeida vd., 2019: 155). Kanser söz konusu olduğunda, pro / prebiyotiklerin kanser tedavisinin güvenliğini artırabileceği ve yan etkilerini azaltabileceği önerilmektedir (Marzec ve Feleszko, 2020: 5). Bağırsak mikrobiyotası ve sindirim sistemi arasındaki simbiyotik etkileşimler, bağırsak homeostazının korunmasına büyük ölçüde katkıda bulunur, ancak çevresel değişikliklerin (enfeksiyon, diyet ve yaşam tarzı) neden olduğu bu etkileşimlerin değişmesi, kolon mukozasında hasarı (displazi) ve kolorektal kanser gelişimini teşvik edebilir (Gagnière vd., 2016: 501).

İnülin, suda çözünür bir depolama polisakkaritidir ve insan tarafından sindirilemeyen karbonhidratlar grubu olan fruktanlar arasındadır. Bitki oligo- ve polisakkaritlerini kapsayan fruktanlar, bir veya daha fazla fruktozil-fruktoz bağı içeren fonksiyonel karbonhidratlardır (Rivera-huerta vd., 2017: 5). İnülin, kolonda anaerobik koşullar altında fermente edildiğinde prebiyotik bir etki sergiler ve tercihen alt kolonda Bifidobakterilerin büyümesini uyarır. Hayvan deneyleri, inülin ve oligofruktozun anti-kanserojenik ve anti-metastatik rol oynadığını, tümör büyümesini inhibe ettiğini ve CRC tedavilerini güçlendirdiğini göstermiştir. Bu iki prebiyotığın anti-proliferatif ve anti-apoptotik özellikleri, kanser hücreleri için temel bir substrat olarak glikozun azalan bulunabilirliği ile ilişkilendirilmiştir. CRC’de inülin tipi fruktanların yararlı etkileri üzerine yapılan bir diğer çalışmada söz konusu anti-kanser etkiler, bağırsaklardaki genotoksik karsinojenlere maruz kalınmasının veya bu karsinojenlerin genotoksik etkilerinin azaltılması, proliferasyonun ve metastatik aktivitelerin inhibisyonu ve gen ekspresyonun modülasyonu olarak tanımlanmıştır.

Bununla birlikte CRC dışındaki diğer kanser türleri üzerine yapılan başka çalışmalarda bu sindirilemeyen karbonhidratların kanser önleyici etkilerini, kanser hücrelerinin büyümesi için gerekli olan serum glikoz ve yağ asitleri konsantrasyonunu düşürmek suretiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Mazraeh vd., 2019: 575).

Tapyoka nişastası (Tapioca Starch-TS) ve inülin, prebiyotik aktiviteleri laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda da gösterilmiş olan gıda ürünleridir (Gurbanov vd., 2020: 22; Gurbanov ve Tunçer, 2021: 28). Bu tez çalışmasının sonuçları, inülin ile inkübe edilmiş *S. salivarius* M18’den elde edilen hücresiz süpernatantın, edilmeyen probiyotik bakterilerden elde edilen hücresiz süpernatanta kıyasla daha yüksek bir anti-kanser etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak benzer durum, tapyoka nişastası ile inkübe edilen M18 suşu hücresiz süpernatantı için geçerli değildir. Diyetle alınan karbonhidrat, metabolik enerjinin ana kaynağıdır. Diyetle alınan karbonhidratın neredeyse hepsi bitki kaynaklıdır ve metabolizmada kullanılabilmesi için öncelikli olarak sindirilmeleri gerekir. Kısa zincirli şekerler söz konusu olduğunda ki bunlar disakkaritler olan sukroz, maltoz ve laktoz gibi kısa zincirli şekerlerdir, aradaki glikozidik bağı yıkımı ve monosakkaritlerin oluşumu söz konusudur. Bu yıkım bağırsaklardaki fırça kenar disakkaridazları tarafından gerçekleştirilir. Nişasta ise sindirilme anlamında disakkaritlerden farklıdır. Nişasta  $\alpha$ -D-glukoz ünitelerinden oluşsa da bu ünitler  $\alpha$  (1-4) bağı ile bağlı uzun lineer amiloz zincirleri ya da  $\alpha$  (1-6) bağı ile daha kısa amiloz zincirleri oluşturabilir.

Nişastaların %70 kadarı dallanmış amilopektin yapıdadır. Hem amiloz hem de amilopektinin yapısındaki uzun glukoz üniteleri, nişasta zincirleri arasında interaksiyona neden olarak bölgesel psödokristalin bölgeler oluşturarak, amilaz enziminin sterik olarak ulaşmasını engelleyebilir (Preiss, 2018). Genel olarak, sindirilebilir nişastalar ince bağırsakta  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz ve sükröz izomaltaz tarafından parçalanır ve sonrasında emilir. Ancak, diyetteki tüm nişastaların parçalanması ve ince bağırsakta emilimi yapısal nedenlerden dolayı söz konusu değildir. Bu nedenle bu karbonhidratlar gastrointestinal sistemden gezerken sindirilmeden kalır ki bu tip nişastalar "dirençli nişasta; Resistant Starch-RS" olarak adlandırılır. RS tipleri arasında RS3, gıdaların pişirilmesi sırasında beslenme işlevselliğini ve termal stabilitesini koruyabildiği için gıda endüstrisinde özel ilgi toplar.

Tapyoka, cassava bitkisinin (*Manihot esculenta*) köklerinden elde edilir. Kasote vd. yakın zamanda yayımlanan bir çalışmalarında distile su içinde 120 °C'de 20 dakika boyunca otoklavladıktan sonra soğutulan tapyokada, amiloz: amilopektin oranının, kristellenmenin ve RS3 dirençli nişasta miktarının arttığını göstermiştir (Gurbanov ve Tuñçer, 2021: 28). Bu sebeple bu tez çalışmasında tapyoka nişastası hem sterilizasyonun sağlanması hem de içeriğindeki RS3 dirençli nişasta miktarının arttırılması amacı ile 120 °C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak kullanılmıştır. Fakat tapyoka nişastasının, özellikle % 1.0 (v/w) konsantrasyonu için, *S. salivarius* M18 süpernatantının kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki inhibe edici etkisini azaltacak bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir.

Hatta tapyoka nişastası içeren TSB kontrol besi yeri ile inkübe edilen hücreler için, sadece TSB ile inkübe edilen hücrelere kıyasla hücre proliferasyonunda bir artış trendi söz konusudur. Bu artışın sebebi, tapyoka nişastası içerisinde bulunup, kolon hücreleri tarafından özellikle de stres durumunda (hücre döngüsünün yavaşlaması ya da hücre döngüsü restriksiyonu-tutuklanması gibi) kullanılan (dirençli nişasta grubu dışında) şekerler olabilir. Farklı işleme koşulları, nişasta ve nişasta bazlı gıdalardaki RS tipini ve miktarını etkileyebilir (Chung vd., 2011: 62). Dolayısıyla diyet lifinin aksine, gıdalardaki RS miktarı ve tipi, bağırsaktaki nişasta sindirim oranı için belirleyicidir (Pereira ve Leonel 2014: 301).

Bu sonuçlar söz konusu probiyotik suşun, sadece karyojenik türler üzerinde değil, geniş bir patojen grubu üzerinde antipatojenik etki gösterme potansiyeli olduğunu, oral patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların yanı sıra farklı patojen kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi veya hafifletilmesi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

## 6. SONUÇ

*S. salivarius* M18 suşu, ağız boşluğunda kullanılması önerilen bir bakteriyel replasman probiyotiktir. Bu tez çalışmasının sonucunda literatürde ilk kez, *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatanın, Gram-negatif patojenler olarak *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* büyümesini azalttığını ve patojenik bakterileri antibiyotiğe duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Ayrıca süpernatant, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu büyük ölçüde inhibe etmiştir. Eş zamanlı yapılan çalışmalarda *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatantının kolon kanseri hücreleri üzerindeki hücre canlılığını inhibe edici ve apoptozu uyarıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Normal doku pH'sında (pH 7.5) M18 suşundan elde edilen postbiyotik ürünlerin kolon kanseri hücre canlılığına anlamlı bir etkisi belirlenmemiştir; ayrıca sağlıklı, primer hücreler olarak HUVEC hücreleri üzerinde de sitotoksik bir etkisi bulunmamıştır. Bu nedenle *S. salivarius* M18 hücresiz süpernatant aktivitesi, asidik tümör mikroçevresine seçici bir etkidir ve prebiyotik olarak inülin kullanımı söz konusu inhibisyonu arttırmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürde ilk kez ortaya konmuş olup, *S. salivarius* M18'in probiyotik etkisinin, bilinen inhibe edici ajanların daha detaylı karakterizasyonu ve bu suş tarafından üretilen yeni potansiyel inhibitör biyomoleküllerin tanımlanması doğrultusunda araştırılmasını teşvik edici niteliktedir.

## KAYNAKÇA

- Abatenh, E., Gizaw, B., & Tsegay, Z.** (2018). Health benefits of probiotics. *J Bacteriol Infect Dis.* 2018; 2 (1): 8, 27.
- Ai, Y., & Jane, J. L.** (2018). Understanding starch structure and functionality. In *Starch in food* (pp. 151-178). Woodhead Publishing.
- Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H.** (2017). Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 152-159.
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A.** (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 809-817.
- Appel-da-Silva, M. C., Narvaez, G. A., Perez, L. R., Drehmer, L., & Lewgoy, J.** (2017). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. *Medical mycology case reports*, 18, 15-17.
- Ayachi, O., Barlin, M., Broxtermann, P. N., Kashkar, H., Mauch, C., & Zigrino, P.** (2019). The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is involved in melanoma invasion by regulating cell migration and survival. *Cellular Oncology*, 42(3), 319-329.
- Bahmani, S., Azarpira, N., & Moazamian, E.** (2019). Anti-colon cancer activity of *Bifidobacterium* metabolites on colon cancer cell line SW742. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(9), 835.
- Bakhoun, S. F., & Cantley, L. C.** (2018). The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell*, 174(6), 1347-1360.
- Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K.** (2020). EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis. *Trends in Cell Biology*.
- Berdasco, M., & Esteller, M.** (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell*, 19(5), 698-711.
- Bermudez-Brito, M., Muñoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M. J., Romero, F., & Gil, A.** (2013). Cell-free culture supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. *PLoS One*, 8(3), e59370.
- Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B. S.** (2010). Cancer biomarkers-current perspectives. *Indian J Med Res*, 132(2), 129-149.
- Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F.** (2020). The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer. *Annual Review of Physiology*, 82, 103-126.
- Both, E., György, É., Ábrahám, B., & Lányi, S.** (2011). Beneficial effects of probiotic microorganisms. A review. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 4, 44-58.
- Brown, S., Santa Maria Jr, J. P., & Walker, S.** (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 67, 313-336.

- Calderón, C. E., Tienda, S., Heredia-Ponce, Z., Arrebola, E., Cárcamo-Oyarce, G., Eberl, L., & Cazorla, F. M.** (2019). The compound 2-hexyl, 5-propyl resorcinol has a key role in biofilm formation by the biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *Frontiers in microbiology*, 10, 396.
- Candela, M., Turróni, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., & Brigidi, P.** (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(4), 908.
- Cantarel, B. L., Lombard, V., & Henrissat, B.** (2012). Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PloS one*, 7(6), e28742.
- Cantor, J. R., & Sabatini, D. M.** (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery*, 2(10), 881-898.
- Chatsuwan, T., Wannigama, D. L., Hurst, C., Hongsing, P., Pearson, L., Saethang, T., ... & Storer, R. J.** (2020). A rapid and simple method for routine determination of antibiotic sensitivity to biofilm populations of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Chen, D., Jin, D., Huang, S., Wu, J., Xu, M., Liu, T., ... & Liu, Y.** (2020). *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. *Cancer letters*, 469, 456-467.
- Chen, J., Pitmon, E., & Wang, K.** (2017). Microbiome, inflammation and colorectal cancer. In *Seminars in Immunology* (Vol. 32, pp. 43-53). Academic Press.
- Chuah, L. O., Foo, H. L., Loh, T. C., Alitheen, N. B. M., Yeap, S. K., Mutalib, N. E. A., ... & Yusoff, K.** (2019). Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 114.
- Clark, M. J., Robien, K., & Slavin, J. L.** (2012). Effect of prebiotics on biomarkers of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Nutrition reviews*, 70(8), 436-443.
- Cohen, P. A.** (2018). Probiotic safety—no guarantees. *JAMA internal medicine*, 178(12), 1577-1578.
- Cousin, F. J., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M. T., Corcos, L., & Jan, G.** (2012). Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PloS one*, 7(3), e31892.
- Cornick, S., Tawiah, A. ve Chadee, K.** (2015). Bağırsaktaki mukus bariyerinin rolleri ve düzenlenmesi. *Doku bariyerleri*, 3 (1-2), e982426.
- Corrêa- Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R.** (2016). Regulation of immune cell function by short- chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e73.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., ... & Rùperez, P.** (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118.
- Couvigny, B., de Wouters, T., Kaci, G., Jacouton, E., Delorme, C., Dore, J., ... & Lapaque, N.** (2015). Commensal *Streptococcus salivarius* modulates PPAR $\gamma$  transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *PloS one*, 10(5), e0125371.

- Cui, T., Bai, F., Sun, M., Lv, X., Li, X., Zhang, D., & Du, H.** (2020). Lactobacillus crustorum ZHG 2-1 as novel quorum-quenching bacteria reducing virulence factors and biofilms formation of Pseudomonas aeruginosa. *LWT*, 117, 108696.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., ... & Ghasemi, Y.** (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.
- De Almeida, C. V., de Camargo, M. R., Russo, E., & Amedei, A.** (2019). Role of diet and gut microbiota on colorectal cancer immunomodulation. *World journal of gastroenterology*, 25(2), 151.
- De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R., & Pietrella, D.** (2018). Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Departamento, C. M., Química, D. I., Vigo, U. De, Ciencias, F. De, De, C.** 2015. "Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos", 31, 99–118.
- Dorai, T., & Aggarwal, B. B.** (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters*, 215(2), 129-140.
- Doron, S., & Snyderman, D. R.** (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl\_2), S129-S134.
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. L.** (2016). Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(4), 177-182.
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J.** (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1414.
- El-Mokhtar, M. A., Hassanein, K. M., Ahmed, A. S., Gad, G. F., Amin, M. M., & Hassanein, O. F.** (2020). Antagonistic Activities of Cell-Free Supernatants of Lactobacilli Against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. *Infection and Drug Resistance*, 13, 543.
- Escamilla, J., Lane, M. A., & Maitin, V.** (2012). Cell-free supernatants from probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and cancer*, 64(6), 871-878.
- Feagins, L. A., Souza, R. F., & Spechler, S. J.** (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 6(5), 297-305.
- Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L.** (2011). Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe*, 10(4), 336-347.
- Flanagan, L., Kehoe, J., Fay, J., Bacon, O., Lindner, A. U., Kay, E. W., ... & Prehn, J. H.** (2015). High levels of X-linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein (XIAP) are indicative of radio chemotherapy resistance in rectal cancer. *Radiation oncology*, 10(1), 131.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H.** (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 577.
- Fong, W., Li, Q., & Yu, J.** (2020). Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*, 1-19.

- Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., Spyropoulos, B. G., & Zografos, E. D.** (2008). Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(42), 6453.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C.** (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016.
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., ... & Ruppin, E.** (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature communications*, 2(1), 1-7.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E., & Pérez-Álvarez, J. A.** (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, 43(4), 931-942.
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., ... & Bonnet, M.** (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(2), 501.
- Gallagher, R., Motohashi, N., & Vanam, A.** Restricting anaerobic glycolysis reliance (Warburg effect): novel natural products based therapeutic strategy for cancer treatment. *Arch Gen Intern Med*. 2017; 1 (3): 8-14 *Arch Gen Intern Med* 2017 Volume 1 Issue, 3.
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., ... & Nagtegaal, I. D.** (2014). Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *The Journal of pathology*, 232(2), 199-209.
- Gao, J., Li, Y., Wan, Y., Hu, T., Liu, L., Yang, S., ... & Zeng, Z.** (2019). A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. *Frontiers in microbiology*, 10, 477.
- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., Wu, W., & Qin, H.** (2015). Probiotics modify human intestinal mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *Molecular medicine reports*, 12(4), 6119-6127.
- Gao, W., Chen, L., Ma, Z., Du, Z., Zhao, Z., Hu, Z., & Li, Q.** (2013). Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology*, 145(3), 636-646.
- Ghosh, T., Beniwal, A., Semwal, A., & Navani, N. K.** (2019). Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Frontiers in microbiology*, 10, 502.
- Gill, P. A., Van Zelm, M. C., Muir, J. G., & Gibson, P. R.** (2018). Short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 48(1), 15-34.
- Gogineni, V. K., Morrow, L. E., & Malesker, M. A.** (2013). Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *J Prob Health*, 1(101), 2.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M.** (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gurbanov, R., Karadağ, H., Karaçam, S., & Samgane, G.** (2020). Tapioca Starch Modulates Cellular Events in Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* Strains. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-13..

- Gurbanov, R., & Tunçer, S.** The Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy to Determine Potential Starch-based Prebiotics. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(1), 22-30
- Gutschner, T., & Diederichs, S.** (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703-719.
- Halbrook, C. J., & Crawford, H. C.** (2019). Hiding in plain sight. *Science*, 364(6446), 1132-1133.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.** 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hegarty, J. E., Harding, J. E., Gamble, G. D., Crowther, C. A., Edlin, R., & Alsweiler, J. M.** (2016). Prophylactic oral dextrose gel for newborn babies at risk of neonatal hypoglycaemia: a randomised controlled dose-finding trial (the Pre-hPOD Study). *PLoS medicine*, 13(10), e1002155.
- Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D.** (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?. *F1000Research*, 5.
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., ... & Pettersson, S.** (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3047-3052.
- Heng, H. H., Bremer, S. W., Stevens, J. B., Horne, S. D., Liu, G., Abdallah, B. Y., ... & Christine, J. Y.** (2013). Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 325-340.
- Heng, N. C., Haji-Ishak, N. S., Kalyan, A., Wong, A. Y., Lovrić, M., Bridson, J. M., ... & Cullinan, M. P.** (2011). Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18.
- Herrington, W. G., Preiss, D., Haynes, R., von Eynatten, M., Staplin, N., Hauske, S. J., ... & Wanner, C.** (2018). The potential for improving cardio-renal outcomes by sodium-glucose co-transporter-2 inhibition in people with chronic kidney disease: a rationale for the EMPA-KIDNEY study. *Clinical kidney journal*, 11(6), 749-761.
- Herzog, P., Drosten, C., & Müller, M. A.** (2008). Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virology journal*, 5(1), 138.
- Homayouni Rad, A., Aghebati Maleki, L., Samadi Kafil, H., & Abbasi, A.** (2020). Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-8.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., ... & Flavell, R. A.** (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9862-9867.
- Kasote, D. M., Nilegaonkar, S. S., & Agte, V. V.** (2014). Effect of different processing methods on resistant starch content and in vitro starch digestibility of some common Indian pulses.

- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., & Baba, Y.** (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer cell international*, 13(1), 1-8.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I.** (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351), 327-336.
- KB, A., Madhavan, A., TR, R., Thomas, S., & Nisha, P.** (2019). Short chain fatty acids enriched fermentation metabolites of soluble dietary fibre from *Musa paradisiaca* drives HT29 colon cancer cells to apoptosis. *PloS one*, 14(5), e0216604.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M.** (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Khangwal, I., & Shukla, P.** (2019). Prospecting prebiotics, innovative evaluation methods, and their health applications: a review. *3 Biotech*, 9(5), 187.
- Kim, Y., Lee, D., Kim, D., Cho, J., Yang, J., Chung, M., ... & Ha, N.** (2008). Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. *Archives of pharmacal research*, 31(4), 468.
- Koliarakis, I., Messaritakis, I., Nikolouzakis, T. K., Hamilos, G., Souglakos, J., & Tsiaoussis, J.** (2019). Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4146.
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J., & Peppelenbosch, M. P.** (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 741-745.
- Konishi, H., Fujiya, M., Tanaka, H., Ueno, N., Moriichi, K., Sasajima, J., ... & Kohgo, Y.** (2016). Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nature communications*, 7(1), 1-12.
- Kottke, T. E., Stiefel, M., & Pronk, N. P.** (2016). "Well-being in all policies": promoting cross-sectoral collaboration to improve people's lives. *Preventing chronic disease*, 13.
- Kumar, P. S.** (2013). Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*, 24, 90-93.
- Lakatos, P. L., & Lakatos, L.** (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(25), 3937.
- Lamichhane, P., Maiolini, M., Alnafoosi, O., Hussein, S., Alnafoosi, H., Umbela, S., ... & Deshmukh, R. R.** (2020). Colorectal Cancer and Probiotics: Are Bugs Really Drugs?. *Cancers*, 12(5), 1162.
- Lee, J. E., Lee, J., Kim, J. H., Cho, N., Lee, S. H., Park, S. B., ... & Yoo, H. M.** (2019). Characterization of the anti-cancer activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* using 2D vs. 3D culture in colorectal cancer cells. *Biomolecules*, 9(10), 557.
- Lerner, A., Shoenfeld, Y., & Matthias, T.** (2019). Probiotics: if it does not help it does not do any harm. Really?. *Microorganisms*, 7(4), 104.
- Li, S., Ward, R. ve Gao, Q.** (2011). Isı-nem işleminin maş fasulyesi (*Phaseolus radiatus*) nişastasından dirençli nişastanın oluşumu ve fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi. *Gıda Hidrokolloidleri*, 25 (7), 1702-1709.

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W.** (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.
- Lopez, J., & Tait, S. W. G.** (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.
- Luerce, T. D., Gomes-Santos, A. C., Rocha, C. S., Moreira, T. G., Cruz, D. N., Lemos, L., ... & Cara, D. C.** (2014). Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathogens*, 6(1), 33.
- Mahasneh, A. M., & Mahasneh, S. A.** (2017). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from local fermented vegetables (Makdoos). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6, 1673-1686.
- Manning, J., Dunne, E. M., Wescombe, P. A., Hale, J. D., Mulholland, E. K., Tagg, J. R., ... & Satzke, C.** (2016). Investigation of *Streptococcus salivarius*-mediated inhibition of pneumococcal adherence to pharyngeal epithelial cells. *BMC microbiology*, 16(1), 225.
- Mantovani, A., & Pierotti, M. A.** (2008). Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer letters*, 267(2), 180-181.
- Manzat-Saplacan, R. M., Mircea, P. A., Balacescu, L., Chira, R. I., Berindan-Neagoe, I., & Balacescu, O.** (2015). Can we change our microbiome to prevent colorectal cancer development?. *Acta Oncologica*, 54(8), 1085-1095.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., ... & Thomas, L. V.** (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330-339
- Markowiak, P., & Śliżewska, K.** (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J.** (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197.
- Manzat-Saplacan, R. M., Balacescu, L., Gherman, C., Visan, S., Chira, R. I., Bintintan, A., ... & Bintintan, V.** (2015). Is there a correlation between peripheral blood expression of angiogenic transcriptional factors/receptors and colorectal cancer. *J BUON*, 20(5), 1193-1200.
- Mazraeh, R., Azizi-Soleiman, F., Jazayeri, S. M. H. M., & Noori, S. M. A.** (2019). Effect of inulin-type fructans in patients undergoing cancer treatments: A systematic review. *Pakistan journal of medical sciences*, 35(2), 575.
- McNabney, S. M., & Henagan, T. M.** (2017). Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. *Nutrients*, 9(12), 1348.
- Míguez, B., Gómez, B., Gullón, P., Gullón, B., & Alonso, J. L.** (2016). Pectic oligosaccharides and other emerging prebiotics. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, 301-330.
- Mishra, A., & Jha, B.** (2013). Microbial exopolysaccharides. *The Prokaryotes*, 4, 179-192.
- Mokoena, M. P.** (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.

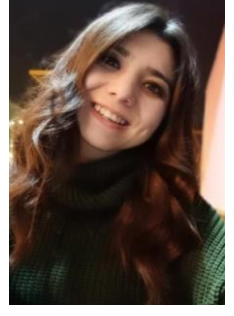
- Monk, J. M., Charusanti, P., Aziz, R. K., Lerman, J. A., Premyodhin, N., Orth, J. D., ... & Palsson, B. Ø.** (2013). Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Escherichia coli* strains highlight strain-specific adaptations to nutritional environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20338-20343.
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yilmaz, N., & Lotfi, A.** (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3390-3415.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F.** (2010, April). Heterogeneity of the tumor vasculature. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 36, No. 3, p. 321). NIH Public Access.
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H.** (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-22.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D.** (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3), 220-228.
- Nishio, J., & Honda, K.** (2012). Immunoregulation by the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), 3635-3650.
- Oelschlaeger, T. A.** (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 57-62.
- Ord, L., Troncoso, A. M., García-parrilla, M. D. C., Maria, R.** 2016. "Analytica Chimica Acta Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages e A review n".
- Ordóñez, J. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. D. C., & Callejón, R. M.** (2016). Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review. *Analytica chimica acta*, 939, 10-25.
- Ostrand-Rosenberg, S.** (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 11-18.
- Österlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., ... & Joensuu, H.** (2007). Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *British journal of cancer*, 97(8), 1028-1034.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V.** (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577-7587.
- Pandya, D.** (2016). Benefits of probiotics in Oral cavity—a detailed review. *Ann Int Med Dent Res*, 2(5), 10-17.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S.** (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in microbiology*, 8, 279.
- Pereira, B. L. B., & Leonel, M.** (2014). Resistant starch in cassava products. *Food Science and Technology*, 34(2), 298-302.

- Pericolini, E., Colombari, B., Ferretti, G., Iseppi, R., Ardizzoni, A., Girardis, M., ... & Blasi, E.** (2018). Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. *BMC microbiology*, 18(1), 84.
- Rad, A. H., Aghebati-Maleki, L., Kafil, H. S., & Abbasi, A.** (2020). Molecular mechanisms of postbiotics in colorectal cancer prevention and treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- Rad, A. H., Maleki, L. A., Kafil, H. S.** (2020). Postbiotics : A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–8.
- Rashid, S.** (2017). *Cancer and chemoprevention: An overview*. Springer.
- Reid, G., & Devillard, E.** (2004). Probiotics for mother and child. *Journal of clinical gastroenterology*, 38, S94-S101.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De Los Reyes-gavilán, C. G., & Salazar, N.** (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, 7, 185.
- Rivera-Huerta, M., Lizárraga-Grimes, V. L., Castro-Torres, I. G., Tinoco-Méndez, M., Macías-Rosales, L., Sánchez-Bartéz, F., ... & Gracia-Mora, M. I.** (2017). Functional effects of prebiotic fructans in colon cancer and calcium metabolism in animal models. *BioMed Research International*, 2017.
- Roche, J.** (2018). The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer.
- Rodríguez-Hernández, M. A., de la Cruz-Ojeda, P., López-Grueso, M. J., Navarro-Villarán, E., Requejo-Aguilar, R., Castejón-Vega, B., ... & Cordero, M. D.** (2020). Integrated molecular signalling involving mitochondrial dysfunction and alteration of cell metabolism during antitumoral properties of tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Redox Biology*, 101510.
- Rosenthal, K. L., Tompkins, W. A. F., & Wachsman, J. T.** (1977). Fibrinolytic activity associated with cultured human neoplastic and normal cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 15(2), 149-153.
- Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., Kouri, M., ... Joensuu, H.** 2007. "Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer : a randomised study", 1028–1034.
- Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J.** (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*, 10(6), 644-648.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R.** (2006). Resistant starch—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(1), 1-17.
- Santagati, M., Scillato, M., Patanè, F., Aiello, C., & Stefani, S.** (2012). Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(1), 23-31.
- Saxami, G., Karapetsas, A., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Chlichlia, A., Tassou, C., ... & Galanis, A.** (2016). Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, 24, 461-471.

- Sears, C. L., & Garrett, W. S.** (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell host & microbe*, 15(3), 317-328.
- Senger, D. R., & Davis, G. E.** (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a005090.
- Sentürk, M., Ercan, F., & Yalcin, S.** (2020). The secondary metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* downregulate BCL-2 and BUFRY genes on breast cancer cell line and model organism *Drosophila melanogaster*: molecular docking approach. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85(1), 33-45.
- Sharifi Yazdi, M. K., Davoodabadi, A., Khesht Zarin, H. R., Tajabadi Ebrahimi, M., & Soltan Dallal, M. M.** (2017). Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. *Italian Journal of Animal Science*, 16(2), 185-188.
- Sharma, M., Chandel, D., & Shukla, G.** (2020). Antigenotoxicity and cytotoxic potentials of metabiotics extracted from isolated probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 on Caco-2 and HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 72(1), 110-119.
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R.** (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology*, 56, 138-146.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G., Barzi, A., & Jemal, A.** (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(3), 177-193.
- Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C.** (2020). The Role of Probiotics in Colorectal Cancer Management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Sodek, K. L., Ringuette, M. J., & Brown, T. J.** (2009). Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *International journal of cancer*, 124(9), 2060-2070.
- Sonnenburg, M. A. F. and J. L.** 2012. "Eating For Two: How Metabolism Establishes Interspecies Interactions in the Gut", 10(4), 336–347.
- Strateva, T., Atanasova, D., Savov, E., Petrova, G., & Mitov, I.** (2016). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 127-133.
- Strober, W.** (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1), A3-B.
- Strober, W.** 2019. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability", 4–6.
- Sudan, S. S., Singh, G., & Batra, B.** (2020). Cancer basics: hallmarks and metastasis.
- Sumrall, E. T., Shen, Y., Keller, A. P., Rismondo, J., Pavlou, M., Eugster, M. R., ... & Wollscheid, B.** (2019). Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InlB-mediated invasion. *PLoS pathogens*, 15(10), e1008032.
- Sun, Y., & O’Riordan, M. X.** (2013). Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 85, pp. 93-118). Academic Press.
- Swann, JB ve Smyth, MJ** (2007). Tümörlerin bağıışıklık gözetimi. *Klinik araştırma Dergisi* , 117 (5), 1137-1146.

- Taylor, P., & Stadler, P. F.** (2012). The hallmarks of cancer A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 9, 1-12.
- Teixeira, A. A., Marrocos, M. S., Quinto, B. M. R., Dalboni, M. A., de Oliveira Rodrigues, C. J., de Melo Carmona, S., ... & Batista, M. C.** (2014). Diversity of apolipoprotein E genetic polymorphism significance on cardiovascular risk is determined by the presence of metabolic syndrome among hypertensive patients. *Lipids in health and disease*, 13(1), 174.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., & Dutilh, B. E.** (2012). A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 575-582.
- Tomasetti, C., Marchionni, L., Nowak, M. A., Parmigiani, G., & Vogelstein, B.** (2015). Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 118-123.
- Tran, V. N., Dasagrandhi, C., Truong, V. G., Kim, Y. M., & Kang, H. W.** (2018). Antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* biofilm under combined exposure of glutaraldehyde, near-infrared light, and 405-nm laser. *PloS one*, 13(8), e0202821.
- Tsilingiri, K., & Rescigno, M.** (2013). Postbiotics: what else?. *Beneficial microbes*, 4(1), 101-107.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., & Rescigno, M.** (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61(7), 1007-1015.
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & Yavuz, S.** (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- Tunçer, S., & Banerjee, S.** (2017). Determination of autophagy in the Caco-2 spontaneously differentiating model of intestinal epithelial cells. In *Autophagy in Differentiation and Tissue Maintenance* (pp. 55-70). Humana Press, New York, NY.
- Tunçer, S., & Karaçam, S.** (2020). Cell-free supernatant of *Streptococcus salivarius* M18 impairs the pathogenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology*, 202(10), 2825-2840.
- Tunçer, S., Çolakoğlu, M., Uluhan, S., Ertaş, G., Karasu, Ç., & Banerjee, S.** (2019). Evaluation of colloidal platinum on cytotoxicity, oxidative stress and barrier permeability across the gut epithelium. *Heliyon*, 5(3), e01336.
- Tunçer, S., Sade- Memişoğlu, A., Keşküş, A. G., Sheraj, I., Güner, G., Akyol, A., & Banerjee, S.** (2019). Enhanced expression of HNF4 $\alpha$  during intestinal epithelial differentiation is involved in the activation of ER stress. *The FEBS journal*.
- Tunçer, S., Sheraj, I., Akyol, A., Banerjee, S.** 2020. "Enhanced expression of HNF4  $\alpha$  during intestinal epithelial differentiation is involved in the activation of ER stress", 287, 2504–2523.
- Valcheva, R., & Dieleman, L. A.** (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 27-37.

- Vesty, A., Gear, K., Boutell, S., Taylor, M. W., Douglas, R. G., & Biswas, K.** (2020). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 on head and neck cancer patients post-radiotherapy: a pilot study. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W.** (2013). Cancer genome landscapes. *science*, 339(6127), 1546-1558
- Wang, L., Cao, H., Liu, L., Wang, B., Walker, W. A., Acra, S. A., & Yan, F.** (2014). Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20234-20244.
- Wescombe, P. A., Hale, J. D., Heng, N. C., Tagg, J. R.** 2012. "Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*". *Future Microbiology*, 7(12), 1355–1371.
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y.** (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*.
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G.** (2020). Probiotic: Conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*.
- Zhang, J. Y., Yan, Y. Y., Li, J. J., Adhikari, R., & Fu, L. W.** (2020). PD-1/PD-L1 Based Combinational Cancer Therapy: Icing on the Cake. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 722.
- Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W.** (2020). Postbiotics—A Step Beyond Pre-and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı: Sevinç Karaçam

Doğum yeri ve tarihi: Muğla/12.06.1995

### **Eğitim Durumu**

Lisans Öğrenimi: BŞEÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yabancı Diller: İngilizce

### **İş Deneyimi**

Stajlar: 18/06/2015 – 17/08/2015 tarihleri arasında Muğla Sıtkı Koçman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı.

05/06/2017 – 23/06/2017 tarihleri arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Hücre Moleküler Biyoloji Laboratuvarı

21/08/2017 – 15/09/2017 tarihleri arasında Muğla Sıtkı Koçman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarı.

### **İletişim Bilgileri**

E-Posta Adresi: [karacamsevinc@gmail.com](mailto:karacamsevinc@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6735-4191

### **Sertifikalar**

İş Sağlığı Ve Güvenliği Eğitimi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi,  
2019 Moleküler Biyoloji Ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi.

## **Sunum**

Sinem Tunçer, Sevinç Karaçam, “Antimikrobiyallerin Biyolojik ve Medikal Uygulamalarında Bir Çözgen Olarak Dimetil Sülfoksit (DMSO)’in ‘İhmal Edilen Doz’ Etkisi”, 9. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloj Kongresi, Türkiye, 2020

## **Yayınlar**

Sinem Tunçer, Sevinç Karaçam. Cell-free supernatant of Streptococcus salivarius M18 impairs the pathogenic properties of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumonia Archives of Microbiology (2020) 202:2825–2840 (DOI: 10.1007/s00203-020-02005-8)

Rafiq Gurbanov, Hazel Karadağ, Sevinç Karaçam, Gizem Samgane. Tapioca Starch Modulates Cellular Events in Oral Probiotic Streptococcus salivarius Strains. Probiotics and Antimicrobial Proteins (DOI: 10.1007/s12602-020-09678-z)

Rafiq Gurbanov, Sevinç Karaçam. TPH1 (tryptophan hydroxylase 1) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2020; 24(11) (DOI: 10.4267/2042/70861)