



***LACTOBACILLUS* SPP.' LERİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARI
ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİSİ**

Bahar YILMAZ

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Berna ERDAL

2025-TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LACTOBACILLUS SPP.*' LERİN KOLON KANSERİ
HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİSİ**

Bahar YILMAZ

1198209203

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Berna ERDAL

Bu Tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından NKUBAP.02.DR.22.438 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2024/176

2025- TEKİRDAĞ

KABUL VE ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Doç.]
danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

03 / 01 / 2025

Jüri Başkanı

Prof.

Üye

Üye

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Bahar YLMAZ' ın “*Lactobacillus Spp.*’ lerin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanser Etkisi” başlıklı tezi 03/01/2025 günü saat 10:00’da Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Akademik yaşamımın başından itibaren bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, karşılaştığım zorluklarda her zaman destek olup farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, sabrı ve anlayışıyla çalışmalarımı kolaylaştıran hem akademik hem insani yönleriyle örnek aldığım, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım, yeri doldurulamayacak değerli danışman hocam sayı

Her zaman desteğini hissettiren Prof.
Laboratuvar ekibine,

Tez çalışmam ve laboratuvar süreçlerimde yardımlarını esirgemeyen öneri ve değerli fikirleriyle katkı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren kıymetli hocam Doç. Dr. D.

Tez çalışmamda kullandığım probiyotik bakteri izolatlarını temin etmemi sağlayan Doç. Dr. D.

Hücre hatlarını temin etmeme destek olan Doç. D.

Analizlerimin bir bölümünü laboratuvarında gerçekleştirdiğim ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum, tecrübesi ve yardımseverliğiyle destek olan değerli hocam Doç. Dr. D.

Laboratuvar çalışmalarım süresince destekleriyle yanımda olan ve birlikte verimli zamanlar geçirdiğimiz değerli ekip arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim süresince, Moleküler Onkoloji ve Kanser Araştırmaları alanı kapsamında destek aldığım YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı'na,

Akademik eğitimim sürecinde, her anımda bana sağladığı sabır, anlayış ve destekle yanımda olan, sevgisiyle yaşamımı anlamlandıran değerli eşim
ve sevgili aileme,

Ve varlığını öğrendiğim andan itibaren bana şans getiren, bu zorlu süreçte beni hiç üzmeyen ve bana güç veren, gülüşü yeter dediğim canım kızıma,

En içten duygularımla sonsuz teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

Bu Tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından NKUBAP.02.DR.22.438 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

Yılmaz, B. *Lactobacillus* Spp.’ lerin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanser Etkisi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Tekirdağ, 2025. Kanser, dünya genelinde en yaygın ölüm nedenlerinden biri olup, halk sağlığını tehdit eden kritik bir hastalıktır. Geleneksel tedavilerin yetersizlikleri, probiyotik bakteriler ve bunların ürettiği biyoaktif bileşiklerin kanser tedavisindeki potansiyelinin bilimsel olarak incelenmesine olan ilgiyi artırmıştır. Bu doğrultuda, probiyotik mikroorganizmalardan elde edilen hücresiz süpernatantlar (CFS), biyoaktif bileşikleriyle kanser hücrelerini hedef alan etkileri sayesinde umut verici bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu çalışmanın amacı, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) ve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (*L. paracasei*)’ den elde edilen CFS’ lerin kolon kanseri hücre hatları (HT-29, Caco-2) ve sağlıklı kolon epitelyum hücre hattı (CCD841 CoN) üzerindeki etkilerini incelemektir. Probiyotik bakterilerden elde edilen CFS’ lerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri, MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları doğrultusunda, hücrelerde floresan boyama ve hücre döngüsü analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, CFS ile muamele edilen hücrelerde apoptoz süreciyle ilişkili Bax, Cas 9, Cas 8 ve Cas 3 gibi pro-apoptotik genlerin yanı sıra Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin ifade düzeyleri kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. MTT testi sonuçlarına göre, bu süpernatantlar kanser hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etki göstermiş ve CCD841 CoN üzerinde minimal toksisite sergilemiştir. IC₅₀ değerleri, her iki hücre hattında canlı ve inaktif CFS’ lerin etkili olduğunu, özellikle inaktif formun apoptozu tetikleyen gen ifadelerini daha güçlü şekilde artırdığını ortaya koymuştur. AO/PI floresan boyama ile apoptoza uğrayan hücre sayısındaki artış doğrulanmıştır. Ayrıca, hücre döngüsü analizinde G0/G1 fazında birikim ve S fazında azalma tespit edilerek hücre proliferasyonunun baskılandığı ve DNA replikasyonunun inhibe edildiği belirlenmiştir. Ayrıca, inaktif CFS’ lerin, pro-apoptotik gen ifadelerinde (Bax, Cas 9, Cas 8, Cas 3) belirgin bir artışa ve anti-apoptotik Bcl-2 geninde azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, canlı ve inaktif CFS’ lerin Caco-2 ve HT-29 hücreleri üzerine antikanser aktivitesinin olduğu görülmüştür. Özellikle bu bakterinin

inaktif CFS' lerinin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Antikanser etkiyi sağlayan biyomoleküllerin çeşitli çalışmalar ile belirlenmesinin kanser tedavisine farklı bir bakış açısı getireceğı düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik Bakteriler, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, Hüresiz Süpernatant, Antikanser, HT-29, Caco-2



ABSTRACT

Yilmaz, B. Anticancer Effect of *Lactobacillus* Spp. on Colon Cancer Cell Lines, Tekirdag Namik Kemal University, Institute of Health Science, Department of Tumor Biology and Immunology, Doctoral Thesis, Tekirdag, 2025. Cancer is one of the most common causes of death worldwide and a critical public health threat. The inadequacies of conventional therapies have increased interest in the scientific investigation of the potential of probiotic bacteria and their bioactive compounds in cancer treatment. In this direction, cell-free supernatants (CFS) derived from probiotic microorganisms have become a promising area of research due to their bioactive compounds targeting cancer cells. The aim of this study was to investigate the effects of CFS from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (*L. paracasei*) on colon cancer cell lines (HT-29, Caco-2) and healthy colon epithelial cell line (CCD841 CoN). The cytotoxic effects of CFSs obtained from probiotic bacteria on cell lines were evaluated by MTT assay. In line with the IC₅₀ concentrations determined as a result of this analysis, fluorescent staining and cell cycle analysis were performed in the cells. In addition, the expression levels of pro-apoptotic genes such as Bax, Cas 9, Cas 8 and Cas 3 as well as anti-apoptotic genes such as Bcl-2, which are related to the apoptosis process in CFS-treated cells, were analyzed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. According to MTT assay results, these supernatants showed a significant cytotoxic effect on cancer cells and minimal toxicity on healthy colon epithelial cell line (CCD841 CoN). IC₅₀ values revealed that both live and inactive CFSs were effective in both cell lines, especially the inactive form more strongly increased apoptosis-inducing gene expression. The increase in the number of cells undergoing apoptosis was confirmed by AO/PI fluorescent staining. Furthermore, cell cycle analysis revealed an accumulation in the G0/G1 phase and a decrease in the S phase, suppressing cell proliferation and inhibiting DNA replication. In addition, inactive CFS caused a significant increase in pro-apoptotic gene expression (Bax, Cas 9, Cas 8, Cas 3) and a decrease in anti-apoptotic Bcl-2 gene. In conclusion, it was observed that live and inactive CFS had anticancer activity on Caco-2 and HT-29 cells. Especially inactive CFSs of this bacterium were found to be more effective. It is

thought that determining the biomolecules that provide anticancer effect with various studies will bring a different perspective to the treatment of cancer.

Keywords: Probiotic Bacteria, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, Cell-Free Supernatant, Anticancer, HT-29, Caco-2



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLOLAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanserler	3
2.1.1. Epidemiyolojisi	6
2.1.2. Risk Faktörleri.....	10
2.1.3. Teşhisi	13
2.1.4. Tedavisi	15
2.2. Gastrointestinal Mikrobiyota ve Özellikleri.....	18
2.3. Probiyotik Suşlar	20
2.4. Probiyotik Bakterilerden Elde Edilen Hücresiz Süpernatantlar.....	21
2.4.1. Hücresiz Süpernatantların Bileşimi.....	22
2.4.2. Hücresiz Süpernatantların Fizyolojik Etkileri.....	23
2.5. Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları	24
2.6. Suş Seçimi.....	27
2.7. Laktik Asit Bakterileri.....	30
2.7.1. Laktik Asit Bakterilerinin Karakteristik Özellikleri	30
2.7.2. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	31
2.7.3. Laktik Asit Bakterilerinin Yaygın Cinsleri	32
2.8. <i>Lactobacillus</i> Cinsi	34
2.8.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	36
2.8.2. <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	38
2.9. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Kansere Tedavisinde Kullanımı	41

2.9.1. İmmün Modülasyon	41
2.9.2. Bağırsak Mikrobiyomu Değişikliği.....	42
2.9.3. Doğrudan Anti-Tümör Etkileri	43
2.9.4. Klinik Uygulamalar.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	46
3.2. Uygulanan Yöntemler	48
3.2.1. Probiyotik Bakterilerin Kültürü	48
3.2.2. Probiyotik Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	53
3.2.3. Probiyotik Bakterilerin Stoklanması	55
3.2.4. Probiyotik Bakterilerin İnaktivasyonu	55
3.2.5. Hücre Kültürü.....	56
3.2.6. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması.....	57
3.2.7. Stoktaki Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi.....	58
3.2.8. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	59
3.2.9. Hücre Hatlarının Dondurulması.....	62
3.2.10. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	63
3.2.11. Sitotoksosite Deneyi	64
3.2.12. Floresan Boyama.....	67
3.2.13. Hücre Döngüsü Analizi.....	69
3.2.14. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....	71
3.2.15. İstatistiksel Analiz.....	79
4. BULGULAR	80
4.1. Probiyotik Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Sonuçları.....	80
4.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	81
4.3. Sitotoksosite Sonuçları.....	81
4.3.1. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN, Hücrelerinde <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ve <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT ve IC ₅₀ değerleri	82
4.4. Floresan Boyama Sonuçları	88
4.5. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları.....	94

4.6. Gen İfadesi Analiz Sonuçları	104
4.6.1. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Bax Gen İfadesi Üzerine Etkisi	104
4.6.2. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 9 Gen İfadesi Üzerine Etkisi	106
4.6.3. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 8 Gen İfadesi Üzerine Etkisi	109
4.6.4. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 3 Gen İfadesi Üzerine Etkisi	111
4.6.5. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Bcl-2 Gen İfadesi Üzerine Etkisi	114
5. TARTIŞMA	117
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	138
KAYNAKLAR	141
EKLER	179
ÖZGEÇMİŞ	180

SİMGELER VE KISALTMALAR

GİS	Gastrointestinal Sistem
CFS	Hücresiz Süpernatantlar
LAB	Laktik Asit Bakterileri
KRK	Kolorektal Kanser
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
KİBH	Kronik İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
HNPPC	Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
İP	İnflamatuvar Polip
İFP	İnflamatuvar Fibroid Polip
HP	Hamartomatöz Polip
FAP	Adenomatöz Polipozis
IBD	İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
SEER	Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar
GLOBOCAN	Evrensel Kanser İstatistikleri
ACS	Amerikan Kanser Derneği
WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonu
AICR	Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
NSAID	Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar
FIT	Fekal İmmünokimya Testi
çhfDNA	Çok Hedefli Fekal Dna Testi
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
mSEPT9	Plazma Metillenmiş Septin 9
miRNA	Mikrorna
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MR	Manyetik Rezonans
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörüne
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünü

EPS	Ekzopolisakkaritler
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asitlerini
IL-6	İnterlökin-6
IL-12	İnterlökin-12
IFN- γ	İnterferon-Gama
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TREG	Düzenleyici T Hücre
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FAO	1,2-Dimetilhidrazin FAO
GRAS	Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen
MRS	Deman, Rogosa And Sharpe
SF	Serum Fizyolojik
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
sn	Saniye
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksiti
CO ₂	Karbondioksit
O ₂	Oksijen
rpm	Revolutions Per Minute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
PBS	Dulbecco's Fosfat Tamponlu Salin
FBS	Fetal Sığır Serum
mM	Mili Molar
μ m	Mikro Metre
μ l	Mikro Litre
°C	Santigrat derece
ml	Mililitre
g	Gram
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromide
IC ₅₀	İnhibitör Konsantrasyonunun Yarısı

DMSO	Dimetil Sülfoksit
AO	Akridin Oranj
PI	Propidyum İyodür
Na-EDTA	Sodyum-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
β 2-ME	B 2-Merkaptoetanol
RNA	Ribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	Komplementer DNA
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
BAX	BCL2 ile İlişkili X Proteini
Cas 9	Kaspaz-9
Cas 8	Kaspaz- 8
Cas 3	Kaspaz- 3
Bcl 2	B Hücreli Lenfoma-2
Ct	Eşik Döngüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kanserin temel özellikleri	3
Şekil 2. 2. İnsan kolorektalinin anatomi.....	4
Şekil 2. 3. Kolorektal kanserin morfolojik gelişimi.....	5
Şekil 2. 4. Dünya çapında kolorektal kanserinin prevalansı.	7
Şekil 2. 5. Kadın ve erkeklerde görülen kanser çeşitlerinin insidans ve mortalite oranları	7
Şekil 2. 6. Dünya çapında kolorektal kanserin insidansı.	8
Şekil 2. 7. Dünya çapında kolorektal kanserin mortalitesi.....	8
Şekil 2. 8. Cinsiyete Göre En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Standardize Edilmiş Hızları	9
Şekil 2. 9. Tüm Yaş Gruplarında Cinsiyete Göre En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları	9
Şekil 2. 10. Kolorektal kanser risk faktörleri	10
Şekil 2. 11. Kolorektal kanserin evresine bağlı olarak sıklıkla kullanılan tedaviler..	16
Şekil 2. 12. Probiyotiklerin etki mekanizması	26
Şekil 2. 13. Probiyotik gıdaların üretiminde FDA ve WHO'nun belirlediği kriterler	29
Şekil 2. 14. Laktik asit bakterilerinin karakteristik özellikleri.....	30
Şekil 2. 15. En yaygın olarak bilinen LAB cinsleri	33
Şekil 2. 16. <i>Lactobacillus</i> cinsinin 16S rRNA gen dizilerinin bölünmüş ayrışma analizi.....	35
Şekil 2. 17. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ' un (×30.000) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	36
Şekil 2. 18. <i>Lactobacillus paracasei</i> MK1'in (×30.000) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	39
Şekil 3. 1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 16S rDNA BLAST analizi .	50
Şekil 3. 2. <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 16S rDNA BLAST analizi	51
Şekil 3. 3. MRS sıvı besiyerinde probiyotik bakterilerin kültürü	52
Şekil 3. 4. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının MRS agar ve sıvı besiyerinde saf kültürleri	52
Şekil 3. 5. Gram boyama yöntemi aşamaları	54

Şekil 3. 6. Probiyotik bakterilerin stoklanması	55
Şekil 3. 7. Bakterilerin su banyosunda ısı ile inaktivasyonunu ve MRS agarda kontrolü	56
Şekil 3. 8. Besiyeri hazırlığı ve aliquotlara ayrılması	58
Şekil 3. 9. HT-29 hücrelerinin invert mikroskopu altındaki görüntüsü	60
Şekil 3. 10. Caco-2 hücrelerinin invert mikroskopu altındaki görüntüsü	60
Şekil 3. 11. CCD841 CoN hücrelerinin invert mikroskopu altındaki görüntüsü	61
Şekil 3. 12. Hücrelerin Pasajlanması	62
Şekil 3. 13. Thoma lamının mikroskopu altındaki görüntüsü (10X)	64
Şekil 3. 14. 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plağındaki CCD841 CoN hücrelerinin görüntüsü	66
Şekil 3. 15. MTT testi yapılan plakaların görüntüsü.....	67
Şekil 3. 16. DxFLEX B4-R2-V3 Flow Cytometer Autoloader cihazı	69
Şekil 3. 17. PureLink® RNA Mini Kit protokolünün şematik gösterimi	72
Şekil 3. 18. Nanodrop spektrofotometre cihazı.....	73
Şekil 3. 19. Optimum değerlerde olan HT-29 hücre hattının RNA örneğine ait yoğunluk ve dalga boyu (nm) görüntüsü	73
Şekil 3. 20. Optimum değerlerde olan Caco-2 hücre hattının RNA örneğine ait yoğunluk ve dalga boyu (nm) görüntüsü	74
Şekil 3. 21. Thermal Cycler cihazı.....	75
Şekil 3. 22. qPCR için kullanılan LightCycler 2.0 cihazı	77
Şekil 3. 23. HT-29 hücre hattında hedef gen (Cas 9) amplifikasyon eğrisi ve Ct değeri	78
Şekil 3. 24. HT-29 Hücre hattında referans gen (GAPDH) amplifikasyon eğrisi ve Ct değeri	78
Şekil 4. 1. Gram boyama mikroskop görüntüsü, 100X.....	80
Şekil 4. 2. Katalaz testi sonuçları	80
Şekil 4. 3. Oksidaz testi sonuçları	81
Şekil 4. 4. HT-29 hücrelerine uygulanan <i>L. bulgaricus</i> (A) ve <i>L. paracasei</i> (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü.....	83
Şekil 4. 5. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı HT-29 hücrelerinde canlılık grafiği.....	83

Şekil 4. 6. HT-29 hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ sonuçları	84
Şekil 4. 7. Caco-2 hücrelerine uygulanan <i>L. bulgaricus</i> (A) ve <i>L. paracasei</i> (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü ...	85
Şekil 4. 8. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı Caco-2 hücrelerinde canlılık grafiğı	85
Şekil 4. 9. Caco-2 hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ sonuçları.....	86
Şekil 4. 10. CCD841 CoN hücrelerine uygulanan <i>L. bulgaricus</i> (A) ve <i>L. paracasei</i> (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü.....	87
Şekil 4. 11. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı CCD841 CoN hücrelerinde canlılık grafiğı	87
Şekil 4. 12. CCD841 CoN hücrelerinde <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ sonuçları.....	88
Şekil 4. 13. <i>L. paracasei</i> izolatlarının inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen Caco-2, HT-29 ve CCD841 CoN hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri	89
Şekil 4. 14. HT-29 hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)	90
Şekil 4. 15. Caco-2 hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)	91
Şekil 4. 16. CCD841 CoN hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X).	92
Şekil 4. 17. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde belirlenen IC ₅₀ dozlarının, CCD 841 CoN hücrelerinde uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)	93

Şekil 4. 18. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri	96
Şekil 4. 19. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29 hücre gruplarında dağılımın % grafiği.....	97
Şekil 4. 20. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri	99
Şekil 4. 21. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre gruplarında dağılımın % grafiği.....	100
Şekil 4. 22. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri	102
Şekil 4. 23. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre gruplarında dağılımın % grafiği.....	103
Şekil 4. 24. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki BAX geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği	105
Şekil 4. 25. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 9 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği	108
Şekil 4. 26. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 8 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği	110
Şekil 4. 27. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 3 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği	113
Şekil 4. 28. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN	

hücrelerindeki Bcl-2 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafığı	.115
--	------



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar (Uymaz, 2010; Markowiak ve Ślizewska, 2017).	21
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve ülkeleri.....	46
Tablo 3. 2. Çalışmalarda kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve katalog numaraları.....	47
Tablo 3. 3. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besiyerlerinin içeriği.....	53
Tablo 3. 4. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri	57
Tablo 3. 5. cDNA’da kullanılacak reaksiyon bileşenleri ve hacimleri	74
Tablo 3. 6. cDNA sentezinin reaksiyon programı.....	75
Tablo 3. 7. Primer dizileri ve amplikon uzunlukları	76
Tablo 3. 8. qPCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri.....	76
Tablo 3. 9. qPCR programı	77
Tablo 4. 1. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29 hücre döngüsü üzerine kontrole göre gösteren akış sitometri sonuçları.....	97
Tablo 4.2. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri sonuçları	100
Tablo 4.3. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri sonuçları	103
Tablo 4.4. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki BAX geninin kat değişimleri ve <i>p</i> değerleri.....	106
Tablo 4. 5. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 9 geninin kat değişimleri ve <i>p</i> değerleri.....	108
Tablo 4. 6. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>L. paracasei</i> izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC ₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 8 geninin kat değişimleri ve <i>p</i> değerleri.....	111

- Tablo 4. 7. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 3 geninin kat değişimleri ve p değerleri..... 113
- Tablo 4. 8. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Bcl-2 geninin kat değişimleri ve p değerleri..... 116



1. GİRİŞ

Kolorektal kanser, dünya genelinde erkek ve kadınlarda yaygın olarak görülen bir kanser türüdür ve kansere bağlı ölümler arasında önemli bir yer tutmaktadır (Rawla ve diğ. 2019). Kolorektal kanserin görülme sıklığının özellikle gelişmiş ülkelerde daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum; yaşam tarzı, çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıkları ile ilişkilendirilirken aynı zamanda genetik yatkınlık da bu hastalığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Siegel ve diğ. 2018). İleri yaş, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, sedanter yaşam, sigara ve alkol kullanımı gibi risk faktörleri kolorektal kanserin ortaya çıkışında etkili bulunmuştur (Arnold ve diğ. 2023). Erken teşhis için çeşitli tarama yöntemleri kullanılmakta olup; kolon kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi farklı tedavi seçenekleri uygulanmaktadır (Fillon, 2022).

Gastrointestinal sistem (GİS) mikrobiyotası, insan sağlığı üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotası ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiye dair bilimsel çalışmalar artmaktadır. Araştırmalar, GİS mikrobiyotasının bağırsak sağlığını etkilediğini ve bazı durumlarda kanser gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (Gomaa, 2020; Lazar ve diğ. 2018). Bu mikrobiyota; bakteriler, virüsler, mantarlar ve arkealardan oluşan, bireyin sağlık durumunu büyük ölçüde etkileyen geniş bir mikroorganizma topluluğunu içermektedir. Özellikle probiyotik bakterilerin inflamasyon, immün yanıt ve kanser gelişimi üzerinde etkili olabildiği görülmektedir (Schwabe ve Jobin, 2019; Garrett, 2015; Yoo ve diğ. 2020). Bu mikroorganizmaların bağırsak sağlığını doğrudan etkileyerek kanser gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda probiyotik bakterilerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri ve kanser önleyici potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Probiyotikler, GİS'te bulunan patojen bakterilerin büyümesini engelleyen, immün sistemin düzenlenmesine katkıda bulunan ve sağlıklı bir mikrobiyota dengesinin korunmasına yardımcı olan faydalı mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar, bağırsak ortamında çeşitli metabolitler üretmekte olup, bu metabolitlerin sağlıklı bir mikrobiyota dengesi sağlama ve immün yanıtı destekleme potansiyeli bulunmaktadır (Sanders ve diğ. 2018). Özellikle, probiyotik bakterilerden elde edilen hücresiz süpernatantlar (CFS), hücre dışında sentezlenen ve hücrelerin büyümesi sırasında

salınan metabolitleri içermekte olup, bağırsak sağlığını olumlu yönde etkileyen bileşenler olarak değerlendirilmektedir. Hücresiz süpernatantların içeriğinde antimikrobiyal peptitler, organik asitler ve hidrofobik bileşikler gibi çeşitli aktif bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenlerin anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi fizyolojik etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Gomaa 2020; Kim ve Lee, 2022; Khaleel ve diğ. 2023).

Laktik asit bakterileri (LAB), probiyotik özellikleri ile ön plana çıkan ve insan sağlığı üzerinde çeşitli yararlı etkileri olan mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. Sindirim sisteminde doğal olarak bulunan bu bakteriler, sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Probiyotik özellikleriyle tanınan *Lactobacillus* türleri, laktik asit bakterileri arasında yer almakta ve kolorektal kanser tedavisi üzerine yapılan araştırmalarda öne çıkmaktadır (Eslami ve diğ. 2019; Molska ve Reguła, 2019; Tripathy ve diğ. 2021). *Lactobacillus* türlerinin kolorektal kanser tedavisinde immün modülasyon, bağırsak mikrobiyomu düzenlemesi ve doğrudan anti-tümör etkileri yoluyla potansiyel terapötik etkileri bulunmaktadır. Özellikle immün sistemi modüle etme kapasiteleri, bu bakterilerin kanser tedavisinde tamamlayıcı bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmelerine olanak tanımaktadır (Sanders ve diğ. 2018).

Bu çalışmada; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* probiyotik suşlarının, insan kolorektal adenokarsinom hücre hatları olan Caco-2 ve HT-29 üzerindeki anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu değerlendirmelerde, sağlıklı bir bağırsak epitelyum hücresi olan CCD841 CoN hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, bu probiyotiklerden elde edilen CFS'lerin kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerinin ortaya konulması hedeflenmektedir. Bu etkinin, biyoterapötik bir yaklaşım olarak kanser tedavisinde kullanılabilirliği hakkında bilimsel veri sağlaması beklenmektedir. Ayrıca, probiyotik bakterilerin kanser hücre hatlarına karşı spesifik aktivitelerinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerindeki güvenilirlikleri de değerlendirilecektir. Çalışma sonunda elde edilen bulgular ışığında, bu probiyotiklerin klasik kanser tedavilerine ek olarak gelecekte destekleyici biyoterapötik ajanlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanserler

Kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüzce çoğalması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Sağlıklı hücreler belirli bir düzen ve denetim içerisinde proliferasyon olurlar. Ancak kanser hücrelerinde bu kontrol mekanizması bozulur ve hücreler düzensiz bir şekilde bölünmeye devam ederek ölmeleri gereken zamanda ölmezler. (Enane ve diğ. 2018; Benavente ve diğ. 2020).

Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden ayırt edilmesini sağlayan temel özellikleri vardır. Bu özellikler Hanahan ve Weinberg, (2000) tarafından ilk düzenlemelerinde altı adet (mavi) olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ile güncellenen ayırt edici özellikler Hanahan ve Weinberg tarafından 2011 yılında dört adet (siyah), 2022 yılında da dört adet (kırmızı) eklenmesi ile toplamda on dört olarak Şekil 2.1’de verilmiştir. Hanahan ve Weinberg’in 2022’de yayımladığı "Hallmarks of Cancer" çalışması, kanserin biyolojik ve moleküler düzeyde tanımlanmasını daha da ayrıntılı hale getirmiştir. (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011; Hanahan ve Weinberg, 2022).

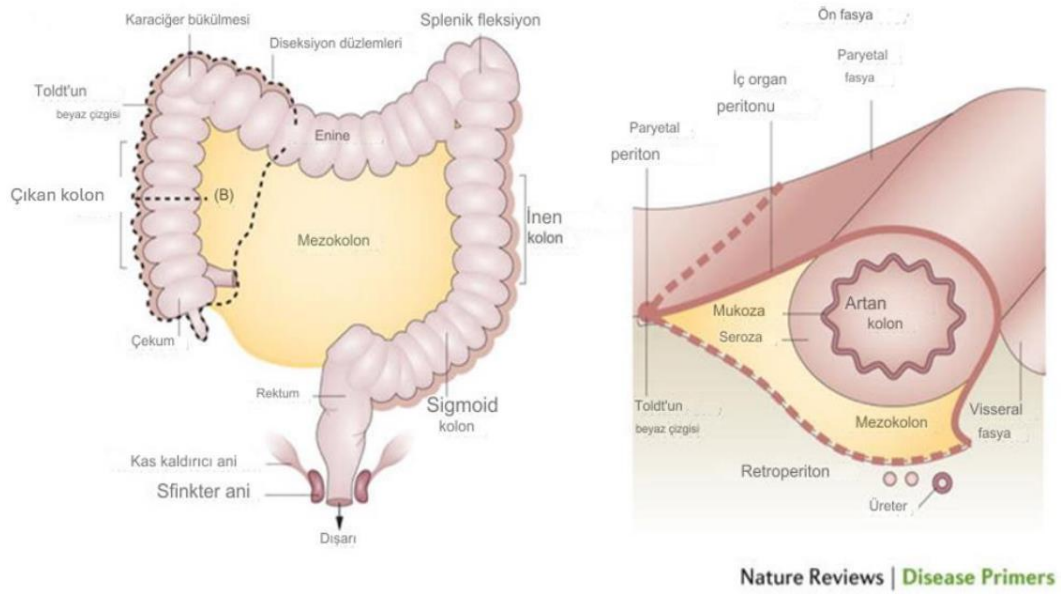


Şekil 2. 1. Kanserinin temel özellikleri

(Hanahan ve Weinberg, 2022 kaynağından Türkçeleştirilerek yenilenmiştir).

Bu özellikler, kanserin nasıl geliştiğini ve ilerlediğini anlamada kritik öneme sahiptir. Hanahan ve Weinberg'in bu çalışması, kanser biyolojisinin temel bir çerçevesini sunarak bu hastalığın tedavisi için gerekli yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlar. Kanser bu biyolojik temelleri, hastalığın geliştiği doku ve organlara bağlı olarak adlandırılan farklı kanser türlerinin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir (Matthews ve diğ. 2022; Li ve diğ. 2024).

Kolorektal kanser (KRK), kolon ve rektumda hücrelerin kontrolsüz şekilde büyümesiyle oluşan bir kanser türüdür. Kolon ve rektum, gastrointestinal sistem (GİS) içinde yer alan sindirim kanalının son kısmını oluşturan ve kalın bağırsığı meydana getiren yapılardır (Şekil 2.2) (Mármol ve diğ. 2017; Hossain ve diğ. 2022). KRK'lar genellikle adenom adı verilen hücre kümelerinden gelişen bir adenokarsinomdur (Keum ve Giovannucci, 2019). Adenomların kansere dönüşme olasılığını belirleyen üç önemli faktör vardır: büyük boyutlara ulaşmaları, kansere dönüşme riski yüksek olan villöz bir yapıya sahip olmaları ve displazi, yani dokuda öncül kanser hücrelerinin bulunması (Konishi ve Morson, 1982).



Şekil 2. 2. İnsan kolorektalinin anatomisi

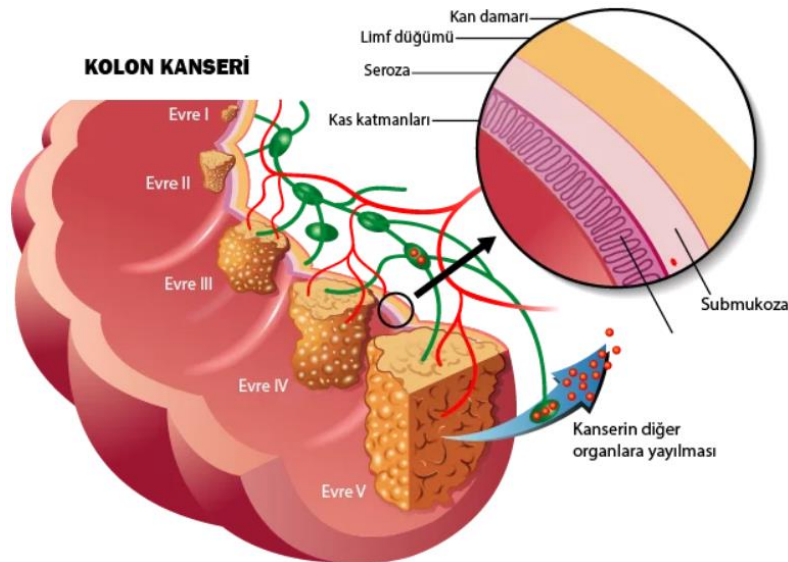
(Kuipers ve diğ. 2015 kaynağından Türkçeleştirilerek yenilenmiştir).

Kolon mukozasında farklı büyüklükte hücre kümeleriyle oluşan kabarıklıklar "polip" olarak adlandırılmakta ve bu lezyonların insidansı yaş ilerledikçe artmaktadır.

Polipler genel olarak neoplastik ve neoplastik olmayan olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Aarons ve diğ. 2014). Neoplastik polipler, kolorektal kanserin öncü lezyonları olarak kabul edilmekte ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından histomorfolojik özelliklerine göre “tubular adenom”, “villöz adenom”, “tubulovillöz adenom” ve “serrated adenom” şeklinde sınıflandırılmaktadır (Rubio ve diğ. 2002; Terry ve diğ. 2002; Yang ve diğ. 2013).

Buna karşılık, neoplastik olmayan polipler “inflamatuvar polip (İP)”, “inflamatuvar fibroid polip (İFP)” ve “hamartomatöz polip (HP)” olarak sınıflandırılmaktadır. Özellikle hamartomatöz polipler, malignite riski taşımayan tümör benzeri bir yapıya sahiptir (Campos ve diğ. 2015). İnflamatuvar polipler, genellikle kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı (KİBH) veya divertikülit gibi kronik inflamatuvar durumlar sonucunda gelişmekte ve reaktif epitel, fibröz doku ile granülasyon dokusundan oluşmaktadır (Hirohashi ve diğ. 2002).

Kolon tümörlerinin büyük bir kısmı ise, zamanla gelişen bir dizi histolojik, morfolojik ve genetik değişiklik sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3) (Simon, 2016; Waldner ve Neurath, 2010).



Şekil 2. 3. Kolorektal kanserin morfolojik gelişimi

(Simon, 2016 kaynağından Türkçeleştirilerek yenilenmiştir)

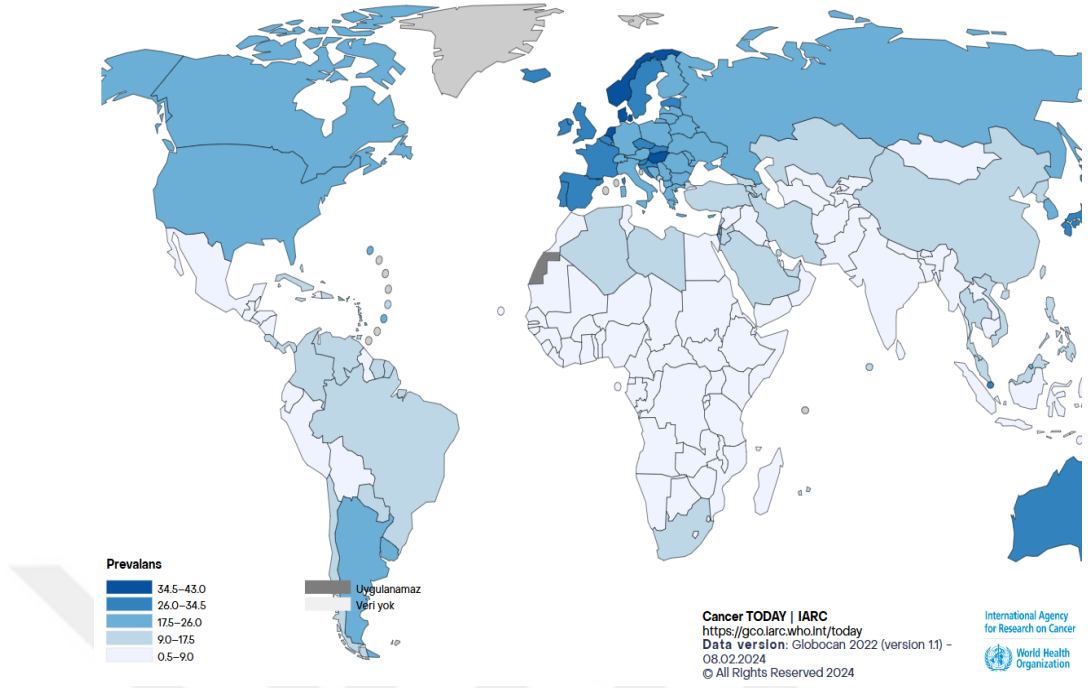
2.1.1. Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında en yaygın görülen kanser türlerinden biri olup, insidansı geniş bir değişkenlik göstermektedir (Gözüm, 2018). Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak dikkat çekmektedir. Kolorektal kanserin görülme sıklığı “prevelansı”, farklı bölgelerdeki demografik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ji ve diğ. 2018; Ferlay ve diğ. 2020).

2020 yılı verilerine göre, yaklaşık 1,9 milyon yeni kolorektal kanser vakası bildirilmiş ve bu sayı küresel kanser yükünün %10'unu oluşturmaktadır (Sung 2021; Bray ve diğ. 2022; Arnold ve diğ. 2023). Kolorektal kanser, dünya çapında en sık teşhis edilen üçüncü kanser türüdür ve ölüm oranları açısından ikinci sırada gelmektedir (Dekker ve diğ. 2019). Ancak, bu kanser türünün görülme sıklığı ülkeler ve bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde yüksek insidans oranları, yaşam tarzı faktörleri ve tarama programlarının yaygın uygulanmasıyla ilişkilendirilmektedir (Siegel ve diğ. 2020). Örneğin, ABD ve Avrupa'da kolorektal kanser daha yaygınken, Afrika ve Asya'nın bazı bölgelerinde daha düşük oranlar gözlenmektedir (Ferlay ve diğ. 2021). Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkelere batı tarzı beslenme ve yaşam biçimlerinin benimsenmesiyle kolorektal kanser insidansında bir artış yaşanmaktadır (Sung ve diğ. 2021). Bu nedenle, özellikle gelişmekte olan ülkelere bu kanser türüne yönelik tarama ve önleme çalışmalarının artırılması gerekmektedir.

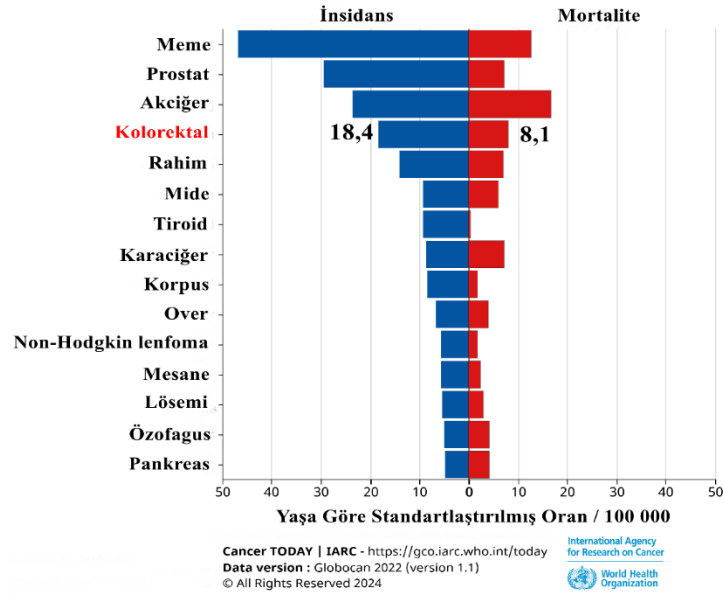
Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) ve Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) programlarına ait Evrensel Kanser İstatistikleri (GLOBOCAN) 2022 verileri incelendiğinde dünya çapında, kolorektal kanserin prevalansı Şekil 2.4.'te gösterildiği gibi Avrupa, Kuzey Asya ve Kuzey Amerika'da en yüksek, Orta Doğu/Güney Asya ve Güney Amerika'da orta, Afrika'da en düşük seviyededir (GLOBOCAN, 2022).

Son yıllarda, tarama yöntemleri ve erken teşhis tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde, kolorektal kanserin erken evrelerde tespit edilme oranı artmıştır. Bu da hastaların yaşam süresini uzatan ve mortalite oranlarını düşüren önemli bir gelişmedir (Lieberman ve diğ. 2021).



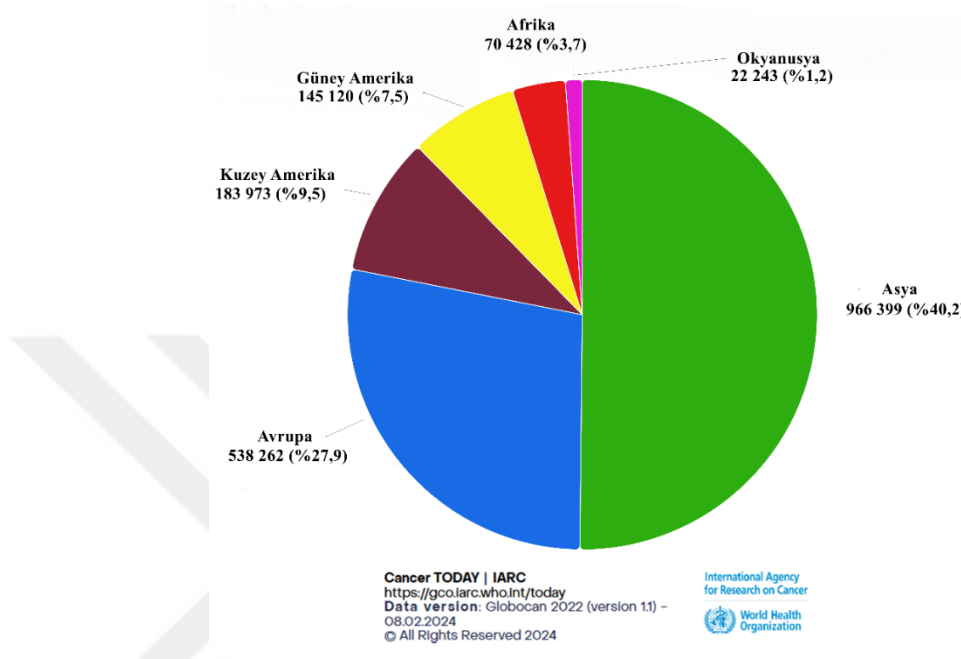
Şekil 2. 4. Dünya çapında kolorektal kanserinin prevalansı (GLOBOCAN, 2022).

Tüm dünyada görülen kanser çeşitlerinin yaşa göre standartlaştırılmış oranı belirlenerek 100 000 kadın-erkek başına insidans ve mortalite oranları GLOBOCAN 2022 tarafından istatistiksel olarak Şekil 2.5.'te gösterilmektedir.

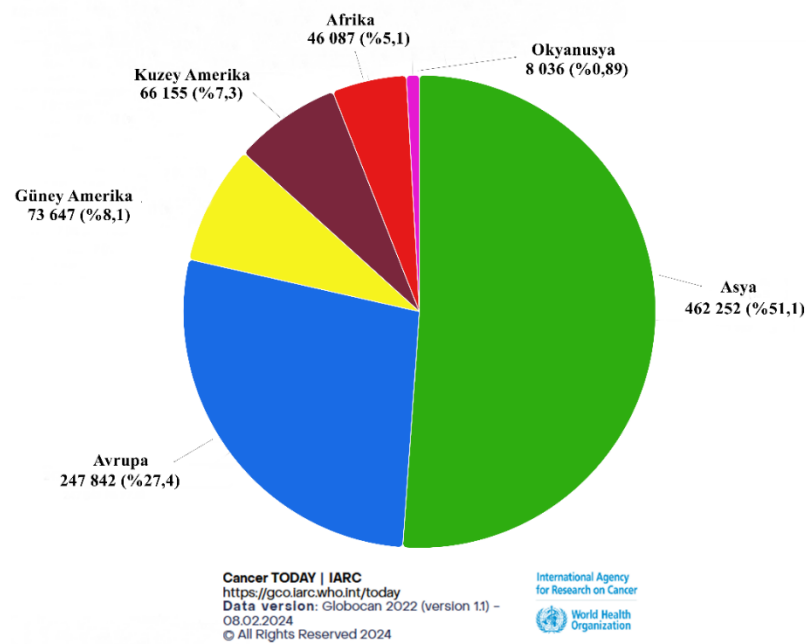


Şekil 2. 5. Kadın ve erkeklerde görülen kanser çeşitlerinin insidans ve mortalite oranları (GLOBOCAN, 2022).

Kolorektal kanserin insidansı geniş bir coğrafik çeşitlilik gösterir. Kolorektal kanserin ülkelere göre insidansı ve mortalite oranları IARC ve GLOBOCAN 2022 tarafından istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 2.6. ve Şekil 2.7.'de yer almaktadır.

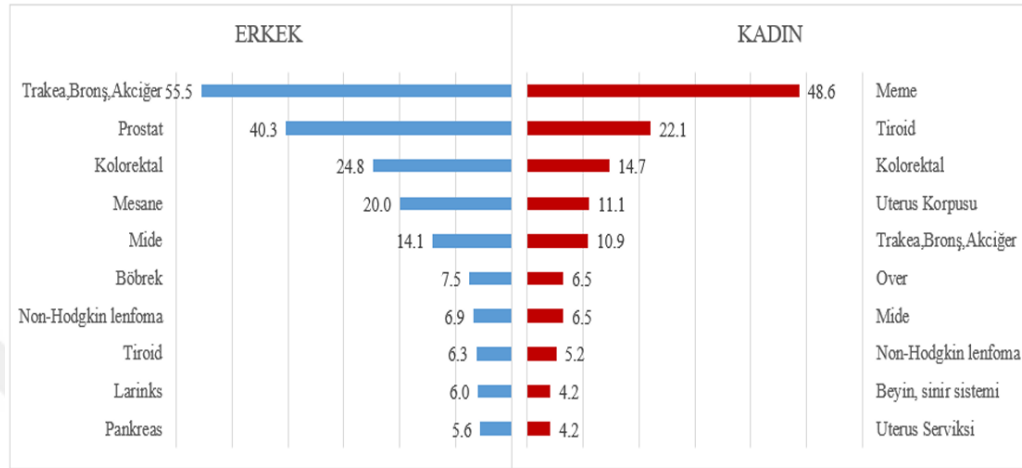


Şekil 2. 6. Dünya çapında kolorektal kanserin insidansı (GLOBOCAN, 2022).



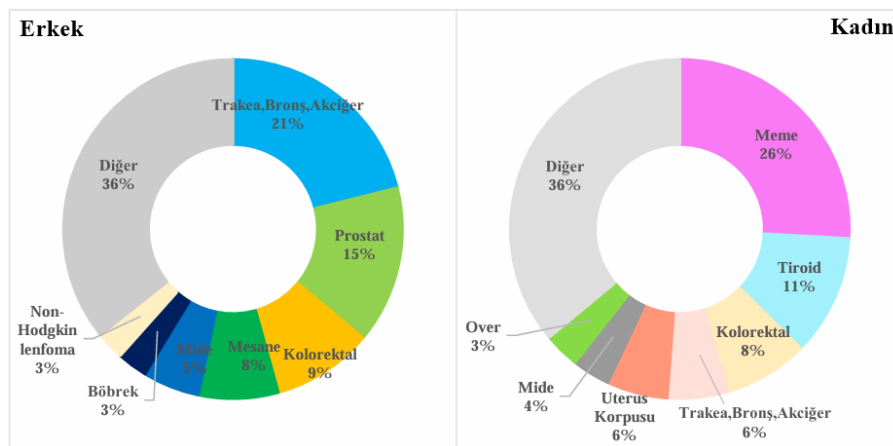
Şekil 2. 7. Dünya çapında kolorektal kanserin mortalitesi (GLOBOCAN, 2022).

Türkiye Kanser İstatistikleri, kolorektal kanserin hem kadınlar hem de erkekler arasında en sık görülen üçüncü kanser türü olduğunu ortaya koymaktadır. Yaşa göre standardize edilmiş insidans hızları, erkeklerde yüz binde 24,8, kadınlarda ise yüz binde 14,7 olarak rapor edilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Cinsiyete Göre En Sık Görülen 10 Kanserlin Yaşa Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2018) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

Türkiye Birleşik Veri Tabanı 2018 yılına ait istatistiksel verilerde 210.537 yeni kanser vakası bildirilmiş olup bunların 20031'i (%9,5) kolorektal kanser vakası olarak raporlanmıştır (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2018). Ülkemizde tüm kadın-erkek kanserlerinin mortalite oranları Şekil 2.9'da belirtilmektedir (IARC, 2022).

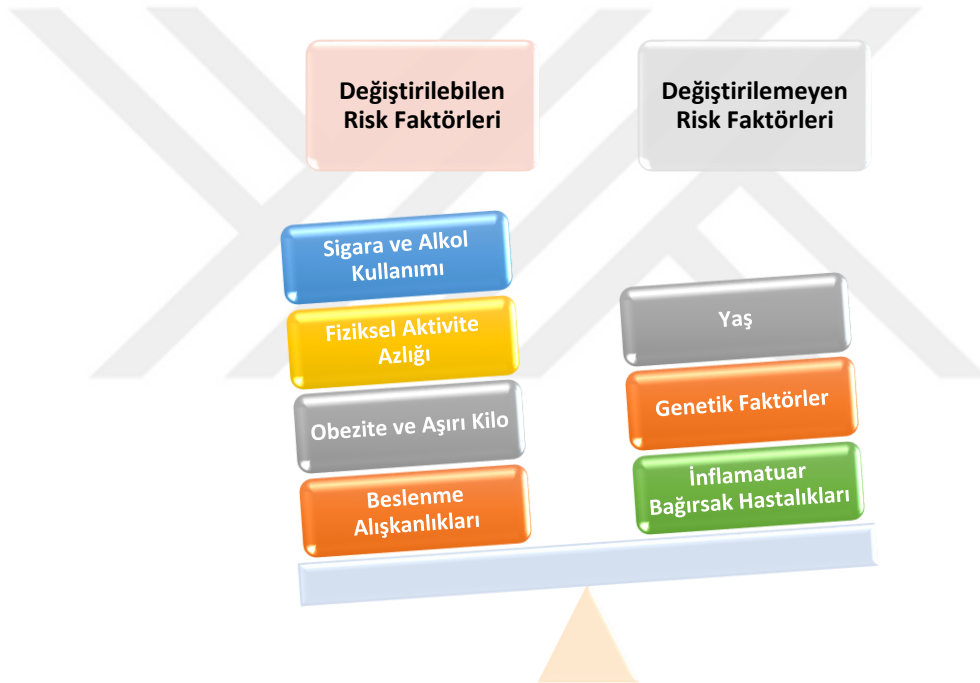


Şekil 2. 9. Tüm Yaş Gruplarında Cinsiyete Göre En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları

(Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2018, melanom olmayan deri kanserleri dahil)

2.1.2. Risk Faktörleri

Kolorektal kanser, çevresel, genetik ve yaşam tarzı faktörlerinin bir araya gelmesiyle oluşabilen bir hastalıktır. Bu risk faktörleri, değiştirilebilen ve değiştirilemeyen olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Şekil 2.10). Değiştirilebilen risk faktörleri arasında obezite ve aşırı kilo, fiziksel aktivite yetersizliği, sağlıklı beslenme alışkanlıkları, sigara ve alkol kullanımı ile düşük lif tüketimi yer almaktadır. Değiştirilemeyen risk faktörleri ise yaş, aile öyküsü, genetik yatkınlık ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları olarak sıralanmaktadır (Macrae ve diğ. 2016; Rawla ve diğ. 2018; Baidoun ve diğ. 2021).



Şekil 2. 10. Kolorektal kanser risk faktörleri

Yaş en önemli risk faktörlerinden biri olup özellikle 50 yaş üstü bireylerde kolorektal kanser riski önemli ölçüde artmaktadır. Amerikan Kanser Derneği (ACS)'nin 2020 yılında yayımladığı raporda yaşın KRK için güçlü bir belirleyici olduğunu vurgulanmaktadır (Amerikan Kanser Derneği, 2020). Dünya geneline bakıldığında vakaların ve ölümlerin yaklaşık %90'ı bu yaştan sonra gözlenmektedir. Yaşa göre düzenlenmiş cinsiyet analizinde ise erkekler kadınlara kıyasla 1,5 katı daha yüksek oranda KRK'ya yakalanma şanssızlığına sahiptir. Yaşlanmanın etkisiyle hücresel

mutasyonlara yol açarak “telomer kısalması” kanser gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir (Brenner ve diğ. 2014; Graff ve diğ. 2017)

Kolorektal kanser riskini önemli ölçüde etkileyen bir diğer risk faktöründe genetikdir. Özellikle Lynch sendromu ve ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) gibi kalıtsal hastalıklar bu riski arttırdığı bilinmektedir. Lynch sendromuna sahip bireylerde kolorektal kanser geliştirme riski %80’e kadar çıkabilir (National Cancer Institute, 2019). Bu nedenle, ailesinde kolorektal kanser öyküsü olan bireylerin erken yaşta tarama yaptırılmaları tavsiye edilmektedir (Win ve diğ. 2017). Bununla birlikte, kolorektal kanserlerin çoğunluğu “sporadik” olarak adlandırılır. Hastaların yarısından fazlasında ailesel bir hastalık öyküsü bulunmamakla birlikte, sporadik kolorektal kanser vakalarında bir aile üyesinde kanser tespit edilmesi, bireyin kansere yakalanma riskini artırmaktadır. Bu risk artışı genellikle genetik faktörlere bağlıdır. Ailesinde kolorektal kanser öyküsü bulunan bireylerde hastalığa yakalanma riski yaklaşık %15 oranında artış göstermektedir (Johns ve Houlston, 2001; Çürük ve Kaçmaz, 2017). Birinci veya ikinci derece akrabalarında kolorektal kanser görülen bireylerin yaklaşık %30’unun genetik yatkınlığa sahip olduğu düşünülmektedir.

Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC), diğer adıyla Lynch sendromu ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP), kalıtsal kolorektal kanserlerin en yaygın örnekleri arasında yer almaktadır (Strate ve Syngal, 2005; Shussman ve Wexner, 2014). Bu genetik sendromlarda, DNA tamir mekanizmasını düzenleyen MMR genlerindeki (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) mutasyonlar Lynch sendromuna neden olmaktadır. Otozomal baskın özellik gösteren bu heterozigot genler, germ hattı yoluyla kalıtsal olarak aktarılmakta ve değiştirilemez risk faktörleri arasında kabul edilmektedir (Ismael ve diğ.2017). Kanser gelişimine neden olabilecek genetik değişiklikler; proto-onkogenlerdeki sorunlar, DNA onarım tamirinde görev alan genlerdeki (p53 tümör baskılayıcı gen vs.) anormallikler ve tümör supresör gen aktivitesinin kaybı olarak sınıflandırılabilir (Munro ve diğ. 2005).

Diyet, kolorektal kanser riskini etkileyen önemli bir faktördür. Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü (AICR) tarafından yapılan değerlendirmelere göre, yüksek miktarda kırmızı et ve işlenmiş et tüketimi, kolorektal kanser riskini artırmaktadır (WCRF ve AICR, 2018). Buna karşın, yüksek

lifli gıdalar ve bitkisel bazlı diyetlerin bu riski azaltabileceğini ortaya koymuştur (Fedirko ve diğ. 2019). Aynı zamanda, yetersiz sebze ve meyve tüketimi de kanser riskini artıran faktörler arasında yer almaktadır (Chan, 2019).

Sigara kullanımı ve aşırı alkol tüketimi, kolorektal kanser riskini artıran önemli yaşam tarzı faktörleri arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), uzun süreli sigara içicilerinde bu kanser türünün daha yaygın olduğunu bildirmektedir (DSÖ, 2019). Ayrıca, bir araştırmaya göre, günde 30 gramdan fazla alkol tüketimi kolorektal kanser riskini önemli ölçüde artırmaktadır (Bagnardi ve diğ. 2015). Obezite de kolorektal kanser için kritik bir risk faktörüdür. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından yayımlanan bir rapor, aşırı kilolu bireylerde bu kanser türünün daha yüksek oranda görüldüğünü belirtmektedir (CDC, 2020). Fiziksel aktivitenin artırılması, bu riski azaltmada etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Moore ve diğ. 2016). Ayrıca, obezite ve sağlıksız beslenme alışkanlıkları bağırsak mikrobiyotasını değiştirir, kalın bağırsak epitel dokusuna kalıcı zararlar verir ve bu da karsinogenezi destekler. Aşırı vücut ağırlığı, metabolik süreçleri bozar ve bunun sonucunda mutasyona neden olan serbest oksijen radikallerinin salınımında artış gözlemlenir. Diyet, kolon ve rektumdaki mikrobiyota sağlığını etkileyerek, kolorektal kanserin gelişimini önemli ölçüde etkileyebilir. (Dahm ve diğ. 2010; O'Keefe, 2016).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, örneğin Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, kolorektal kanser riskini yükselten diğer önemli faktörlerdir. Uzun süreli inflamasyon, bağırsak hücrelerinde kanser gelişimine yol açabilmektedir. Bu hastalıklara sahip bireylerde kolorektal kanser riski genel popülasyona göre daha yüksektir (Jess ve diğ. 2012).

Diyabet, kolorektal kanser gelişimi için metabolik bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabetin insülin direnci nedeniyle kolorektal kanser riskini artırdığı vurgulanmıştır (Amerikan Diyabet Derneği, ADA, 2019). Ayrıca, diyabet hastalarında kolorektal kanser gelişme riskinin %30 daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Tsilidis ve diğ. 2015).

Bazı ilaçlar, özellikle nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID), kolorektal kanser riskini etkileyebilir. Yayımlanan bir araştırma, düzenli NSAID kullanımının

riski %20 oranında azaltılabileceğini belirtmektedir (Cao ve diğ. 2016). Ancak, bu ilaçların yan etkileri göz önünde bulundurularak dikkatli kullanılması gerekmektedir.

2.1.3. Teşhisi

Kolorektal kanser, erken evrede teşhis edildiğinde hastaların tedavi şansını önemli ölçüde artırarak yaşam sürelerini uzatmaktadır. Bu nedenle, düzenli tarama testleri kritik bir öneme sahiptir.

- Dışkı Bazlı Testler

Fekal immünokimya testi (FIT), dışkıda hemoglobin tespiti için insan hemoglobinine özgü antikorlar kullanan ve daha önceki peroksidaz yöntemlerinden daha spesifik bir yaklaşım sunan bir testtir. Diyet ve ilaçların FIT sonuçlarını etkileme düzeyi oldukça düşüktür. Fekal immünokimya testinin duyarlılığı kolonoskopiye göre daha düşük olsa da testin daha fazla kişiye uygulanması durumunda, kolonoskopiyle benzer sonuçlar elde edilebilmektedir. Yıllık veya iki yılda bir yapılan FIT testleri, kolorektal kanser ve öncü lezyonları tespit etmede, yalnızca tek seferlik bir FIT testine göre daha yüksek başarı oranları sağlar. Bu düzenli uygulama, 10 yılda bir yapılan kolonoskopiye benzer bir etki yaratabilir (Shaukat ve diğ. 2024; Imperiale ve diğ. 2020).

Çok hedefli fekal DNA testi (çhfDNA), hem gizli kan tespitinde hem de dışkıdaki metilasyon ve/veya tümör DNA'sının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu test FIT'in duyarlılığını artırmayı hedeflemektedir. Çok hedefli fekal DNA testi, FIT ile ileri adenomlar ya da KRK tarafından üretilen DNA mutasyonlarının saptanmasına yönelik sonuçlarda içermektedir. Ayrıca çhfDNA testinin FIT testine kıyasla, dışkı örneğinin içerisinde tampon bulunan büyük bir kaptan toplanmasını gerektirmektedir. Yapılan bir prospektif çalışmada bu testin özgüllüğünün düşük olması sebebiyle, pozitif sonuç alınan testlerde normal kolonoskopi ile kıyaslandığında yanlış pozitiflik durumları gösterilmiştir (Shaukat ve Levin, 2022).

- Görselleştirme Testleri

Kolonoskopi, kanser öncesi lezyonlar ve kolon kanserinin tanınmasında "altın standart" olarak kabul edilen bir yöntemdir. Çünkü kolonoskopi ile doğrudan gözlem

yaparak kesin bir lokalizasyon sağlanır ve histolojik değerlendirme için doku örnekleri almayı kolaylaştırmaktadır (Conteduca ve diğ. 2013). Yapılan bir çalışmada tarama testi olarak kolonoskopi uygulanan farklı gruplarda kanser mortalitesinin %29-68 oranında daha düşük olduğu belirtilmiştir (Shaukat ve Levin, 2022; Zorzi ve diğ. 2021).

Endoskopik KRK taraması olarak bilinen sigmoidoskopi; “rektum, sigmoid kolon ve inen kolonun” doğrudan gözlemlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntem, uzaktaki kolorektal lezyonların eksizyonu veya biyopsisi için de uygundur. Sigmoidoskopinin kolonoskopiye göre kanamanın az olması, düşük maliyet, sedasyon veya anestezi gerektirmemesi avantajlar olarak sayılabilmektedir (Jain ve diğ. 2022; You ve diğ. 2023). Bu avantajlara rağmen gelişen teknoloji sayesinde kolonoskopinin yaygınlaşması, sigmoidoskopi yönteminin kullanımında belirgin bir azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. (Shaukat ve Levin, 2022; Patel ve diğ. 2022).

Görüntülemeye kullanılan bir diğer yöntem de kolon kapsülüdür. Bu teşhis yönteminde terminal ileumda yutulan ve aktivasyona uğrayan kablolu, hap boyutundaki kamera teknolojisini kullanılmaktadır. Bu kapsül sayesinde kolon mukozası görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir. Diğer görüntülere kıyasla herhangi bir radyasyon, anestezi ve/veya gaz insüflasyonu gerektirmeden yapılma imkânı sunmaktadır (Shaukat ve Levin, 2022).

- Kan Testleri

"Sıvı biyopsi" olarak adlandırılan kan bazlı kanser tespit testleri, tek veya çoklu kanser tanı yöntemleri için yeni bir fırsat sunmaktadır. Kolorektal kanser bağırsak mukozasındaki bazı değişikliklerin (genetik ve epigenetik) bir birleşimi olarak gelişmektedir. Bu durum, kan bazlı tarama testlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır (Jain ve diğ. 2022; Duffy ve diğ. 2007). Kolorektal kanserin tanımlanmasında, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış kan bazlı sadece bir test bulunmaktadır (FDA, 2020). Bu test, Plazma metillenmiş septin 9'u (mSEPT9) kodlayan bir tümör baskılayıcı genin erken aşamada değişen biçimidir (Shaukat ve Levin, 2022).

TriMeth adlı DNA metilasyon testi, KRK ile ilişkili üç spesifik metilasyon belirteçlerini (C9orf50, KCNQ6 ve CLIP4) tespit etmeyi hedeflemektedir. Bunun yanı

sıra, kan bazlı tarama testleri arasında plazma mikroRNA (miRNA) ve plazma protein biyobelirteçlerini belirleyen testler de bulunmaktadır. miRNA, kolorektal kanserin erken evrelerinde ortaya çıktığı ve kanser öncesi ile kanserli hücrelerde düzenlenmediği için KRK taramasında önemli bir biyomarker olarak değerlendirilmektedir. (Jain ve diğ. 2022; Wu ve diğ. 2023).

- Dışkı Bazlı Mikrobiyom Testleri

Dışkı bazlı mikrobiyom testleri, FDA tarafından düşük riskli tarama için henüz onaylanmamış yeni bir yöntemdir. Yüksek dereceli displazisi ve KRK olan bireylerde dışkıda bakteri yükünün artması, KRK ile ilişkili bakteriyel belirteçlerin araştırılmasına neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu testler henüz yeni olduğundan veriler sınırlı kalmıştır. Özellikle adenomlar üzerine 2020 yılında yapılan metagenomik bir çalışmada *Lachnospirillum* spp., *Fusobacterium nucleatum* ve *Clostridium hathewayi* gibi bakterilerin sayıca arttığı gözlemlenmiştir (Saus ve diğ. 2019; Chen ve diğ. 2023). PCR testlerine göre bu tarama yönteminin zorluğu; daha fazla zaman almasının yanında genomik ve/veya metagenomik dizilemenin maliyetli olmasıdır (Saus ve diğ. 2019). Mikrobiyom biyobelirteçlerinin en etkili olanlarını tanımlamak ve testlerin doğruluğu ile maliyetini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

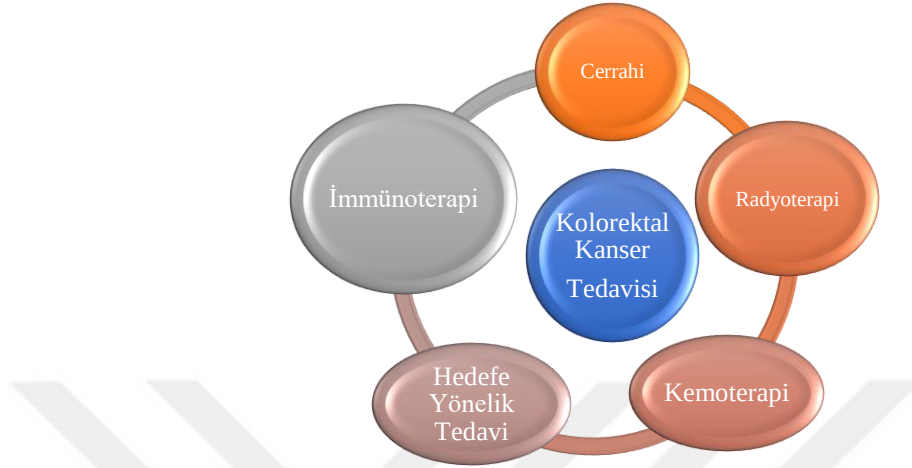
2.1.4. Tedavisi

Kolorektal kanser teşhisi sonrası, kanserin evresini belirlemek tedavi süreci için kritik bir adımdır. Bu süreçte genellikle bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Biyopsi sonuçları ile bu görüntüleme tekniklerinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda, hastalığın yayılım derecesi belirlenir ve daha sonrasında uygun tedavi seçeneklerine karar verilir. Kanser evresine bağlı olarak sıklıkla kullanılan tedaviler; cerrahi, radyasyon, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi olarak belirtilmektedir (Şekil 2. 11) (Cohen ve diğ. 2021).

2.1.4.1. Cerrahi

Erken evre kolorektal kanserin tedavisinde cerrahi müdahale sıklıkla tercih edilen ilk yöntemdir. Tümörün çıkarılması ve gerektiğinde çevresindeki dokuların alınması (rezeksiyon) ile kanserin yayılması engellenmeye çalışılmaktadır. Erken

evrede yapılan cerrahilerin %90 başarı oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Allegra ve diğ. 2020). Bazı vakalarda kolostomi gerekebilir ve bu durum, hastaların yaşam kalitesini etkileyebilir.



Şekil 2. 11. Kolorektal kanserin evresine bağlı olarak sıklıkla kullanılan tedaviler

2.1.4.2. Kemoterapi

Kemoterapi, cerrahi müdahaleden sonra veya kanserin daha ileri evrelerinde uygulanarak kanser hücrelerini yok etmeyi ve hastalığın ilerlemesini durdurmayı amaçlamaktadır. Kemoterapinin, metastaz durumunda yaşam süresini ortalama 12-18 ay uzattığı bir çalışmada gösterilmiştir (Jones ve diğ. 2021). Tedavi intravenöz ya da oral yolla yapılabilir ve yan etkilerin yönetimi tedavinin başarısı için önemlidir. Bu yan etkiler; nötropeni, anemi, diyare, GİS toksisitesi, bulantı, kusma, mukozit, yorgunluk, karaciğer hasarı ve hematolojik sorunlar olabilmektedir (Alam ve diğ. 2021).

2.1.4.3. Radyoterapi

Radyoterapi, yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlamaktadır. Genellikle cerrahiden önce tümörü küçültmek veya cerrahi sonrası kanserin tekrarlama riskini azaltmak için uygulanmaktadır. Bazı çalışmalar, radyoterapi sonrası hastaların %40'ında tümör boyutlarında belirgin bir azalma görüldüğünü bildirmiştir (Perez-Garcia, 2009; Johnson ve diğ. 2022). Bu tedavi yöntemi, dışarıdan (eksternal beam radiation) veya içten (brakiterapi) yapılmaktadır (Shaukat ve Levin, 2022; Thompson ve diğ. 2024).

2.1.4.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavi, kanser hücrelerine özgü belirli moleküler yapılar üzerinde etkili olan ilaçların kullanılmasıdır. Özellikle metastatik kolorektal kanser tedavisinde yaygın olarak uygulanır ve bu tedavi, hastaların yaşam kalitesini iyileştirmede etkili olabilir (Smith ve diğ. 2024). Hedefe yönelik tedavilerin, standart kemoterapiye kıyasla tedavi sonuçlarını %50 oranında iyileştirdiği rapor edilmiştir (Van Cutsem ve diğ. 2016). Hedefe yönelik ilaçlar, tümör gelişimini engellemek amacıyla tümör mikro-çevresini, özellikle kan damarları ve bağışıklık hücrelerini etkilemektedir (Morgado ve diğ. 2022). Kolorektal kanser tedavisinde fluorourasil bazlı kemoterapi ilaçları (örneğin, FOLFIRI, FOLFOX, XELOX) ve bazı hedefe yönelik ilaçlar genellikle kombine edilir; bazıları ise tek başına kullanılabilir. 2004 yılında FDA, KRK tedavisinde ilk hedeflenen ilaç olarak Cetuximab'ı onaylamıştır (Morgado ve diğ. 2022). Cetuximab ve Panitumumab, kolorektal hücrelerde yüksek seviyelerde bulunan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörüne (EGFR) bağlanarak tümör hücrelerinin büyümesini durdurmaktadır (García-Foncillas ve diğ. 2019). Bevacizumab, Aflibercept ve Ramucirumab ise tümör vaskülarizasyonunu ve yeni damar oluşumunu engelleyerek tümör büyümesini azaltan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünü (VEGF) hedeflemektedir (Dakowicz ve diğ. 2022).

2.1.4.5. İmmünoterapiler

Son yıllarda kanser immünoterapisi, alternatif bir tedavi stratejisi olarak önemli gelişmeler göstermiştir. Bu tedavi yöntemi, kanserin ilerlemesini durdurmayı ve hastaların yaşam kalitesini artırmayı hedeflemektedir (Schuster ve diğ. 2011; Ribas ve diğ. 2022). İmmün sürveyans, konakçının bağışıklık sistemi tarafından anormal hücrelerin erken tespit edilip ortadan kaldırılmasını amaçlamaktadır. Ancak, immünosüpresan moleküllerin salgılanması (IL-10 ve TGF- β) immün kaçış mekanizmaları aktif hale getirerek tümör hücrelerinin büyümesine sebep olmaktadır (Kiessling ve diğ. 1999; Sullivan ve Weber, 2022). İmmünoterapi teknikleri, bağışıklık sistemini güçlendirmeyi ve kanser hücrelerine karşı savaşabilmesini amaçlamaktadır. Bu sebeple immünoterapide; aşılar, antikorlar ve *in vitro* uyarılmış immün efektör hücreler gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Marincola ve diğ. 2000; Weber ve diğ. 2022). İmmünoterapi, aktif ve pasif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Aktif immünoterapi, tümör antijenine özgü uzun süreli bağışıklık tepkisini uyarmayı

hedeflerken, pasif immünoterapi büyük miktarda efektör hücreleri veya antikorları tekrar tekrar uygulamaya dayanır (Bertolaccini ve Olivero, 2001; Ragnhammar ve diğ. 1992).

2.2. Gastrointestinal Mikrobiyota ve Özellikleri

Gastrointestinal mikrobiyota, sindirim sisteminde, özellikle ince ve kalın bağırsaklarda yaşayan trilyonlarca mikroorganizmanın (bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoalar) oluşturduğu karmaşık bir ekosistemdir. İnsan mikrobiyomu, genetik yapısı, diyet, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerden etkilenerek bireyden bireye değişiklik göstermektedir (Sommer ve Backhed, 2013). Mikrobiyota, insan sağlığı üzerinde derin etkileri olan çok sayıda biyolojik işlevi destekleyerek sağlığın korunmasında önemli rol oynamaktadır (Rinninella ve diğ. 2019).

Mikrobiyota, insan vücudunda yaklaşık 1000'den fazla bakteri türü ve binlerce genetik varyasyon içeren karmaşık bir mikroorganizma topluluğudur (Lloyd-Price ve diğ. 2016). Bakteriler, genellikle iki ana grupta sınıflandırılmaktadır: *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*. *Firmicutes*, enerji metabolizmasında ve yağ depolanmasında önemli bir rol oynarken, *Bacteroidetes* liflerin sindirilmesi ve besin maddelerinin emilimi konusunda kritik bir öneme sahiptir (Turnbaugh ve diğ. 2009). Bunların yanı sıra, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi belirli bakteriler, bağırsak sağlığını destekleyen yararlı mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Bu bakteriler, sindirim süreçlerine katkıda bulunarak ve bağışıklık sistemini güçlendirerek sağlığı olumlu yönde etkilemektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, mikrobiyotanın genel sağlık üzerindeki etkilerini daha iyi anlamaya yönelik önemli bulgular sunmuştur. Örneğin, Zmora ve diğ. (2019), mikrobiyota dengesizliğinin çeşitli hastalıklarla, özellikle de metabolik hastalıklarla ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Ayrıca, Chen ve diğ. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını iyileştirerek sindirim sağlığını desteklediği belirtilmiştir. Bu bulgular, sağlıklı bir mikrobiyota dengesinin korunmasının önemini ve probiyotiklerin potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır.

Mikrobiyota, besinlerin sindirilmesi ve vücutta enerji üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle lifli gıdalar, bağırsak mikroorganizmaları tarafından fermente edilerek kısa zincirli yağ asitlerini (SCFA) üretmektedir. Bu SCFA'lar, hem

enerji kaynağı olarak kullanılmakta hem de bağışıklık sistemini destekleyerek inflamasyonu azaltma potansiyeline sahip olmaktadır (Cani ve diğ. 2019). Bunun yanı sıra mikrobiyota; B vitaminleri ve K vitamini gibi besin maddelerinin sentezine katkıda bulunarak bağırsak mukozasının sağlığını korumaktadır (Backhed ve diğ. 2005).

Mikrobiyota, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işlevinde de kritik bir rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık hücrelerinin olgunlaşmasına ve düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Bağırsaklardaki yararlı bakteriler, bağışıklık sistemini eğiterek zararlı patojenlere karşı savunma mekanizmalarının güçlenmesini sağlamaktadır (Kau ve diğ. 2011). Ayrıca, mikrobiyota, inflamasyonu ve immün yanıtları modüle ederek otoimmün hastalıkların ve alerjilerin gelişiminde etkili olabilmektedir (Ganal-Vonarburg ve Duerr, 2020).

Dengesiz bir mikrobiyota, obezite, tip 2 diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD) ve bazı kanser türleri ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, obez bireylerde genellikle Firmicutes'in Bacteroidetes'e oranının daha yüksek olduğu görülmektedir; bu durum, enerji emilimini artırarak kilo alımına yol açabilmektedir (Turnbaugh ve diğ. 2009). Ayrıca, mikrobiyota, enfeksiyonlar, bağırsak iltihapları ve irritabl bağırsak sendromu gibi gastrointestinal hastalıkların yanı sıra, bağırsak kanseri gelişiminde de rol oynayabilmektedir. Belirli bakterilerin, bağırsak mukozasında inflamasyonu artırarak kanser gelişimini tetikleyebileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Shreiner ve diğ. 2015; Rosenberg ve Zilber-Rosenberg, 2018). Bireyler arasında mikrobiyota üzerinde önemli farklılıklar görülmektedir. Genetik yapı, diyet, yaşam tarzı, çevresel faktörler, stres ve antibiyotik kullanımı, mikrobiyota kompozisyonunu etkileyen başlıca etkenler arasında yer almaktadır (David ve diğ. 2014). Yüksek lifli ve fermente edilebilir gıdalardan zengin bir diyetin, yararlı bakterilerin çoğalmasını desteklediği, buna karşın yüksek yağ ve şeker içeren bir diyetin, zararlı bakterilerin artışı tetiklediği belirlenmiştir (Zhao ve diğ. 2023). Stres ve uyku düzeninin de mikrobiyota dengesini etkilediği görülmektedir.

Dengeli bir mikrobiyota, sağlığın korunması açısından kritik bir öneme sahiptir. Probiyotiklerin, bağırsakta yararlı bakterilerin sayısını artırarak mikrobiyota dengesini sağlamaya yardımcı olduğu görülmektedir. Prebiyotikler de bu bakterilerin

beslenmesine katkıda bulunmaktadır (Ooi ve Yuen, 2010). Ayrıca, sağlıklı bir diyetin yanı sıra, düzenli fiziksel aktivite ve yeterli uyku da mikrobiyota dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Gastrointestinal mikrobiyota, sindirim sisteminin ve genel sağlığın önemli bir parçasıdır. Mikrobiyota üzerindeki araştırmalar, sağlığımızı etkileyen çok çeşitli mekanizmaları anlamak için kritik bir öneme sahiptir. Mikrobiyota dengesinin sağlanması, sağlıklı yaşam tarzı seçimleri yapmak ve potansiyel sağlık sorunlarını önlemek amacıyla gereklidir (Kau ve diğ. 2011).

2.3. Probiyotik Suşlar

Probiyotik bakteriler, yeterli miktarda alındıklarında bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde etkileyerek, konakçıya fayda sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Hill ve diğ. 2014). Probiyotikler, konakçı canlıda patojenik büyümeyi engeller, bağırsak mikroflorasını korur, bağışıklık sistemini uyarır ve vitaminler ile antimikrobiyal ajanların sentezini sağlarlar (Saxelin ve diğ. 2005). Probiyotiklerin faydaları suşa özgüdür, yani tüm probiyotikler aynı etkinliğe sahip değildir. Her bir suşun benzersiz özelliklerini araştırmak, terapötik potansiyellerini en üst düzeyde anlatmaya yardımcı olabilecektir. Probiyotik terimi, yalnızca bakterileri değil, aynı zamanda mayalar gibi çeşitli mikroorganizmaları da içerir (Tablo 2. 1) (Hill ve diğ. 2014; Sanders ve diğ. 2018)

Tablo 2. 1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar (Uymaz, 2010; Markowiak ve Śliżewska, 2017).

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. gallinarium</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>P. cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>P. shermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cireum</i>
Küfler	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
Mayalar	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>Candida</i> <i>torulopsis</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. marxianus</i>

2.4. Probiyotik Bakterilerden Elde Edilen Hücresiz Süpernatantlar

Probiyotik bakteriler, bağırsak sağlığının korunması ve çeşitli hastalıkların önlenmesi için önemli rol oynamaktadırlar. Her ne kadar probiyotiklerin canlı formları büyük ilgi görsen de bu bakteriler tarafından salınan CFS'ler terapötik potansiyelleri nedeniyle giderek daha fazla araştırılmaktadır (Hill ve diğ. 2014). Bu süpernatantlar, insan sağlığı üzerinde faydalı etkilere sahip olabilecek metabolitler, peptitler ve organik asitler gibi biyoaktif bileşenler içermektedir (Aguilar-Toala ve diğ. 2018).

2.4.1. Hücresiz Süpernatantların Bileşimi

Probiyotik bakterilerin yetiştirilmesi sırasında hücresiz süpernatantlar üretilmektedir. Bakteriler belirli bir büyüme aşamasına ulaştıktan sonra kültür ortamından uzaklaştırılır. Sonuçta çeşitli metabolitlerle zenginleştirilmiş CFS kalmaktadır. Hücresiz süpernatant'ın spesifik bileşimi; probiyotik bakterinin suşuna, büyüme koşullarına ve kullanılan kültür ortamına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Chaluvadi ve diğ. 2015). Hücresiz süpernatantın içeriğinde bulunan temel bileşenler; organik asitler, bakteriyosinler, enzimler ekzopolisakkaritler (EPS), proteinler, biyoaktif peptitler, vitamin ve mineraller' dir.

- **Organik Asitler**

Hücresiz süpernatant'ın önemli bileşenleri SCFA' lar olan asetik, propiyonik ve bütirik asitlerdir. Örneğin, *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) önemli miktarda laktik asit üreterek bağırsak pH'ını düşmesine sebep olarak *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojenlerin gelişimini inhibe etmektedir (Kobayashi ve diğ.2017). Başka bir çalışmada bütirik asidin, bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği ve kolon hücrelerinin sağlığını desteklediği gösterilmektedir (Zhou ve diğ.2020). Son araştırmalar, probiyotiklerin SCFA üretiminin bağırsak sağlığı üzerindeki olumlu etkilerine daha fazla vurgu yapmaktadır (Markowiak ve Śliżewska, 2022; Wang ve diğ. 2023).

- **Bakteriyosinler**

Bakteriyosinler, probiyotik bakteriler tarafından üretilen ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyal peptitlerdir. Örneğin, *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) tarafından üretilen plantarisin, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi patojenlerin büyümesini engellemektedirler (Gänzle, 2015). Bu antimikrobiyal peptitler, zararlı mikroorganizmaların bağırsakta kolonizasyonunu önleyerek mikrobiyota dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, son araştırmalar probiyotiklerin ürettiği bakteriyosinlerin, patojenlerin hücre zarlarını bozarak onları etkisiz hale getirdiğini ve bu mekanizmanın bağırsak sağlığını desteklediğini göstermektedir (De Thoda ve Touraki, 2023; Hu ve diğ. 2024).

- **Ekzopolisakkaritler (EPS)**

Lactobacillus rhamnosus (*L. rhamnosus*) GG ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* gibi probiyotik bakteriler, bağırsak içeriğinin viskozitesini artıran ve faydalı bakterilerin gelişimi için uygun bir ortam sağlayan EPS üretirler. Bu EPS'ler, bağırsak mikrobiyotasının dengelenmesinde ve patojenlerin yerleşmesini engellemede önemli rol oynamaktadırlar (Caggianiello ve diğ. 2016; Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2019). Ayrıca, EPS üretimi bağırsak bariyer fonksiyonlarını güçlendirerek bağışıklık yanıtını artmasına neden olmaktadır (Gonzales ve diğ. 2020).

- **Proteinler ve Biyoaktif Peptitler**

Bazı probiyotikler, fermentasyon sırasında süpernatanta biyoaktif peptitler salgılamaktadır. Örneğin, *Lactobacillus casei* (*L. lactis*) immünomodülatör özelliklere sahip peptitler üretmektedir. Bu peptitler, anti-inflamatuar etki göstererek bağışıklık hücrelerinin aktivitesini artırırlar (Ouwehand ve diğ. 2004). Son araştırmalar, probiyotiklerin ürettiği immünomodülatör peptitlerin, bağışıklık sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı korunmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (García-Santos ve diğ. 2023; De Marco ve diğ. 2022).

2.4.2. Hücresiz Süpernatantların Fizyolojik Etkileri

Hücresiz süpernatantlarda bulunan biyoaktif bileşenler, konakçının sağlığına çeşitli fizyolojik etkiler yoluyla katkıda bulunmaktadır. Son çalışmalardan elde edilen bazı önemli bulgular şunlardır:

- **İmmünomodülasyon**

Hücresiz süpernatantların bağışıklık hücrelerinin aktivitesini teşvik ederek bağışıklık yanıtını arttırmaktadır. Örneğin, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)'tan elde edilen CFS'nin, makrofajlarda interlekin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin üretimini artırdığı, bu sayede bağışıklık tepkisini güçlendirdiği gösterilmektedir (Bäuerl ve diğ. 2018). Bu immünomodülatör etki, enfeksiyonlara karşı daha etkili bir yanıt sağlarken, aynı zamanda otoimmün hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır.

- **Anti-İnflamatuar Özellikler**

Kobayashi ve diğ. yaptığı bir çalışmada, *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) CFS'nin bağırsak epitel hücrelerinde pro-inflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı ve

IBD tedavisine fayda sağlayabileceği belirtilmektedir (De Marco ve diğ. 2018). Ayrıca, bütirik asidin nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonunu inhibe ettiği ve böylece iltihaplanmayı baskıladığı başka bir çalışmada gösterilmektedir (Hýžd'alová ve diğ. 2008)

- **Bağırsak Bariyeri Fonksiyonu**

Hücreli süpernatantlar, bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinden olan bütirik asit, epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları destekleyerek bağırsak bütünlüğünü korumaktadır. Bu da zararlı patojenlerin ve toksinlerin kan dolaşımına geçmesini önlemektedir (Zhou ve diğ. 2020). Ayrıca, *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) CFS' sinin sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesini artırarak bağırsak bariyer işlevini geliştirdiği gösterilmektedir (Gänzle, 2015).

Probiyotik bakterilerden elde edilen CFS' ler, klinik ortamlarda giderek daha fazla tanınmakta ve terapötik potansiyeli üzerine araştırmalar yapılmaktadır. CFS' nin GİS ve bağışıklık fonksiyonunu iyileştirme ve kronik hastalıkları önleme konusundaki rolüne dair birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, yakın zamanda gerçekleştirilen bir klinik çalışma, *L. rhamnosus* CFS' sinin IBD hastalarında semptomları belirgin şekilde iyileştirdiğini göstermiştir (Artusa ve diğ. 2023; Pahumunto ve Teanpaisan, 2023; Salemi ve diğ. 2023; Singh ve diğ. 2024). Gelecekteki araştırmalar, probiyotiklerden elde edilen CFS' nin etkilerini ve mekanizmalarını daha iyi anlamak amacıyla, spesifik biyoaktif bileşenlerin tanımlanmasına ve bu bileşenlerin etkinliğini doğrulamak için kapsamlı klinik çalışmalara odaklanacaktır. Ayrıca, farklı probiyotik suşların CFS üretimindeki sinerjik etkilerinin incelenmesi, bu alanda terapötik uygulamaların optimize edilmesine yönelik değerli bilgiler sunabilecektir. Araştırmalar ilerledikçe, CFS' nin mekanizmaları ve klinik uygulamaları hakkında daha derin bir anlayış sağlanması, insan sağlığını iyileştiren yenilikçi çözümler geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

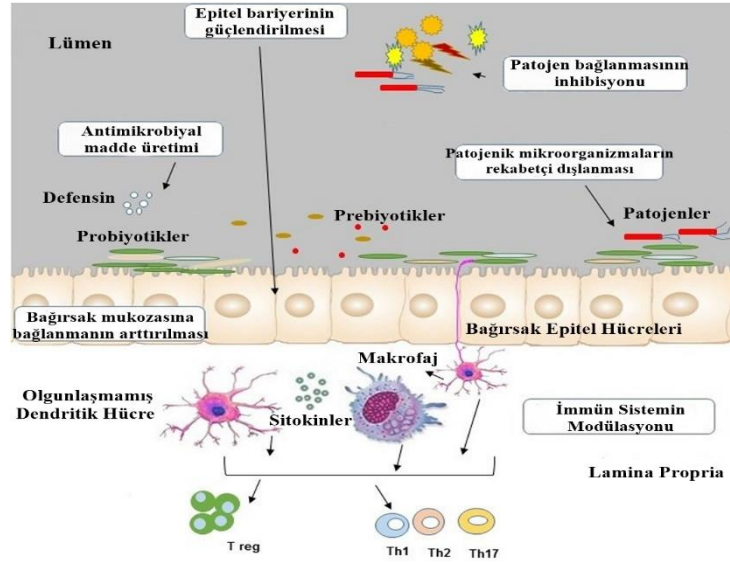
2.5. Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Bağırsak mikrobiyotası, KRK oluşumunda ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyal dengesizlikler, kolondaki inflamatuvar süreçleri tetikleyerek kanser gelişimini hızlandırabilir. İlginç bir şekilde, probiyotiklerin

tüketimi, GİS mikroorganizmaları modüle ederek KRK riskini azaltma potansiyeline sahiptir (Prakash ve diğ. 2011; O'Keefe, 2016). Mikrobiyotadaki dengesizliklerin modülasyonu, kolondaki kanserojen olayları azaltarak terapötik ve/veya önleyici bir etki sağlayabilmektedir (Rafter, 2003; Zhu ve diğ. 2020).

Probiyotikler, DSÖ ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından "yeterli miktarlarda alındığında konakçı sağlığına yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Arora ve Baldi, 2015; Hill ve diğ. 2018). Bu mikroorganizmalar, düşük patojeniteye sahip olup, insan sağlığı ve refahı için önemli işlevlere sahiptir. Probiyotik bakteriler arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* türleri yer alırken, *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) mayası da probiyotik olarak kabul edilmektedir (Fotiadis ve diğ. 2008; Suez ve diğ. 2018). Probiyotikler; diyare, enfeksiyon ve inflamasyon gibi bir dizi GİS bozukluklarının önlenmesinde kullanılmakta olup, KRK'nın önlenmesi ve tedavisindeki rolleri ise hala araştırılmaktadır (O'Keefe, 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, probiyotiklerin bağışıklık yanıtını modüle etme, bağırsak florasını dengeleme ve KRK hücrelerinin büyümesini inhibe etme potansiyelini göstermiştir. Bu nedenle, probiyotiklerin KRK üzerindeki etkileri üzerinde daha fazla çalışma yapılması önem arz etmektedir (Molska ve Reguła, 2019; Badgeley ve diğ. 2021). Probiyotik bakterilerin etkisi, bağırsak sağlığı ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesine önemli katkılar sunmaktadır (Klaenhammer ve diğ. 2012). İlk olarak, bu bakterilerin bağırsak epitel bariyer bütünlüğünü güçlendirdiği ve böylece patojenlerin bağırsak duvarına yapışmasının engellendiği görülmektedir. Ek olarak, bağırsak lümenindeki patojenlerle rekabet ederek zararlı mikroorganizmaların ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Dendritik hücre fonksiyonları ve T hücre polaritesine modülatör etkileri ile immün sistem düzenlenirken, antimikrobiyal üretim, inflamasyon kontrolü ve patojen baskılama gibi mekanizmalarla bağırsak mikrobiyotasının dengelenmesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2. 12). (Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2014; Yousefi ve diğ.2019).



Şekil 2. 12. Probiyotiklerin etki mekanizması

Laktik asit bakterileri bağırsak lümenindeki sekresyonları değiştirip, mukozal bariyeri güçlendirirler. Buda epitel hücre proliferasyonunu etkileyerek kolondaki toksik ve kanserojen bileşiklere maruz kalmayı azaltmaktadır (Pessione, 2012; Wang ve diğ. 2018; Tlaskalová-Hogenová ve diğ. 2011). Son araştırmalar, LAB' ların antikanserojenik etkilerini ve bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek kanser gelişimini inhibe etme potansiyelini ortaya koymaktadır (Garbacz, 2023; Śliżewska ve diğ. 2023). Bunun yanı sıra dengesiz bir GİS mikrobiyotası, karsinogenez için elverişli koşullar sağlayabilmektedir. Probiyotik suşların günlük tüketimi, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek patojenik mikroorganizmaların bağırsak kolonizasyonunu engelleyerek insan sağlığını iyileştirebilmektedir (Rescigno, 2008; Lee, 2009). Örneğin, 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenen KRK modeli kullanılan bir çalışmada, *L. rhamnosus* GG uygulaması koliform bakteri sayısını azaltmış ve çlaktobasil sayısını önemli ölçüde artırmıştır (Bertkova ve diğ. 2010). Ayrıca, keçiler üzerinde yapılan bir çalışmada, *Enterococcus faecium* (*E. Faecium*), *Lactobacillus alimentarius* (*L. alimentarius*), *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) ve *L. reuteri* karışımının enterobakterileri azaltarak bifidobakteri ve LAB sayısını artırdığı gözlemlenmiştir (Apás ve diğ. 2010; Arora ve Baldi, 2015).

Probiyotiklerin, özellikle *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* gibi türlerin, KRK hastalarının bağırsak florasında olumlu değişiklikler yarattığına dair birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, probiyotiklerin sayılarının arttığı ve

patojenik mikroorganizmaların, özellikle de “*E. coli*” ve “*S. aureus*”un sayısını azalttığı gözlemlenmiştir (Zhang ve diğ. 2012; Dikeocha ve diğ. 2022). Bir başka çalışmada *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) Bb12’nin bağırsak florasındaki *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* miktarını artırdığı, aynı zamanda *Clostridium perfringens* (*C. Perfringens*) gibi patojenlerin sayısını azalttığı gösterilmiştir (Mego ve diğ. 2023). Ayrıca, *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) OLL2716 (LG21) suşunun da uygulandığı araştırmalarda benzer etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Koga., 2019). Son yıllarda yapılan araştırmalar, *L. rhamnosus* GG’nin (Jing ve diğ. 2023) ve *Bifidobacterium longum* (*B. longum*)’ un (Kaźmierczak-Siedlecka ve diğ. 2021) bağırsak mikroflorasını düzenleme yeteneklerini ortaya koymaktadır.

Probiyotiklerin onkojenik ve patojenik bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, probiyotiklerin bağırsak ve epitel homeostazını sağlayarak epitel bariyer bütünlüğünü iyileştirme potansiyelleri bulunmaktadır (Rafter, 2003). Probiyotikler; bakteriyosinler, laktik asit, reuterin, hidrojen peroksit ve konjuge safra asitleri gibi antimikrobiyal bileşikler üretilip kanserojenik etki göstererek patojenik mikroorganizmaları da inhibe edebileceği gösterilmiştir (Suskovic ve diğ. 2010). Bazı probiyotik bakteriler, patojenlerle rekabet ederek veya onları bağlayarak epitel hücrelerine yapışmalarını engelleyebilir ve biyofilm oluşturarak patojenlerin yerleşmesini engelleyebilmektedir (Hancock ve Sahl, 2006). Bu çalışmalar, probiyotiklerin GİS mikrobiyotasını düzenleyerek KRK gelişimini önleme ve tedavi etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, bu etkilerin daha net anlaşılması için daha fazla klinik çalışma gereklidir.

2.6. Suş Seçimi

Doğru probiyotik suşunun seçimi, probiyotik ürünlerin formülasyonunda hayati bir öneme sahiptir. Çünkü bu suşların dayanıklılığı ve insan vücudundaki faydaları doğrudan sağlık üzerine etkilerini belirlemektedir (Terpou ve diğ. 2019). Bu suşların, üretim süreçlerine dayanıklılığı, mide-bağırsak sisteminde hayatta kalma kabiliyeti ve potansiyel terapötik etkileri araştırma konusudur. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, probiyotik suşların sağlık üzerindeki etkilerini belirlemek için kullanılabilir (Sanders ve diğ. 2021; Lee ve diğ. 2023; Plaza-Diaz ve diğ. 2019). Bu

tür çalışmalar, probiyotiklerin GİS stabilitesi ve immünolojik etkilerini değerlendirmek için önemlidir (Gogineni ve diğ. 2013). Probiyotik bakterilerin suş seçimi, aşağıda belirtilen temel kriterlere dayanılarak yapılmaktadır.

1. Probiyotik Suşların Tanımı ve Önemi

Probiyotik suşlar, sağlık üzerine faydalı etkiler sunmak amacıyla formüle edilen “özel mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Arora ve Baldi, 2015). Farklı suşların çeşitli biyolojik özellikleri vardır ve her birinin insan sağlığı üzerindeki etkileri farklıdır. Bu yüzden, belirli bir sağlık sorununun yönetimi veya belirli hedefler için en uygun probiyotik suşun seçimi büyük önem taşımaktadır (Verma ve Saxena, 2020; Hill ve diğ. 2014; Sanders ve diğ. 2019). Doğru suş seçimi, probiyotığın beklenen terapötik etkiyi göstermesi açısından kritik bir faktördür.

2. Probiyotik Suşlarının Seçim Kriterleri

- Sağlık Hedefleri

Doğru probiyotik suşu seçerken, öncelikle hedef sağlık sorunlarını belirlemek önemlidir. Örneğin: Sindirim sisteminin sağlığı için *L. rhamnosus* GG ve *B. lactis* gibi suşlar, bağırsak düzenini ve probiyotik dengeyi sağlamada etkilidir (Flach ve diğ. 2018). Bağışıklık sistemi desteklemek amacıyla *L. casei* ve *B. bifidum* suşları önerilmektedir (Sharma ve diğ. 2016).

- Suşların Güvenliği

Probiyotik suşların güvenliği, seçim sürecinde dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerden biridir. Kullanılacak suşların, insanlarda uzun süreli tüketim için güvenli olduğunu kanıtlayan klinik çalışmalara sahip olması gerekmektedir (Ouweland ve Salminen, 2004). Örneğin, *S. boulardii*, antidiyare etkinliği ile bilinir ve güvenli bir şekilde kullanılabilen bir probiyotik olarak kabul edilmektedir (Biloo ve diğ. 2006).

- Biyolojik Aktiviteler

Seçilecek suşun, sağlığa faydalı etkiler gösterebilmesi için belirli biyolojik aktivitelere sahip olması gerekir. Örneğin: Antimikrobiyal Aktivite: *L. plantarum*, zararlı bakterilere karşı inhibitör maddeler üretebilir, bu da bağırsak sağlığını destekler

(Arena ve diğ. 2016). Bağışıklık Modülasyonu: *B. longum*, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine yardımcı olabilir ve iltihabı azaltabilir (Gavzy ve diğ. 2023).

- Suşların Farklılığı

Her probiyotik suş, belirli bir sağlık yararını sağlama potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, farklı suşların kombinasyonları kullanılarak daha geniş sağlık yararları elde edilebilir. Örneğin, *L. rhamnosus* ve *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) kombinasyonu, bağırsak sağlığını ve bağışıklık fonksiyonunu desteklemek için birlikte kullanılabilir (Sagar ve diğ. 2014).

Probiyotik gıdaların üretimi, FDA ve DSÖ tarafından belirlenen standartlara ve kriterlere uygun olarak gerçekleştirilmelidir (Şekil 2. 13). ABD Gıda ve İlaç Dairesi, probiyotiklerin "genel olarak güvenli olarak kabul edilen" (GRAS) statüsünü sağlamak için gıda ve takviyelerde kullanılan mikroorganizmaların güvenliğini denetlerken, DSÖ ise bu mikroorganizmaların sağlık yararlarını ve mikrobiyal stabilitesini belirleyecek kriterler ortaya koymaktadır (Arora ve Baldi, 2015). Bu kriterler arasında, probiyotik suşlarının güvenliği, etkinliği, mikrobiyal stabilite, sağlık faydalarının kanıtlanması ve etiketleme gereksinimleri yer alır (Hill ve diğ. 2014; Sanders ve diğ. 2019). Bu düzenlemeler, tüketicilere probiyotik ürünlerin güvenli ve etkili bir şekilde sunulmasını sağlamak amacıyla oluşturulmuştur (Spacova ve diğ. 2023).



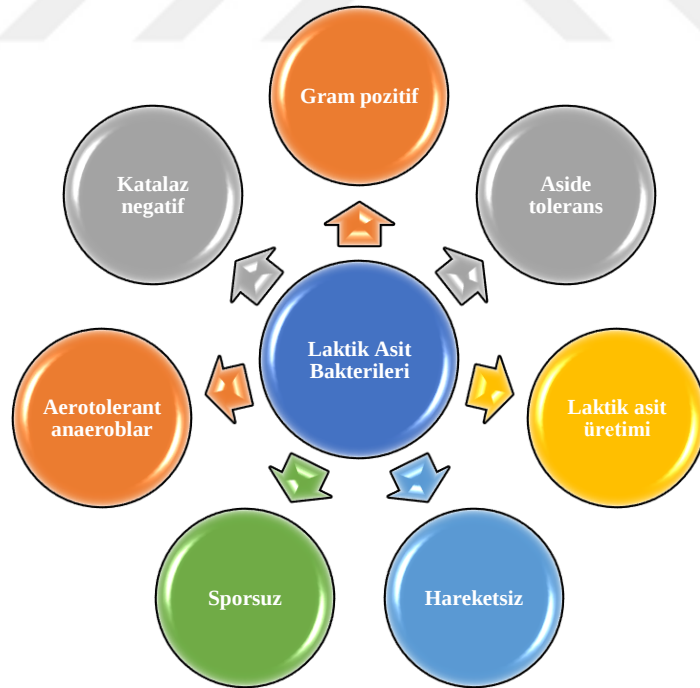
Şekil 2. 13. Probiyotik gıdaların üretiminde FDA ve WHO'nun belirlediği kriterler

2.7. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, karbonhidratları, özellikle de şekerleri fermantasyon yoluyla laktik aside dönüştüren bir grup Gram pozitif bakterilerdir. (Axelsson, 2004; Seddik ve diğ. 2017). Bu bakteriler, GİS'in ihtiyaç duyduğu mikroorganizmalar olduğundan güvenli kabul edilirler. Ayrıca, gıdaların korunmasında kritik bir rol oynarlar. Gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmaları; laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, diasetil ve karbondioksit üreterek inhibe ederler (Gänzle, 2015; Kumari ve diğ. 2016). Laktik asit bakterileri, insan ve hayvanların GİS'te mide asidinin ve safra tuzlarının bulunduğu ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda, lizozim enzimine karşı da direnç gösterdikleri bulunmuştur. Ancak, laktik asit bakterilerinin suşları arasında direnç seviyeleri farklılık göstermektedir (Ceyhan ve Alıç, 2012).

2.7.1. Laktik Asit Bakterilerinin Karakteristik Özellikleri

Laktik asit bakterileri, çeşitli gıda fermentasyon süreçlerinde önemli bir rol oynarlar ve bazı karakteristik özelliklere sahiptir (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14. Laktik asit bakterilerinin karakteristik özellikleri

- **Gram-Pozitif**

Laktik asit bakterileri Gram pozitif olup, hücre duvarlarında Gram boyama sırasında kristal viyole boyasını tutmalarını sağlayan kalın bir peptidoglikan tabakası ile karakterize edilir. Bu özellik, onları daha ince bir peptidoglikan tabakasına ve ek bir dış zara sahip olan Gram negatif bakterilerden ayırır (Beveridge, 2001).

- **Spor oluşturmeyen ve hareketli olmayan**

Bazı bakterilerin aksine LAB, uygun olmayan koşullarda hayatta kalmak için spor oluşturmazlar. Flagella veya hareket için diğer mekanizmalardan yoksundur (Schleifer, 2009).

- **Aerotolerant Anaeroblar**

Laktik asit bakterileri oksijen varlığını tolere edebilirler ancak öncelikle anaerobik ortamlarda gelişirler. Enerji üretiminde fermantasyona bağımlı olmaları, laktik asit bakterilerini fakültatif anaerob organizmalar olarak sınıflandırılmasına neden olur (Atlas, 1995).

- **Laktik Asit Üretimi**

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat fermantasyonu sonucunda başlıca laktik asit üretirler. Bu laktik asit, ortamın pH'ını düşürerek zararlı mikroorganizmaların gelişimini engeller ve böylece gıdaların korunmasına katkıda bulunur (Kleerebezem ve diğ. 2010).

- **Katalaz-negatiftir**

Hidrojen peroksiti, su ve oksijene parçalayan katalaz enzimine sahip olmayan LAB katalaz negatiflerdir. (Axelsson ve diğ. 2004).

- **Asit Toleransı**

Laktik asit bakterileri, yüksek asidik ortamlara karşı oldukça dirençlidir. Bu asit toleransı, fermantasyon sürecinde asitlik arttıkça hayatta kalmalarını ve baskın hale gelmelerini sağlar (Corsetti ve diğ. 2007).

2.7.2. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri, fermantasyon yollarına göre Homofermentatif ve Heterofermentatif olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bu bakterilerin

sınıflandırılması, gıda teknolojisi ve mikrobiyolojide önemli bir yer tutar (Von Wright ve Axelsson, 2019).

- Homofermentatif Laktik Asit Bakterileri

Bu bakteriler, öncelikle glikozu laktik aside dönüştürür ve son ürünün yaklaşık %90'ı laktik asittir. Bu süreç, glikoliz yoluyla başlar ve ardından pirüvat, laktik aside dönüştürülür. Homofermentatif LAB, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi cinslerden türleri içerir. Bu gruptaki bakteriler, yoğurt, peynir ve fermente süt ürünleri gibi birçok gıda ürününün üretiminde önemli bir rol oynar (Zheng ve diğ. 2020).

- Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri

Bu gruptaki bakteriler, glikozu laktik asidin yanı sıra etanol, karbondioksit ve asetik asit gibi diğer yan ürünlere dönüştürür. Heterolaktik fermantasyon, *Leuconostoc* ve bazı *Lactobacillus* türleri gibi cinsler için tipiktir. Heterofermentatif LAB, özellikle ekşi hamur ekmekleri ve bazı meyve suları gibi ürünlerin fermente edilmesinde önemlidir (Gänzle, 2015).

2.7.3. Laktik Asit Bakterilerinin Yaygın Cinsleri

Çeşitli fermantasyon süreçlerinde kullanılan LAB'lar farklı cinslere sahiptirler. Bu cinsler fermente gıdaların lezzetini, dokusunu ve korunmasını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Papadimitriou ve diğ. 2016). Yalnızca gıda fermantasyonunda değil LAB'lar aynı zamanda insan GİS mikrobiyotasında da önemli rollere sahiptirler. Bu bakteriler, gıdaların fermente edilmesi, probiyotik özellikleri ve sindirim sisteminde sağlıklı bir mikrobiyota dengesi sağlamaları ile bilinirler (Hill ve diğ. 2014). Aşağıda hem gıdalarda hem de GİS'te önemli olan yaygın LAB cinsleri (Şekil 2. 15) ve bunların rollerine dair bilgiler yer almaktadır:

- *Lactobacillus*: Süt ürünleri, sebze ve içecek fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan en büyük ve en çeşitli LAB cinsidir (Zheng ve diğ. 2020). *Lactobacillus* türleri hem gıdalarda hem de insan sağlığına yararlı probiyotik özellikleri nedeniyle GİS'te önemli rolleri bulunmaktadır.



Şekil 2. 15. En yaygın olarak bilinen LAB cinsleri

- *Lactococcus*: Bu cins, süt ürünleri fermentasyonunda, özellikle peynir ve ayran üretiminde önemli bir role sahiptir. *L. lactis*, süt proteinlerini laktik aside dönüştürerek ürünlerin dokusunu ve lezzetini geliştirir (O'Connell ve diğ. 2022; O'Sullivan ve O'Connor, 2020).
- *Leuconostoc*: Sebze fermentasyonlarında (örneğin, lahana turşusu) ve ekşi mayalı ekmek üretiminde yaygın olarak kullanılan bir cinstir. Karbondioksit üretimi sayesinde hamurun kabarmasına yardımcı olur ve ürünlere karakteristik lezzet verir (Hammes ve Hertel, 2009; Suzzi ve Corsetti, 2020).
- *Streptococcus*: *Streptococcus thermophilus* gibi türler, özellikle yoğurt ve peynir üretiminde önemli bir rol oynar. Bu tür, laktik asit üretimi yoluyla süt proteinlerini fermente ederek bu ürünlerin dokusunu ve lezzetini geliştirmektedir (Axelsson, 2004; Alexandraki ve diğ. 2019).
- *Pediococcus*: Bu türler sebzelerin, etlerin ve alkollü içeceklerin (bira gibi) fermentasyonunda kullanılmaktadır. Bu bakteriler, gıdaların korunmasına ve lezzet gelişimine katkıda bulunur (Di Cagno ve diğ. 2019).

2.8. *Lactobacillus* Cinsi

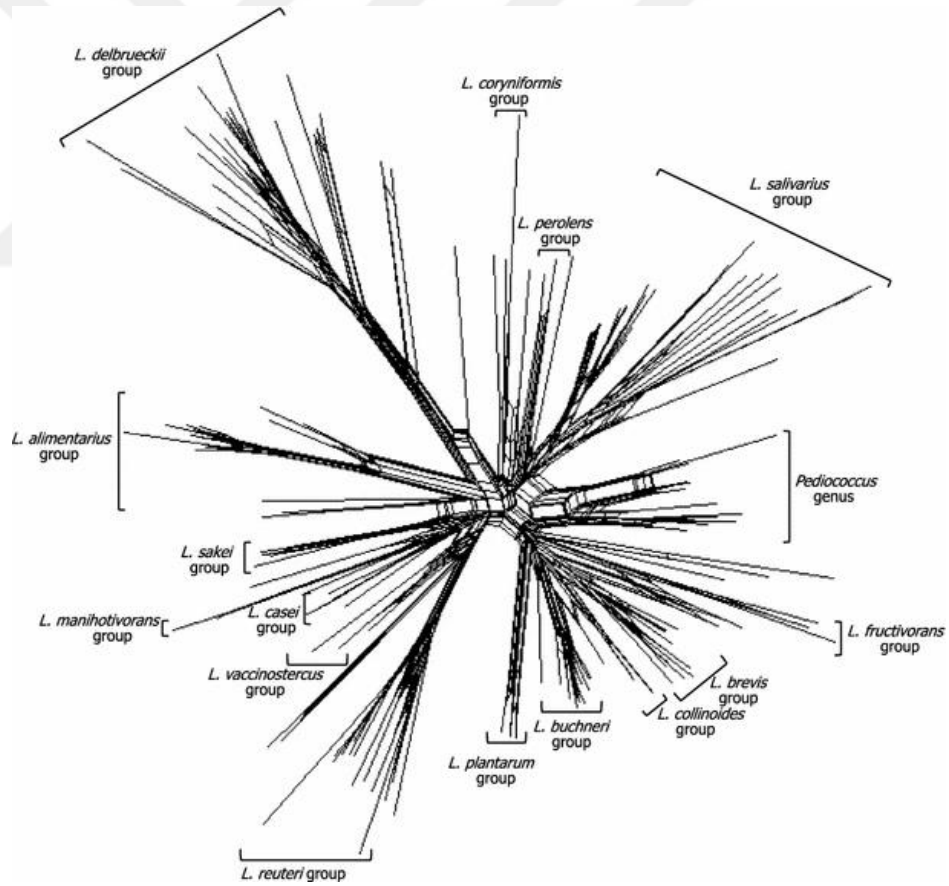
Lactobacillus cinsine ait türler hem gıda mikrobiyolojisinde hem de insan beslenmesinde anahtar taksonlardır. Birçok *Lactobacillus* türü, başlangıç kültürleri ve gıda koruyucuları olarak kullanılmakta olup fermente gıda üretiminde önemli rolleri bulunmaktadır. Ayrıca, insan kaynaklı suşlar probiyotik olarak ve hatta potansiyel aşı taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır (Holzapfel ve Wood, 2014). Bu cins, özellikle karbonhidrat fermantasyonunun “Glikoliz” yan ürünü olarak laktik asit üretmesiyle bilinen Gram pozitif, katalaz-negatif bir bakteri grubu olan LAB’lar arasında GRAS olarak sınıflandırılan birkaç tür içerir (Zheng ve diğ. 2020).

Lactobacillus cinsinin üyeleri spor oluşturmayan, katalaz negatif (bazıları psödokatalaz üretmesine rağmen), zorunlu olarak fermentatif çubuklar veya kokobasillerdir. Genomlarında tipik olarak düşük guanin ve sitozin (GC) içeriğine sahiptirler, ancak bazı türler %59,2 mol'e kadar ulaşabilmektedir (Duar ve diğ. 2017). Bu bakteriler fermentatif bir metabolizmaya sahiptirler, ancak son moleküler araştırmalar daha önceki çalışmalardan daha karmaşık bir metabolik çeşitlilik olduğunu göstermektedir (Zheng ve diğ. 2020). Özellikle laktik asidin yanı sıra, diğer yan ürünler olan asetat, etanol, CO₂, format ve süksinat üretimini yaparlar (Makarova ve diğ. 2016).

Lactobacillus türleri asidik koşullarda gelişirler, genellikle aerotoleranslı veya anaerobiktirler (Duar ve diğ. 2017). Optimum büyüme koşulları 2-53°C arasında değişir ve pH aralığı 3-8 olarak değişim gösterebilmektedir. Bu türlerde tipik olarak, en iyi büyüme 30-40°C arasında ve 5,5-6,2 pH değerinde gerçekleştiği bilinmektedir (Zheng ve diğ. 2020). Optimum büyüme için amino asitler, peptitler, vitaminler, tuzlar ve yağ asitleri gerektiren karmaşık bir beslenme ihtiyaçlarına sahiptirler. Süt ürünleri, tahıllar, etler, meyveler ve salamura sebzeler gibi karbonhidrat substratları bakımından zengin ortamlarda yaşarlar. Ayrıca, insanda ağız, GİS ve genitoüriner sistemde bulunmasının yanı sıra hayvanlarda da doğal floranın bir parçası olarak bulunabilmektedirler (Holzapfel ve Wood, 2014).

Lactobacillus taksonomisi geleneksel olarak karbonhidrat fermantasyon modelleri, çeşitli sıcaklıklarda ve/veya tuz konsantrasyonlarında büyüme gibi fenotipik özelliklere göre yapıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, 16S rRNA

dizilemesine dayanan filogenetik çalışmalar, cins hakkındaki anlayışımızı önemli ölçüde geliştirmiştir. Bu çalışmalar, laktobasillerin birden fazla filogenetik gruba ayrılabilceğini ortaya koyarak, yalnızca metabolik özelliklere dayanan önceki sınıflandırmalara geride bırakmıştır (Şekil 2.16) (Zheng ve diğ. 2020; Holzapfel ve Wood, 2014; Wittouck ve diğ. 2019). Genomik analizler üzerine yapılan bu gelişmeler, türlerin evrimsel ilişkileri hakkında bizlere daha fazla bilgi sunarak metabolik yeteneklerinin, probiyotik potansiyellerinin ve niş adaptasyonlarının daha iyi anlamamıza katkı sağlamaktadır (Duar ve diğ. 2017; Zheng ve diğ. 2020; O’Sullivan ve O’Connor, 2020). Bu modern taksonomik yaklaşım, *Lactobacillus* türlerinin daha doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlayarak, bu bakterilerin gıda ve tıp alanlarındaki potansiyel kullanımlarını destekleyen önemli bilimsel çalışmalara temel oluşturacağı öngörülmektedir.



Şekil 2. 16. *Lactobacillus* cinsinin 16S rRNA gen dizilerinin bölünmüş ayrışma analizi

2.8.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, yoğurt üretiminde sıklıkla kullanılan Gram pozitif, çubuk biçimli ve hareketsiz bir bakteridir. Yaklaşık 0,5-0,8 µm genişliğinde ve 2-9 µm uzunluğunda olup, genellikle tek başına veya zincirler oluşturarak bulunur (Şekil 2. 17). Homofermentatif bir mikroorganizma olarak fermantasyon sürecinde esas olarak laktik asit üretmekte olup, bu özellik yoğurdun karakteristik ekşiliğini ve korunmasını sağlamaktadır (Bonczar ve diğ. 2002; Yılmaz ve Temiz, 2003; Apostolidis ve diğ. 2007). Ayrıca homofermentatif olması sebebiyle ortamının pH'ını düşüren *L. bulgaricus*' un patojenik mikroorganizmaların gelişimini engellediği birçok araştırmada gösterilmektedir (Gemechu, 2015; Yerlikaya ve diğ. 2020). Zorunlu heterofermentatif bakterilerin gıda bozulmasına yol açan karbon dioksit ve etanol üretmesi nedeniyle, homofermentatif bakterilerin daha stabil ürünler sağlamada önemli bir avantaj sunduğu görülmektedir (Gänzle, 2015).



Şekil 2. 17. *Lactobacillus bulgaricus*' un (×30.000) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Ooi ve Liong, 2010)

Homofermentatif grup içinde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un yanı sıra, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. delbrueckii* subsp. *indicus* gibi diğer alt türlerle yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. *L. bulgaricus* ve *L. lactis* yaklaşık %80 oranında DNA benzerliği göstermekte olup, bu benzerlik iki alt tür arasında ortak bir evrimsel kökenin yanı sıra işlevsel benzerliklere işaret etmektedir (Erkuş, 2014). Özellikle, *L. bulgaricus* ve *L. indicus* laktoz, glukoz ve fruktoz gibi şekerleri metabolize edebilirken, *L. lactis* galaktoz ve sukroz gibi daha geniş bir karbonhidrat yelpazesini kullanabilmektedir (Cui, Y ve Qu 2021; Abdel-Shafi ve diğ.

2014). Bakterinin laktoz, glukoz ve fruktozu fermente edebilmesi, onu fermente süt ürünleri için önemli ve çok yönlü hale getirmektedir. Optimal büyüme pH'ı 5,2-5,5 olan *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*' a kıyasla daha yüksek proteolitik aktivite göstererek, yoğurdun lezzet gelişimini ve proteinlerin amino asitlere ayrılmasını desteklemektedir (Lee ve Lucey, 2010; Farag ve diğ.2020). Dragsted ve diğ. (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *L. delbrueckii* türlerinin farklı şekerleri fermente edebilme yetenekleri sayesinde, yoğurt gibi fermente ürünlerde lezzet profili ve besin değerinin artırılabilceği sonucuna varılmıştır.

Son yıllarda *L. bulgaricus*' un sağlık üzerindeki olumlu etkileri üzerine yapılan çok sayıda araştırma, bu bakterinin probiyotik olarak kullanımının sağladığı yararları kapsamlı bir şekilde incelemektedir (Şanlıer ve diğ. 2019; Chavdarov ve diğ. 2024; Oyeniran ve diğ. 2020). Yoğurt ve fermente süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bu bakteri, sindirim sağlığını destekleyici ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkileriyle öne çıkmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarına aşağıda yer verilmektedir;

- **Zoovit Probiyotiği ve Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkisi:** Chavdarov ve Ivanov (2024) tarafından yürütülen bir çalışma, *L. bulgaricus*' un probiyotik bir karışımda kullanımının hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini değerlendirmiştir. Araştırma sonuçları, bu bakterinin sindirim sistemi mikrobiyotasını iyileştirerek sağlık üzerinde koruyucu bir etki sağladığını göstermektedir (Chavdarov ve Ivanov, 2024).
- **Glutamin İlavesinin Fermentasyon Sürecindeki Rolü:** De Luca ve diğ. (2024) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, laktik asit bakterileri ile yapılan fermentasyon sırasında glutamin ilavesinin sağlık açısından faydalı bileşiklerin (örneğin butirik asit) oluşumuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sürecin, laktik asit üretimini optimize ederek sağlığa olumlu katkılarda bulunduğu belirtilmektedir (De Luca ve diğ. 2024).
- **Bitkisel Jel Polimerlerinin Oksidatif Toleransa Etkisi:** Özcan ve diğ. (2024) tarafından yapılan araştırmalar, *L. bulgaricus* ile fermente edilen diyet yoğurtlarda bitkisel jel polimerlerinin oksidatif strese karşı dayanıklılığı artırdığını ve probiyotik özelliklerin geliştirilmesine katkı sağladığını ortaya

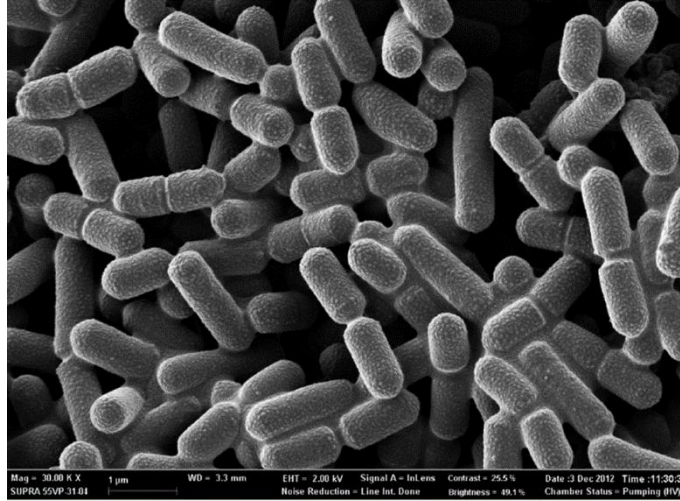
koymaktadır. Bu bulgular, oksidatif strese karşı direncin artırılmasında önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Özcan ve diğ. 2024).

- **Probiyotik Exopolysakkarit Üretimi ve Sağlık Üzerine Etkileri:** Carrero-Puentes ve diğ. (2022) araştırmasında, *L. bulgaricus*'un EPS üreterek fermente edilen peynir altı suyunun sindirim sağlığını desteklediği ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkiler sağladığı vurgulanmaktadır. Bu bakterinin, bağışıklık ve sindirim sistemleri üzerindeki olumlu etkilerinin bu yollarla desteklenebileceği ifade edilmektedir (Carrero-Puentes ve diğ. 2022).

Yapılan bu çalışmalar, *L. bulgaricus*'un probiyotik özelliklerinin sağlık üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak ve optimize etmek adına önemli bilgiler sunmaktadır. Gelecekte, bu alandaki araştırmaların, daha fazla sağlık yararı sağlamak için metabolik yolları ve farklı fermentasyon tekniklerini keşfetmeye odaklanması beklenmektedir.

2.8.2. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (*L. paracasei*) hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda gelişen Gram pozitif, fakültatif heterofermentatif bir bakteri olarak tanımlanmaktadır. Bu tür, hareketsiz olup spor oluşturmaz ve hücreleri yaklaşık $0.7-1.1 \times 2.0-4.0 \mu\text{m}$ boyutlarındadır (Şekil 2.18). Çevresel stres faktörlerine karşı (asidik ve safra tuzları gibi) dayanıklı olmasına katkıda bulunan sağlam bir hücre duvarı yapısına sahip olduğu görülmektedir (Kasilingam ve diğ. 2023). Diğer laktik asit bakterilerine benzer şekilde, GİS' in asidik koşullarında hayatta kalmasını sağlayan önemli bir özellik olan asit direnci sergilemektedir.



Şekil 2. 18. *Lactobacillus paracasei* MK1'in ($\times 30.000$) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Lee ve diğerleri, 2013)

Bu bakteri, laktik asidi 6-fosfoglukonat yolu ve fosfoketolaz aracılığıyla pentozlardan ve Embden-Meyerhof yolu aracılığıyla heksoz şekerlerden sentezlemektedir (Yun ve Ryu, 2001). Ayrıca, araştırmalar, *L. paracasei*'nin çeşitli karbonhidratları fermente etmek için alternatif metabolik yollar kullanabileceğini ve böylece yalnızca laktik asit değil, aynı zamanda asetik asit ve etanol gibi diğer faydalı metabolitleri de üretebileceğini göstermektedir (Stefanovic, 2017). Bu yan ürünler, patojenik bakterilerin inhibe edilmesinde ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun modüle edilmesinde önemli bir rol oynamakta, bu da *L. paracasei*'nin fermente gıdalardaki ve insan bağırsağındaki ekolojik önemini vurgulamaktadır.

Son çalışmalar, *L. paracasei*'nin metabolik esnekliğinin farklı fermantasyon koşullarına uyum sağlamasına olanak tanıdığını ve bu sayede özellikle süt ürünlerinde olmak üzere çeşitli gıda uygulamaları için uygun olduğunu göstermektedir (Jena ve Choudhury, 2023). Bu uyarlanabilirlik, bağırsak sağlığını destekleyebilen ve fermente gıdaların duyuşal özelliklerini geliştirebilen bir probiyotik olarak *L. paracasei*'nin önemini arttırmaktadır.

Lactobacillus paracasei'nin antimikrobiyal, antidiyaretik ve antimutajenik etkileri, bu bakterinin sağlık üzerindeki faydalarının yanı sıra potansiyel kullanım alanlarının araştırılması açısından önem taşımaktadır. Çeşitli çalışmalar, kolesterol seviyelerini düşürme, bağışıklık fonksiyonunu geliştirme ve kan şekeri seviyelerini düzenleme potansiyelini ortaya koymaktadır (Minj ve diğ. 2021; Tarrah ve diğ. 2021).

Lactobacillus paracasei'nin, patojen mikroorganizmalarla rekabet ederek bağırsak sağlığında önemli bir rol oynadığı gözlemlenmektedir. Bu etkileşimler, dengeli bir bağırsak mikrobiyotasının korunmasına katkıda bulunarak, genel bağırsak sağlığını desteklemektedir. Son bulgular, *L. paracasei*'nin bakteriyosin (antimikrobiyal peptitler) üretme kapasitesinin, *Salmonella* ve *E. coli* gibi zararlı patojenlere karşı koruyucu etkiler sağladığını ortaya koymaktadır (Acuña ve diğ. 2015). Ayrıca, *L. paracasei*'nin bakteriyosin üretiminin enterotoksijenik *E. coli* suşlarının büyümesini inhibe ettiği gösterilmiş ve bu durumun gıda güvenliği ile halk sağlığı açısından önemli bir katkı sağladığı vurgulanmıştır (Miller ve diğ. 2024).

Ayrıca, son araştırmalar bağırsak mikrobiyotasının *L. paracasei* tarafından modülasyonunun kilo yönetimi ve GİS dahil olmak üzere metabolik sağlığın iyileştirilmesine katkıda bulunabileceğini ve böylece çok yönlü faydalarını vurguladığını göstermektedir (Wang ve diğ. 2021; O'Mahony ve diğ. 2023). Özellikle, bir çalışma *L. paracasei* takviyesinin C-reaktif protein (CRP) ve interlökin-6 (IL-6) gibi inflamasyon belirteçlerinde önemli bir azalmaya yol açtığını ve bağırsak sağlığını destekleme ve inflamasyonla bağlantılı kronik hastalıkları potansiyel olarak hafifletme rolünü daha da desteklediğini göstermiştir (Benítez-Serrano ve diğ. 2023). Bu anti-enflamatuar etkilerin, metabolik sendrom ve ilgili bozuklukları olan bireyler için faydalı olduğu gözlemlenmiş, bu da *L. paracasei*'nin bu tür durumların yönetiminde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Aggarwal ve diğ. 2024).

Daha da önemlisi, *L. paracasei* yoğurt starter kültürleriyle uyumludur, bu da onu probiyotik yoğurt üretimine değerli bir katkı haline getirmektedir. Bu bakteri, zorlu sindirim koşullarını etkili bir şekilde tolere ederek dikkate değer bir canlılık ve stabilite sergilemekte, bu da tüketildiğinde sağlığa fayda sağlama yeteneğine katkıda bulunmaktadır (Podar ve diğ. 2014). *L. paracasei* içeren probiyotik yoğurtların sadece olumlu duyuşal özellikleri korumakla kalmayıp aynı zamanda ürünün beslenme profilini de geliştirdiği görülmektedir. Bir çalışmada, *L. paracasei*'nin normal yoğurt kültürlerine dahil edilmesinin uçucu bileşiklerin üretiminde minimum değişikliklere yol açtığı bulunmuştur (Tian ve diğ. 2021). Bununla birlikte, daha yeni bir araştırma, asetik ve bütanoik asitler, 2-etil-1-heksanol, asetoin ve 2-butanon gibi önemli uçucu bileşiklerin konsantrasyonlarında önemli değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, duyuşal değerlendirmelerin yanı sıra, *L. paracasei*'nin yoğurt özelliklerini

geliştirme potansiyeline sahip olduğunu ve fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak cazibesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Dimitrellou ve diğ. 2019). Bununla birlikte, genel fermentasyon sürecini ve ürün kalitesini etkileyebilecek olası rekabetçi etkileşimler nedeniyle *L. paracasei*'nin standart yoğurt starter kültürleriyle kombinasyonunu dikkatlice değerlendirmek önem arz etmektedir (Cai ve diğ. 2024). Ayrıca, *L. paracasei*'nin fermentasyon dinamikleri ve metabolik yan ürünleri inkübasyon sıcaklığı ve pH gibi faktörlerden etkilenerek ticari yoğurt formülasyonlarına entegrasyonunu daha da zorlaştırabilir (Bengoa ve diğ. 2018).

Sonuç olarak, *L. paracasei*'nin sağlığı teşvik edici özellikleri ve gıda üretimindeki potansiyel uygulamaları, bu tür üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

2.9. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Son yıllarda *Lactobacillus* cinsi bakteriler, kanserin önlenmesi ve tedavisindeki potansiyel rolleri nedeniyle araştırmalarda önemli bir odak noktası haline gelmiştir. En çok incelenen türler arasında *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. plantarum* bulunmaktadır. Bu probiyotikler; immün modülasyon, bağırsak mikrobiyomunu değiştirme, doğrudan anti-tümör etkileri ve klinik uygulamalarda kanser tedavisi sonuçlarını iyileştirebilmesi gibi çok yönlü etki mekanizmaları açısından araştırılmaktadır (Hirayama ve Rafter 2000; Hwang ve diğ. 2023; Cho ve diğ. 2024).

2.9.1. İmmün Modülasyon

Lactobacillus türlerinin kanser tedavisindeki en önemli etkilerinden biri immün modülasyondur. Bu türler, makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinin aktivitesini teşvik ederek bağışıklık tepkisini güçlendirebilmektedir (Fong ve diğ. 2023).

- **Sitokin Üretimi**

Lactobacillus'lar, T hücresi aktivasyonu ve tümörlere karşı etkili bir bağışıklık tepkisinin oluşumu için kritik olan interleukin-12 (IL-12) ve interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinlerin üretimini desteklebilmektedirler. Yapılan bir çalışmada, *L. rhamnosus*'un IL-12 ve IFN- γ sitokinlerinin üretimini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu sitokinler, bağışıklık sisteminin aktivasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Artan IL-12 ve IFN-

γ seviyeleri, bağışıklık gözetimini güçlendirerek vücudun kanser hücrelerine karşı daha etkili bir hedef alıcı yanıt oluşturmaya yardımcı olmaktadır. Böylece, *L. rhamnosus*'un, kanserle mücadelede potansiyel bir yardımcı terapötik ajan olarak önem taşıdığı anlaşılmaktadır (Banna ve diğ. 2017).

- **Toll Benzeri Reseptör (TLR) Aktivasyonu**

Lactobacillus cinsi bakteriler, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli rol oynayan TLR'leri aktive edebilmektedirler. Bu aktivasyon, antijen sunan hücreler üzerindeki ko-stimülatör moleküllerin artırılması ile sonuçlanmaktadır. Bu moleküllerin artırılması T hücresi aktivasyonunu güçlendirerek ve daha etkili bir adaptif bağışıklık oluşumunu desteklemektedir (Kim ve diğ. 2020).

- **Düzenleyici T (Treg) Hücrelerinin İnhibisyonu**

Düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), anti-tümör immün yanıtları baskılayabilmektedir. Bazı araştırmalar, *Lactobacillus*'un düzenleyici T hücrelerinin (Treg) genişlemesini engelleyerek daha etkili bir anti-tümör bağışıklık tepkisinin ortaya çıkmasına olanak tanıyabileceğini göstermiştir (Banna ve diğ. 2017; Hussain ve diğ. 2024).

2.9.2. Bağırsak Mikrobiyomu Değişikliği

Bağırsak mikrobiyomu, kanser gelişimini ve tedavi sonuçlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Disbiyoz ya da bağırsak mikrobiyal topluluklarındaki dengesizlik, artan inflamasyon ve kanser riski ile ilişkilendirilmektedir. *Lactobacillus* türleri, bağışıklık fonksiyonunu korumak ve inflamasyonla ilişkili kanserlerin önlenmesine yardımcı olmak için sağlıklı bir mikrobiyomun yeniden kazanılmasına destek olmaktadır (Hussain ve diğ. 2024).

- **Mikrobiyota Kompozisyonu**

Lactobacillus'lar, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini değiştirerek yararlı bakterilerin çeşitliliğini ve bolluğunu artırabilmektedirler. Böylece bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirip sistemik inflamasyonu azaltarak kanserin önlenmesinde kritik bir rol oynamaktadırlar (Fong ve diğ. 2020).

- **Bağıışıklık Tedavisi Üzerindeki Etkisi**

Lactobacillus cinsi bakteriler ile zenginleştirilmiş sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomu, bağıışıklık kontrol noktası inhibitörleri gibi immünoterapilerin etkisini güçlendirebilmektedir. Yapılan araştırmalar, dengeli bir bağırsak mikrobiyotasına sahip hastaların, daha güçlü bağıışıklık tepkileri sayesinde immünoterapide daha başarılı tedavi sonuçları elde edildiğini ortaya koymaktadır (Hussain ve diğ. 2024; Fong ve diğ. 2022; Chen ve diğ. 2024).

- **Metabolit Üretimi**

Lactobacillus türleri, diyet liflerini fermente ederek SCFA' lar üretirler. Bütirat gibi SCFA' lar, anti-inflamatuardırlar ve bağırsak sağlığını desteklemektedirler. Bu metabolitler, bağıışıklık hücresi fonksiyonunu etkileyerek anti-tümör bağıışıklığına katkı sağlayabilmektedir (Hussain ve diğ. 2024).

2.9.3. Doğrudan Anti-Tümör Etkileri

Bağıışıklık sistemini düzenleyici özelliklerine ek olarak, bazı *Lactobacillus* cinsi bakteriler doğrudan anti-tümör etkiler sergileyebilmektedir. Araştırmalar, bu bakterilerin tümör büyümesini engelleyen biyoaktif bileşikler ve metabolitler üretebildiğini ortaya koymaktadır (Lath ve diğ. 2023; Chrysostomou ve diğ. 2023; Hussain ve diğ. 2024).

- **Biyoaktif Bileşikler**

Bazı *Lactobacillus* cinsi bakteriler, kanser hücrelerinin büyümesini seçici olarak inhibe edebilen antimikrobiyal peptitler olan bakteriyosinler üretmektedir. Örneğin, *L. plantarum*'un çeşitli kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkiler gösteren bakteriyosinler ürettiği belirlenmiştir (Niamah ve diğ. 2024; Sabri ve diğ. 2024; Chen ve diğ. 2024).

- **Apoptoz İndüksiyonu**

Lactobacillus'lar, kanser hücrelerinde apoptozu veya programlanmış hücre ölümünü uyarabilirler. Çalışmalar, belirli *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen metabolitlerin tümör hücrelerinde apoptotik yolları aktive ederek hücre proliferasyonunun azalmasına ve hücre ölümünün artmasına neden olabileceğini göstermektedir (Choi ve diğ. 2006; Pourali ve diğ. 2023; Hossain ve diğ. 2024).

- **pH Modülasyonu**

Lactobacillus cinsi bakteriler, laktik asit üreterek tümör mikroçevresinin pH'ını düşmesine sebep olabilmektedirler. Böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunun azalmasına katkı sağlayabilirler. Daha asidik bir ortam, tümör hücrelerine karşı toksisiteyi artırarak bazı kemoterapötik ajanların etkisini güçlendirmektedir (Zhou ve diğ. 2022).

2.9.4. Klinik Uygulamalar

Lactobacillus cinsi probiyotiklerin kanser tedavisine dahil edilmesi, aktif bir araştırma alanı oluşturmıştır. Çoğu çalışma preklinik aşamada devam ederken, bazı klinik denemeler, standart kanser tedavilerine ek olarak bu probiyotiklerin güvenilirliğini ve etkisini incelemeye başlamıştır. Son araştırmalar, *Lactobacillus* cinsi probiyotik takviyelerinin kemoterapi tedavisi gören hastalarda yan etkiyi azaltma ve yaşam kalitesini artırma potansiyelini göstermektedir (Frankel ve diğ. 2019; Hussain ve diğ. 2024; Ghadiri ve diğ. 2024). Ayrıca kullanılan bu probiyotiklerin, bağışıklık sistemini güçlendirerek tedavi yanıtlarını iyileştirebileceği üzerine yapılan çalışmalar da dikkat çekmektedir (Sugimura ve diğ. 2022; Peng ve diğ. 2024).

- **Yaşam Kalitesinde İyileşme**

Klinik çalışmalar, *Lactobacillus* takviyesinin tedaviye bağlı yan etkileri azaltarak kanser hastalarının yaşam kalitesini artırabileceğini göstermektedir. Örneğin, kemoterapi tedavisi gören meme kanseri hastalarını kapsayan bir çalışmada, *Lactobacillus* cinsi probiyotik alan hastaların, kontrol grubuna göre belirgin şekilde daha az mide bulantısı ve kusma sorunu yaşadıkları belirtilmiştir (Takada ve diğ. 2022; Hossain ve diğ. 2024)

- **Destekleyici Tedavi**

Lactobacillus cinsi probiyotiklerin, kemoterapi sonrası bozulabilen bağırsak mikrobiyotasının iyileşmesine yardımcı olduğu belirtilmektedir. Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomunu korumak, enfeksiyon riskini azaltmak ve kanser hastalarının genel sağlığını iyileştirmek açısından kritik bir öneme sahiptir (Takada ve diğ. 2022; Fong ve diğ. 2022; López-Gómez ve diğ. 2023)

Lactobacillus cinsi probiyotik bakteriler, immün modülasyon, bağırsak mikrobiyomu değişikliği ve doğrudan anti-tümör etkileri gibi çok yönlü rolleriyle kanser tedavisinde umut verici bir seçenek sunmaktadır. Bu probiyotiklerin mekanizmalarını anlamak ve onkolojide güvenli kullanımlarını sağlamak için araştırmaların sürdürülmesi önemlidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu tez çalışması “Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”nun 2021.289.12.12 protokol numarası alınarak (EK 1) Hematoloji Ar-Ge, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Tıbbi Biyoloji Araştırma Laboratuvarları’nda gerçekleştirildi. Ayrıca bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TNKÜBAP) tarafından NKUBAP.02.DR.22.438 proje numarası ile desteklendi. Çalışma süresince kullanılan cihaz, sarf ve diğer malzemelerin markaları, katalog numaraları, ülkeleri Tablo 3. 1 ve Tablo 3. 2’ de verildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve ülkeleri

Cihaz	Marka	Ülke
Biyogüvenlik Kabini	Biobase	Almanya
İnvert Mikroskop	Olympus CKX53	Japonya
CO ₂ ' li İnkübatör	Heal Force/HF90 Smart cell	Çin
Santrifüj	Eppendorf centrifuge 5810R	Almanya
Derin Dondurucu Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Arçelik	Türkiye
Işık Mikroskobu	Olympus CX21	Japonya
Azot Tankı	Awtech scientific	Kanada
Su Banyosu	Nuve	Türkiye
Mikrodalga Fırın	Arçelik MD 574	Türkiye
Homojenizatör	IKA T10 Ultra-Turrax	Almanya
Hassas Analitik Terazî	Denver Instrument	ABD
Vorteks	Isolab	Almanya
Soğutmalı Santrifüj Micro 200R	Hettich Mikro 200R	Almanya
Çoklu Pipet	Eppendorf	Almanya
Farklı Hacimlerde Otomatik Mikro Pipetler (1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl, 2.5µl)	Eppendorf	Almanya
Nano-100 Micro-Spectrophotometer	AllSheng	Çin
Thermal Cycler	BIO-RAD T100	ABD
PH Metre	HANNA instruments	ABD
Gerçek Zamanlı Thermal Cycler	Roche LightCycler 2.0	İsviçre
Soğutucu (-80°C)	Nuve, DF 490	Türkiye
İnkübatör	Nuve	Türkiye
Flow cihazı	Beckman Coulter	İngiltere
Floresan Mikroskop	Leica	Almanya

Tablo 3. 2. Çalışmalarda kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve katalog numaraları

Kullanılan Sarf ve Diğer Malzemeler			
Malzeme	Marka	Katalog No	Şehir-Ülke
96 kuyucuklu plaka	Labselect	11510	Beijing, Çin
10 µl pipet ucu	Labselect	T-001-100	Beijing, Çin
10 µl pipet ucu (Filtreli)	Labselect	FT-10-R-S	Beijing, Çin
200 µl pipet ucu	Labselect	T-001-200	Beijing, Çin
200 µl pipet ucu (Filtreli)	Labselect	FT-200-R-S	Beijing, Çin
100-1000 µl pipet ucu	Sarstedt	1254001	Nümbrecht, Almanya
Serolojik Pipet 5 ml, Steril	Sarstedt	1253001	Nümbrecht, Almanya
Serolojik Pipet 10 ml, Steril	Sarstedt	1254001	Nümbrecht, Almanya
Kriyojenik tüp 2 ml, Steril	Sorfa	111210	Zhejiang, Çin
0,2 ml Flat Cap Tubes (PCR)	ThermoFisher	AB0620	Suwanee, GA, USA
Mikrotüp 1,5 ml, Steril	M. Plastic	MCTB015	Zhejiang, Çin
Mikrotüp 2 ml, Steril	M. Plastic	MCTB020	Zhejiang, Çin
Santrifüj Tüpü 15 ml, Steril	Sarstedt	554502	Nümbrecht, Almanya
Santrifüj Tüpü 50 ml, Steril	Sarstedt	547254	Nümbrecht, Almanya
T75 Hücre Kültür Flaskı, (Filtreli Kapak)	Sarstedt	3911002	Nümbrecht, Almanya
T25 Hücre Kültür Flaskı, (Filtreli Kapak)	Sorfa	210100	Zhejiang, Çin
Flow Tüpü	Lp Italiana	110411	Milano, İtalya
Pastör pipeti 3ml, Steril	Citotest	4320-0512	Jiangsu, P.R. Çin
90 mm Petri			
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Euroclone	ECM0103L	Pero (MI), İtalya
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Gibco	21875-034	Paisley, İngiltere
Dulbecco's phosphate-buffered saline	Euroclone	ECB4004L	Pero (MI), İtalya
MRS Agar	Biolife	4017282	Milano, İtalya
MRS Broth	Biolife	4017292	Milano, İtalya
Fetal Bovine Serum	Pan Biotech	P30-3306	Aidenbach, Almanya
DMSO (Hücre Kültürü)	Neofroxx	1264ML100	Einhausen, Almanya
RNase A	Neofroxx	1263MG050	Einhausen, Almanya
PI	Sigma	P4170-10MG	Saint Louis, Amerika Birleşik Devletleri
AO	Sigma	A6014-10G	Saint Louis, Amerika Birleşik Devletleri
MTT reaktifi	Merck	475989-1GM	Darmstadt, Almanya
OXI stripler	SR	201912022	Dothan, Amerika Birleşik Devletleri

Tablo 3. 2. Çalışmalarda kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve katalog numaraları (devamı)

Gliserol	Neofroxx	56-81-5	Einhausen, Almanya
0.22 µM membran filtre	Isolab	1.094.07.006.050	Eschau, Almanya
L-Glutamine 200 mM	Gibco	25030-024	Paisley, İngiltere
Penisilin-Streptomisin	Gibco	15140-148	New York, Amerika Birleşik Devletleri
%0,05 Tripsin EDTA	ThermoFisher	25200056	Paisley, İngiltere
%0,4 Tripan Blue	Gibco	15250-061	New York, Amerika Birleşik Devletleri
İsopropanol	Merck	1.09634.2511	Darmstadt, Almanya
Etanol	Merck	1.00983.0000	Darmstadt, Almanya
Gram Boyama Seti	RTA	YMG007	Kocaeli, Türkiye
Purelink RNA Mini Kit	ThermoFisher	12183018A	Carlsbad, CA, Amerika Birleşik Devletleri
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher	4368814	Vilnius, Litvanya
Ultrapure Dnase/Rnase-Free Distilled Water	ThermoFisher	10977035	Paisley, İngiltere
Kapiller (20 µl)	LightCycler	04929292001	Mannheim, Almanya
Primerler 50 NMol-Desalted (248 baz)	Sentebiolab	-	Ankara, Türkiye

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Probiyotik Bakterilerin Kültürü

Çalışmada kullanılan probiyotik bakteriler; *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatları TNKÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nden temin edildi. İzolatların 16S rDNA yöntemi ile tanımlanmasında genel bakteriyel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesinin homolojisinden yararlanılmıştır (Tokatlı Demirok ve diğ. 2023). Dizi analiz sonuçları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verildi.

İzolatlar -80°C soğutucudan alındıktan sonra DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS) sıvı besiyerine (Tablo 3.3) ekilerek 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3).

Daha sonra aktifleşen bakteri kültüründen tek koloni elde etmek için MRS agar besiyerine (Tablo 3.3) ekim yapılarak tekrar 37°C’de 24-48 saat inkübe edildi (De Man ve diğ. 1960). İnkübasyon sonrası aktifleştirilen *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının saf kültürleri gözlemlendi (Şekil 3.4).



>NT16S-37F.E02_17032916XN sequence exported from
NT16S□37F.E02_17032916XN.scf

GGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAATCAAAGATCCCTTC
GGGRTGATTT
GTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTA
AAGACTGGGA
TACCACTWGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGA
TTCAAGTTTG
AAAGGCGGCGTAAGCTGTCACCTTTAGGATGAGCCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGGGG
TAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGG
CCACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGAGGAATCT
TCCACAATGGA
CGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAGCTCT
GTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTGACGGTA
ATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGA
AAGCCACGG
CTCAACCGTGGAACCTGCATCGGAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGA
TTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCWGTGGC
GAAGGCGGCT
CTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG
GATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGCGCTAGGTGTTGGGGACTTTCCG
GTCCTCAGTG|
CCGCAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGAGTA

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* strain ND04, complete genome

Sequence ID: CP016393.1Length: 1861754Number of Matches: 9

Related Information

Range 1: 174701 to 175573

Şekil 3. 1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 16S rDNA BLAST analizi
(Tokatlı Demirok ve diğ. 2023)

>NT16S-1F.B01_17032914IC sequence exported from NT16S-1F.B01_17032914IC.scf

GCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTG
CTTGACACCG

AGATTCAACATGGAAYGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCCTTAAG

TGGGGGATAACATTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACC
GCATGGTTC

TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTAT
TAGCTAGTT

GGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACWGAGAGG
TTGATCGGCCA

CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACWCCTACGGGAGGCAGCASTAGGG
AATCTTCCACA

ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC
GGGTCGTAAAA

CTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGG

CGTGACGGTATCCAACCATAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACG

TWGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
GTTTTTTAAG

TCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGYATCGGAAACTGGG
AAACTTGAGT

GCAGAAGAGGAYAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAAGAAC

ACYWGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA
AAGCATGGGTA

GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTA
GGTGTGGA

GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGG
GAGTA

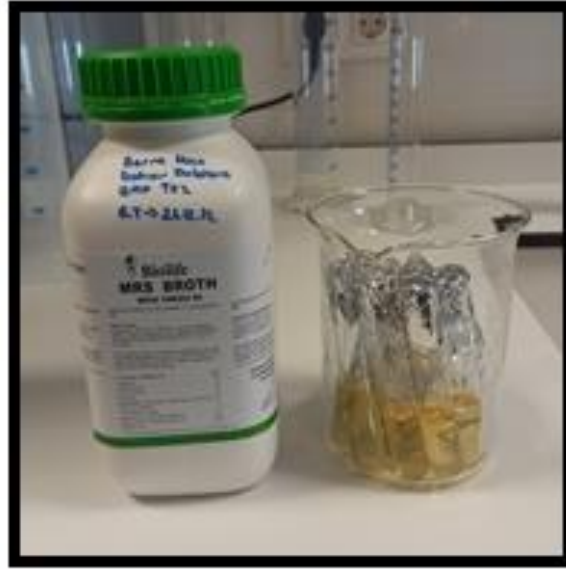
Lactobacillus paracasei strain IIA, complete genome

Sequence ID: CP014985.1Length: 3055892Number of Matches: 5

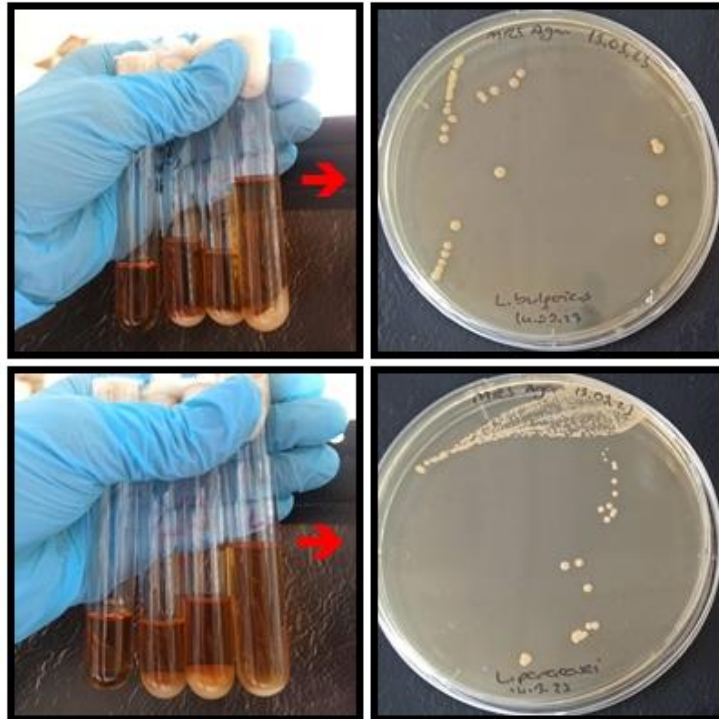
Related Information

Range 1: 1002147 to 1003026

Şekil 3. 2. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 16S rDNA BLAST analizi
(Tokatlı Demirok ve diğ. 2023)



Şekil 3. 3. MRS sıvı besiyerinde probiyotik bakterilerin kültürü



Şekil 3. 4. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının MRS agar ve sıvı besiyerinde saf kültürleri

Tablo 3. 3. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besiyerlerinin içeriği

Besiyeri	de Man Rogosa Sharpe (MRS) Sıvı (Biolife, 4017292)	de Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar (Biolife, 401728S2)
İçerik	Pepton 10 g/L, Et özütü 10 g/L, Maya özütü 5 g/L, D (+) glukoz 20 g/L, Dipotasyum hidrojen fosfat 2 g/L, Sodyum asetat 5 g/L, Amonyum asetat 2 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,5 g/L, Tween 80 ml 1	Kazein pepton 10 g/L, Et özütü 10 g/L, Maya özütü 4 g/L, Glukoz 20 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2 g/L, Sodyum asetat 5 g/L, Tri-amonuyum sitrat 2 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,05 g/L, Agar 15 g/L Tween 80 1,08 g/L
Hazırlanışı	55,2 g besiyeri, 1 litre distile suda çözülür ve ardından 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanır.	67,3 g besiyeri, 1 litre distile suda çözülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Ardından, 45°C'ye kadar soğutulup steril petrilere dökülür.
Kullanım Amacı	LAB'ın stok kültürlerinin hazırlanması ve çalışma öncesi aktive edilmesinde kullanıldı.	LAB'ın saflaştırılmasında ve diğer çalışmalarda kullanıldı.

3.2.2. Probiyotik Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Saf kültürleri elde edilen *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının tanımlanmasında; Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri kullanıldı.

3.2.1.1. Gram Boyama

Diferansiyel bir boyama tekniği olan ve Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş “Gram boyama” yöntemi ile probiyotik bakterilerin Gram reaksiyonu incelendi (Gram 1884). *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının saf

kültürlerinden alınan tek koloniler, lamin üzerine serum fizyolojik (SF) damlatıldıktan sonra yayılarak fıkse edilip, 1 dk kristal viyole ile muamele edildi. Ardından boya akıtılıp distile su (dH₂O) ile yıkandı. Preparat lugol çözeltisinde 1 dk bekletilerek, dH₂O ile yıkandı ve ardından, %95'lik alkol ile 15 saniye (sn) muamele edildi. Son olarak safranin boyası ile 30 sn boyanıp, yıkandıktan sonra kurutulan preparatlar mikroskopta, 100X objektifde immersiyon yağı kullanılarak incelendi (Şekil 3.5). Gram boyama yapılmış mor-mavi renkli olan bakteriler Gram pozitif, pembe renkli olan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi (Bernard ve diğ. 2017).



Şekil 3. 5. Gram boyama yöntemi aşamaları

3.2.1.2. Katalaz Testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti (H₂O₂) parçalayan enzimdir. Hidrojen peroksit bakteriler için zararlıdır. Katalaz enzimi hidrojen peroksidi parçalayarak su ve serbest oksijene ayırır. Katalaz testi bakterilerde katalaz enziminin varlığını belirlemek için yapılır. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarına ait saf kültürlerden alınan kolonilere, lam üzerinde %3'lük H₂O₂ çözeltisinden 2-3 damla ilave edilerek öze ile karıştırıldı. Kolonilerin etrafında “gaz” kabarcıklarının (5-10 sn içerisinde) görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Temiz 2008, Zotta ve diğ. 2014).

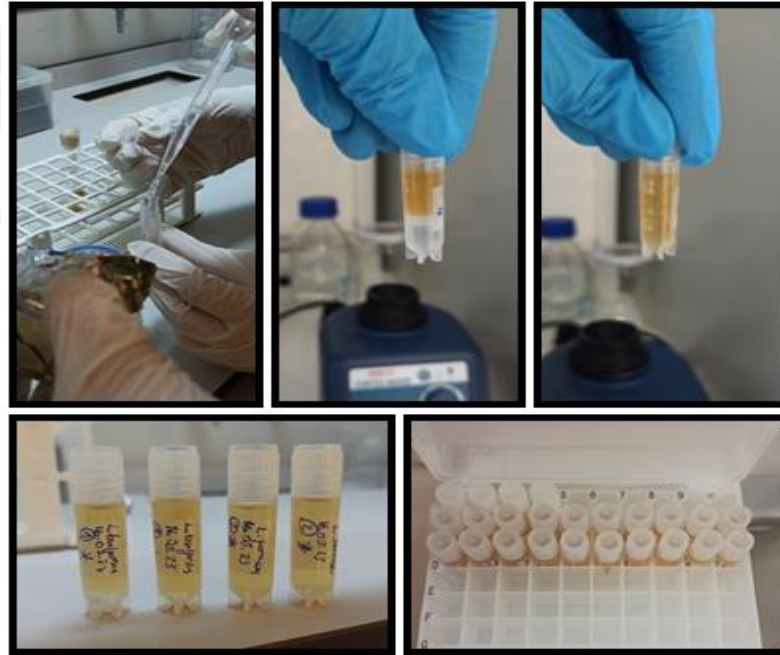
3.2.1.3. Oksidaz Testi

Sitokrom C elektron taşınmasında görev yapan bir enzimdir. Oksidaz testi bu enzimin varlığını belirlemek için yapılır. Bu test için N, Ndimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride içeren özel OXI stripler ile gerçekleştirildi. İzolatların saf

kültürlerinden alınan koloniler, oksidaz test strip üzerine öze ile inoküle edildi. İndikatör kağıdının beyazdan mavi ve/ veya mor renge değişimi oksidaz pozitif, herhangi bir renk oluşumunun gözlenmemesi ise izolatların oksidaz negatif olduklarının kanıtı olarak tanımlanmaktadır (Halkman, 2005, Molska ve Reguła, 2019)

3.2.3. Probiyotik Bakterilerin Stoklanması

Çalışmada kullandığımız *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının kültüre edilmesi sonucunda elde edilen saf kültürlerden stok ayırmak için; 2 ml'lik kriyojenik tüplere %20-30 gliserol olacak şekilde MRS sıvı besiyeri kondu. Sıvı besin ortamında gelişmiş saf kültürden pastör pipeti ile kriyojenik tüplere aktarıldı ve homojen olacak şekilde vortekslendi (Şekil 3.6). Her bir saf kültüre numara verilerek kayıt altına alındı ve kriyojenik tüpler -80°C soğutucuya kaldırıldı (Hoşbul ve diğ. 2020).

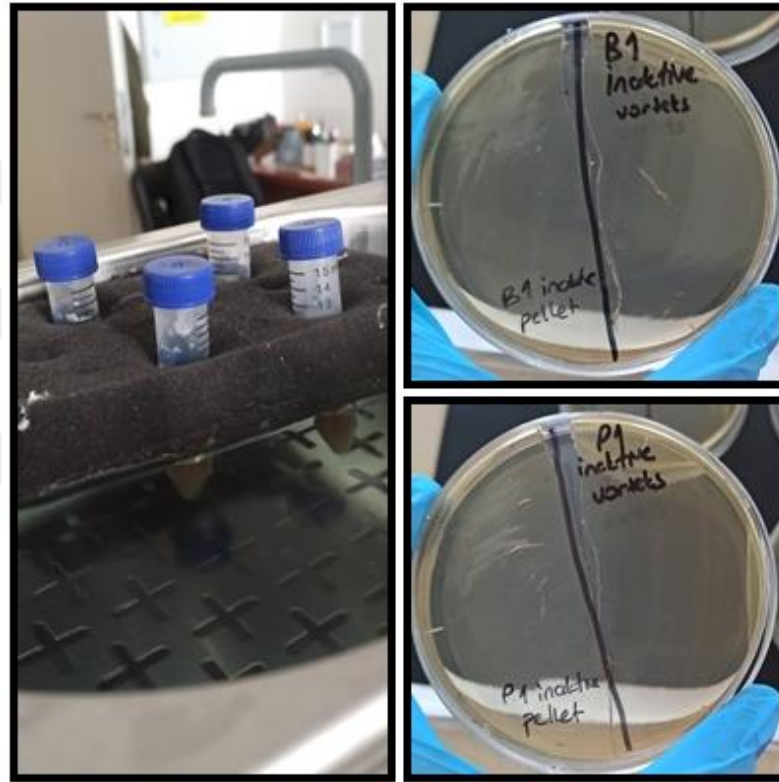


Şekil 3. 6. Probiyotik bakterilerin stoklanması

3.2.4. Probiyotik Bakterilerin İnaktivasyonu

Saf kültürleri elde edilen probiyotik izolatlardan tek koloni alınarak MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Üremenin gözlenmesinin ardından inaktive edilecek bakteriler 30 dk 100°C'de su banyosuna bırakıldı. Daha sonra hem canlı hem de inaktive olan bakterilerin hücresiz süpernatantlarını toplamak

için 4500 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edildi (Sadeghi-Aliabadi ve diğ. 2014). Santrifüj sonrası elde edilen hücresiz süpernatantlar 0.22 µM PES membran filtreler kullanılarak steril hale getirildi. Hücresiz süpernatantlar ya hemen kullanıldı ya da alikotlanarak daha sonra kullanılmak üzere -80°C soğutucuda saklandı. Tüm bu işlem basamaklarına ek olarak bakterilerin ısı ile inaktivasyonunu kontrol etmek için MRS sıvı besiyerinde pellet resüspanse edildi. Daha sonra MRS agara tekrar ekim yapılarak gelişmenin olup olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.7) (Karimi Ardestani ve diğ. 2019).



Şekil 3. 7. Bakterilerin su banyosunda ısı ile inaktivasyonunu ve MRS agarda kontrolü

3.2.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları, besin maddelerinin *in vitro* koşullar altında hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve çoğalmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünolojik, fizyolojik ve metabolik birçok sürecin araştırılması; gen ifade seviyelerinin saptanması, sinyal mekanizmalarının açıklanabilmesi; apoptoz ve hücre canlılığı gibi olayların belirlenebilmesi için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Genel olarak hücre kültür ortamları; hiperoksit nemli, %5 karbondioksit (CO₂) ve %95 oksijen (O₂) içeren 37°C sıcaklığa sahip kapalı ortamlardır.

Hücre kültürü çalışmaları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hematoloji ARGE Laboratuvarı'nda steril şartlarda gerçekleştirildi. Çalışmaların tamamında kullanılan malzemeler tek kullanımlık veya otoklavda sterilize edilerek kullanıldı. Tüm yüzeyler, Sınıf-II biyogüvenlik kabini de dahil olmak üzere %70'lik izopropanol ve %10 çamaşır suyu ile dezenfekte edildi. Hücre kültürü kabini yapılacak çalışmaların hem öncesinde hem de sonrasında UV ışık ile 15 dk steril hale getirildi. Tez çalışması kapsamında hücresiz süpernatantların antikanser etkisinin araştırılması amacıyla HT-29 (ATCC HTB-38) ve Caco-2 (ATCC HTB-37) insan kolon kanseri hücre hatları kullanıldı. Sitotoksikite kontrolü için insan sağlıklı embriyonik kolon epitel hücresi olan CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790) kullanıldı. Hücre hatlarının özellikleri Tablo 3.4'te verildi (ATCC, 2024).

Tablo 3. 4. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri

Hücre	CCD 841 CoN	HT-29	Caco-2 [Caco2]
Organizma	Homo sapiens, İnsan	Homo sapiens, İnsan	Homo sapiens, İnsan
Doku	Kalın Bağırsak, Kolon	Kolon	Kolon
Morfolojik	Epitelyal	Epitelyal	Epitel Benzeri
Kültür Özellikleri	Adherent	Adherent	Adherent
Hastalık	Yok	Adenokarsinom; Kolonorektal	Adenokarsinom; Kolonorektal
Cinsiyet	Kadın	Kadın	Erkek
Yaş	Fetüs	44	72

3.2.6. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin *in vitro* ortamda metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için uygun kültür şartları besiyeri ile sağlanır. En yaygın kullanılan besiyerlerinden birisi de Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)'dir ve aşağıdaki aşamalar takip edilerek dikkatli bir şekilde hazırlandı (Studzińska-Sroka ve diğ. 2021).

1. Ticari olarak satın alınan DMEM besiyeri ve diğer eklenecek maddeler oda sıcaklığına getirildi ve üzerlerine %70 isopropanol ile alkollenerek laminar akım kabine alındı.
2. Besiyeri içerisine ATCC'nin önerdiği oranlarda; %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 2 mili molar (mM) L-glutamine ve %1 penisilin-streptomisin kokteyli eklenerek 0,22 mikro metre (μm)'lık selülozik membranlı filtreden süzülerek steril hale getirildi.
3. Hazırlanan besiyerini olası kontaminasyonların sınırlandırması amacıyla homojen bir karışım sağlanmasının ardından 50'lik santrifüj tüplerine aliquotlar halinde hazırlandı (Şekil 3.8).
4. Hazırlanan tüpler üç hafta içerisinde tüketilmek koşuluyla +4°C buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3. 8. Besiyeri hazırlığı ve aliquotlara ayrılması

3.2.7. Stoktaki Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

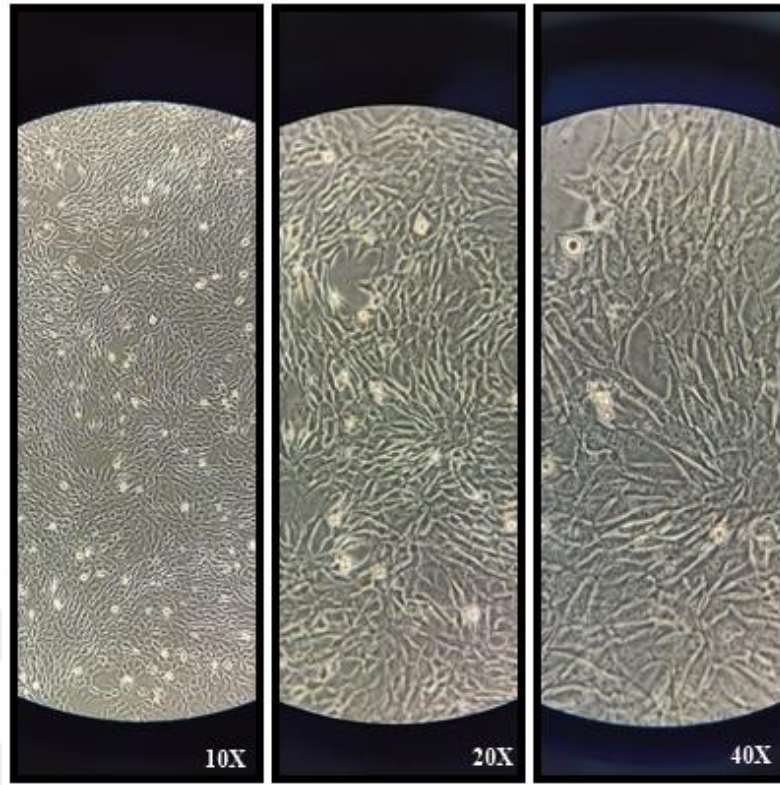
Çalışmamızdaki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de soğutucudan alınan kriyoviyal tüp içerisinde bulunan Caco-2, HT-29 ve CCD841 CoN hücreleri soğuk zincir prosedürüne uygun olarak laboratuvara getirilerek 37°C'deki su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Çözünmesi sağlanan kriyoviyal tüpler %70 alkolle silinerek dikkatli ve hızlı bir şekilde laminar akım kabinine alındı. Laminer akım kabininde dondurulmuş hücrelerin çözülmesi aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. DMEM besiyeri deneye başlanmadan önce 37°C'de ısınması sağlanarak %70'lik alkol ile silinip laminer kabin içine alındı.

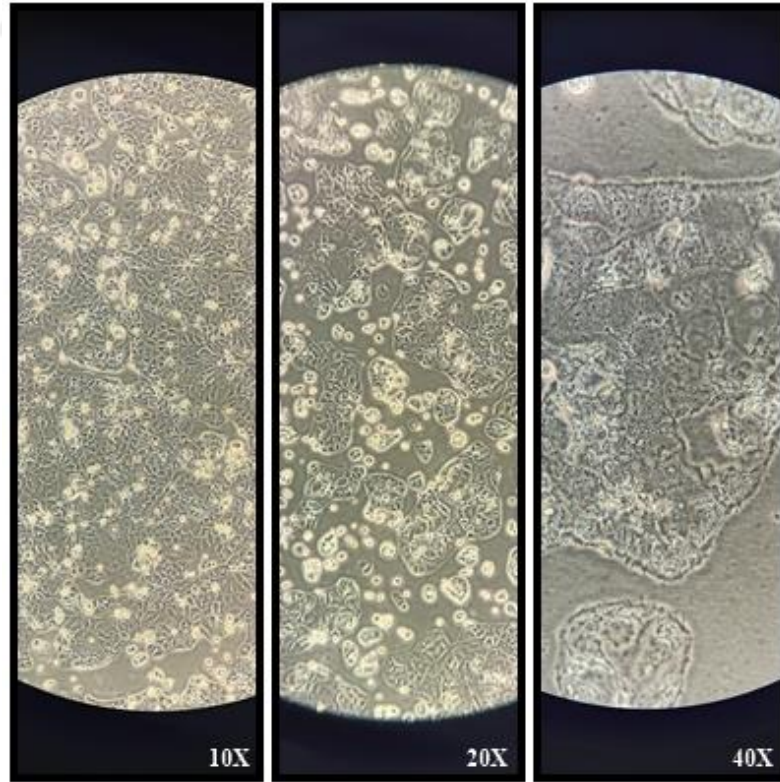
2. Kriyoviyal tüp içerisindeki çözünmüş olan hücre steril 15 mililitre (ml)'lik santrifüj tüpüne 5 ml su banyosunda ısınmış besiyeri konularak pipetajla aktarıldı.
3. Santrifüj tüpü 1200 Dakikadaki Devir Sayısı (rpm) 3 dk boyunca santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı.
4. Santrifüjden sonra üstte kalan süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
5. Hücre pelletinin üzerine steril serolojik pipet ile 2 ml besiyeri konularak nazikçe 3-5 kez pipetaj işlemi yapıldı.
6. Homojen bir şekilde karışması sağlanan mikro pipet ile resüspanse edilen hücre, içerisinde 3 ml besiyeri bulunan T25'lik flaska aktarıldı.
7. T25'lik flask, laminar akım kabini içerisinde hücre süspansiyonunun flaskın tüm yüzeyine yayılması sağlamak amacıyla nazikçe "sekiz" işareti şeklinde hareket ettirildi.
8. Hücrenin besiyerine homojen bir şekilde yayılıp yayılmadığını gözlemlemek amacıyla invert mikroskopta kontrolü sağlandı.
9. Hücre ekimi yapılan flask 37°C'de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı.

3.2.8. Hücre Hatlarının Pasajlanması

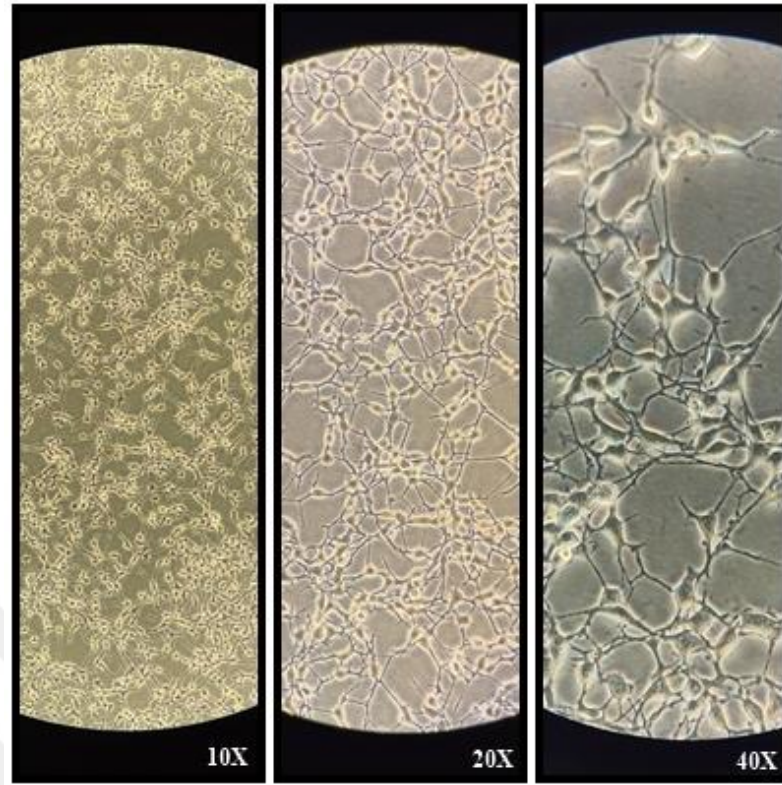
Flask tabanını %80-90 oranında kaplayan hücrelerde, besin miktarının azalması ve yüzeyin yetersiz kalması sonucunda kontakt inhibisyon meydana gelmekte ve bu durum hücre çoğalmasını olumsuz etkilemektedir. Bu inhibisyonu engellemek içinde hücrelere pasaj işlemi uygulanır. Pasajlama, kültüre edildikleri flaskta %80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin medyum içeren yeni temiz bir flaska aktarılmasıdır (Zhao ve diğ. 2017). Bu Çalışmada yaklaşık %80 yoğunluğa sahip pasajlanacak hücreler olan HT29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11' de verildi.



Şekil 3. 9. HT-29 hücrelerinin invert mikroskopi altındaki görüntüsü



Şekil 3. 10. Caco-2 hücrelerinin invert mikroskopi altındaki görüntüsü

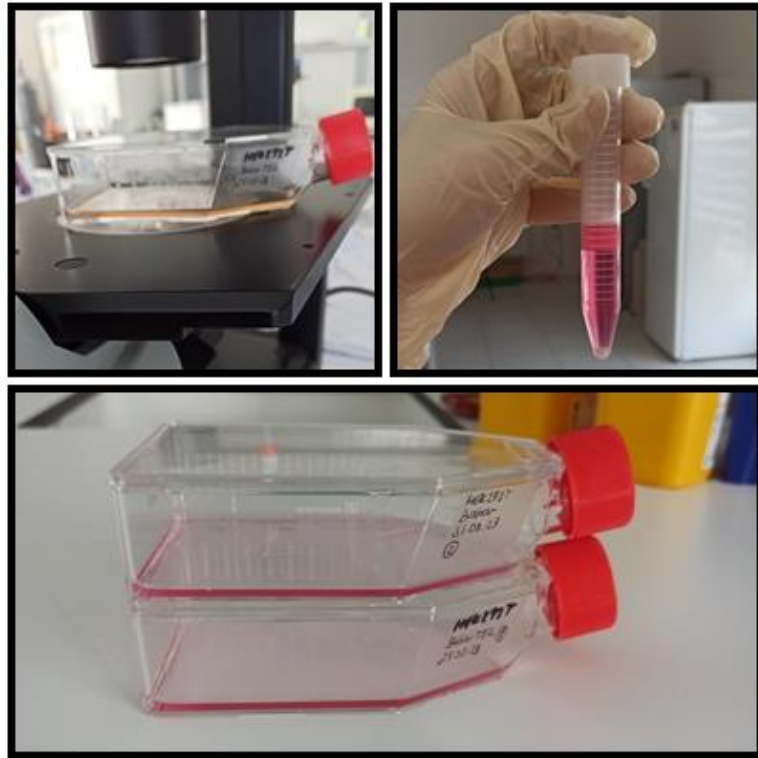


Şekil 3. 11. CCD841 CoN hücrelerinin invert mikroskopi altındaki görüntüsü

Hücrelerin pasajlamalarının yapılabilmesi için tutundukları flask tabanından ayrılmaları gerekir. Laminer akım kabini hücrelerin hem ‘tripsinizasyon’ hem de ‘detripsinizasyon’ işlemleri aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. DMEM besiyeri ve %0.05’lik Tripsin-EDTA deneye başlanmadan önce 37°C’de su banyosunda ısınması sağlanarak %70’lik alkol ile silinip laminer kabin içine alındı.
2. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri 10 ml’lik serolojik pipet ile ortamdan çekilip atıldı.
3. Sonrasında hücreler serolojik pipet kullanılarak 3 ml Dulbecco's Fosfat Tamponlu Salin (PBS, pH 7.2) ile yıkandı.
4. Ardından hücrelerin üzerine T25 ise 1 ml Tripsin-EDTA eklendikten sonra inkübatörde 3 dk bekletilerek hücrelerin tutunmuş olduğu yüzeyden kalkması sağlandı.
5. Yüzeyden kalkması sağlanan hücrelerin üzerine 3 ml DMEM besiyeri eklenerek santrifüj tüplerine aktarıldı sonrasında da 1250 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
7. Pellet üzerine 2 ml DMEM besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu oluşturuldu.
8. Son hacim 12 ml olacak şekilde besiyeri içeren T75 flaska hücre süspansiyonu eklendi.
9. T75'lik flask, laminar akım kabini içerisinde hücre süspansiyonunun flaskın tüm yüzeyine yayılması sağlamak amacıyla nazikçe “sekiz” işareti şeklinde hareket ettirildi (Şekil 3.12).
10. Hücrenin besiyerine homojen bir şekilde yayılıp yayılmadığını gözlemlemek amacıyla invert mikroskopta kontrolü sağlanarak 37°C’de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı.
11. Daha sonra hücreler %80-90 oranında flask yüzeyini kaplayıncaya kadar 2-3 günde bir DMEM besiyeri ile değiştirildi.



Şekil 3. 12. Hücrelerin Pasajlanması

3.2.9. Hücre Hatlarının Dondurulması

Pasajlama işleminin ardından deney sırasında kullanılmayacak kadar fazla hücrelerin, daha sonraki çalışmalarda gerekli olduğu takdirde değerlendirmek,

yaşlanmalarının önüne geçmek ve stok oluşturmak amacıyla dondurma işlemi yapılır. Laminer akım kabininde hücrelerin dondurularak stoklanması ‘kriyoprezervasyonu’ aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı (Zhao ve diğ. 2017).

1. T75 flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90’a ulaştığında bölüm 3.2.8’de anlatılan hücrelerin pasajlama işlemi altıncı maddeye kadar yapıldı.
2. Ardından canlılık kontrolü ve hücre sayımı için örnek alındı.
3. Örneğe, tripan mavisi eklenerek Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi.
4. 9:1 oranında hazırladığımız FBS-DMSO karışımı içerisinde 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde pellet süspanse edildi.
5. Pasaj sayısı, tarihi ve hücre tipi yazılmış olan 2 ml’lik kriyo tüplere mikro pipet ile hücre süspansiyonu homojen olarak paylaştırıldı.
6. Kademeli dondurma prensipleri uygulanarak, önce -20°C soğutulup daha sonra -80°C de derin dondurucuda muhafaza edildi.

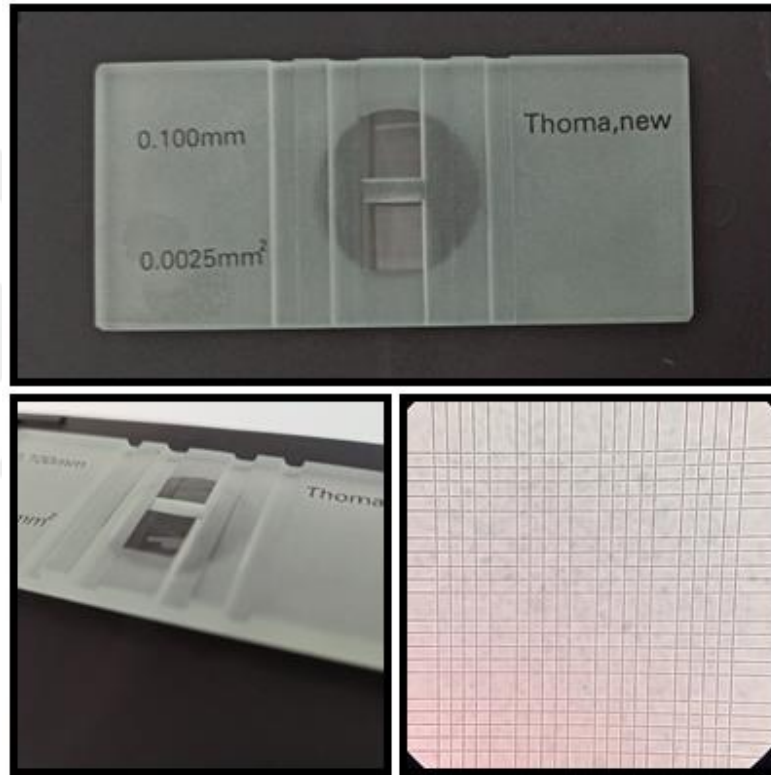
3.2.10. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı belirlenirken tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. Tripan mavisi hücrelerin membranlarından geçemez bu nedenle ‘renksiz’ görünürler. Ancak ölü hücrelerin membran yapısı bozulduğundan tripan mavisi hücre içine geçerek hücrenin ‘mavi’ boyanmasını sağlar. Laminer akım kabininde hücrelerin canlılığın belirlenerek hesaplanması aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. T75 flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90’a ulaştığında bölüm 3.2.8’de anlatılan hücrelerin pasajlama işlemi altıncı maddeye kadar yapıldı.
2. Hücre peleti üzerine 1 ml DMEM besiyeri konularak otomatik mikro pipet ile homojen bir şekilde karıştırıldı.
3. Hücre süspansiyonu laminer akım kabini içerisinde steril 1,5 ml’lik ependorfta 1:1 oranında %0,4’lük tripan mavisi ile pipetaj yapılarak 1 dk bekletildi.
4. Bekleme süresinde Thoma Lamı ve lameller %70’lik isopropilalkol ile steril hale getirildi.
5. Otomatik mikro pipet ile hücre ve tripan mavisi karışımından alınan 20 mikro litre (μl) örnek dikkatli bir şekilde lam-lamel arasına kondu.

6. Thoma lamı ışık mikroskopunda bakıldığında her biri 4x4 kareden oluşan 16 adet büyük kareden oluşmaktadır (Şekil 3.13).
7. 1 ml’de canlı hücre sayısı; canlı hücrelerin sayılıp (N), 2×10^4 ile çarpılmasıyla saptanmıştır. Her bir karenin toplam hacmi $0,1 \text{ mm}^3$ veya 10^{-4} cm^3 ’tür ($1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$). Formüldeki 2 ise 1:1 oranından gelen 2 kat seyreltildiğini gösteren standart sonuç için kullanılan değişmez çarpandır (Thomas ve Paul 1996).

$$\text{Hücre sayısı / mL} = N \times 10^4 \times \text{Seyreltme faktörü}$$



Şekil 3. 13. Thoma laminanın mikroskopu altındaki görüntüsü (10X)

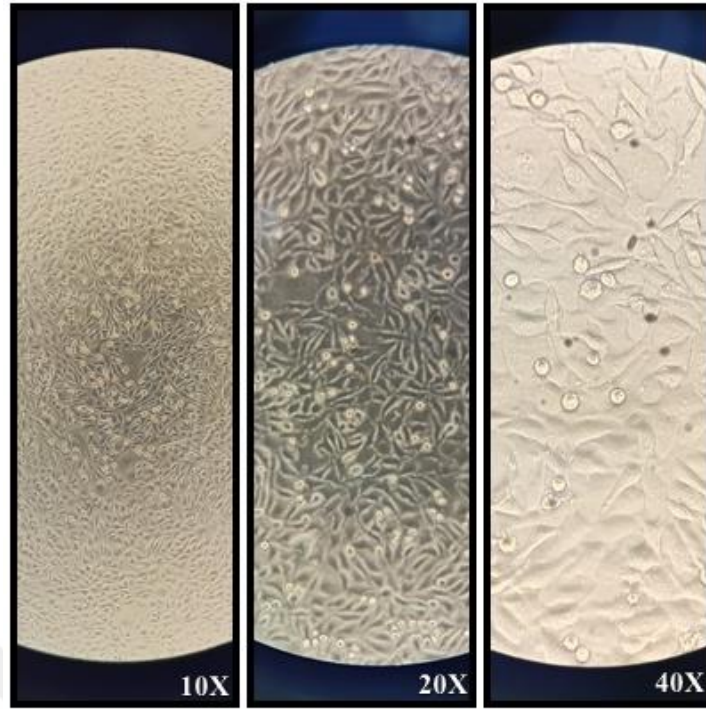
3.2.11. Sitotoksosite Deneyi

Sitotoksosite deneyleri; toksik bileşiklerin neden olduğu ve/veya olabileceği hücre canlılığı, çoğalması, hasarı, hücre ölümü gibi metabolik aktivitelerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Stockert ve diğ. 2018). Sitotoksositeyi belirlemek için kullanılan çeşitli testler (MTT, XTT, MTS, WST-1, CCK-8 vb.) vardır.

MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromide]) reaktif ökaryotik hücrelerin membranını kolaylıkla geçebilen ve pozitif yüklü bir

bileşiktir. Çalışmalarda kullanılan diğer testler ise hücre membranından geçemeyen negatif yüklü bileşiklerdir. Bu sebeple hücre membranını geçebilmek için ara elektron alıcı moleküllerin (fenazin metil sülfat vb.) kullanılması gerekmektedir (Tokur ve Aksoy, 2017). MTT testi, canlı hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik olarak spektrofotometre ile ölçülmesidir. İlk kez 1983 yılında Mosmann tarafından keşfedilmiştir (Mosmann, 1983). MTT fenol kırmızısı içermeyen, sarı renkli ve suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. Tetrazolium halkasının mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucunda ‘MTT’ mor renkli çözünmez formazana dönüşür. Formazan oluşumu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki aktivasyon ile gerçekleşir. Cansız hücrelerde renk değişikliği görülmez. Canlı hücrelerde oluşan formazanın dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek çözünebilir hale gelmesi sağlanır ve ELISA Reader’da 570 nm’de optik okuması yapılır. Absorbans değeri, canlı hücre sayısının bir ölçümü olarak değerlendirilir (Gerlier ve Thomasset, 1986; Moskova-Doumanova ve diğ. 2012; Kumar, 2018). Laminer akım kabiniinde hücrelerin sitotoksik değerini hesaplanması için MTT testi aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. T75 flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90’a ulaştığında sırasıyla bölüm 3.2.8 ve 3.2.10’da anlatılan pasajlama sonrasında ise hücre canlılığının hesaplanmasına ait tüm maddeler yapıldı.
2. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ l ekildi (Can ve diğ. 2020).
3. Hücrelerin kültür plaklarının yüzlerine tutunmaları için 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı.
4. İnkübasyon sonrasında hücrelerin 96 kuyucuklu kültür plaklarına tutunup tutunmadığının kontrolü invert mikroskopta kontrol edildi (Şekil 3.14).



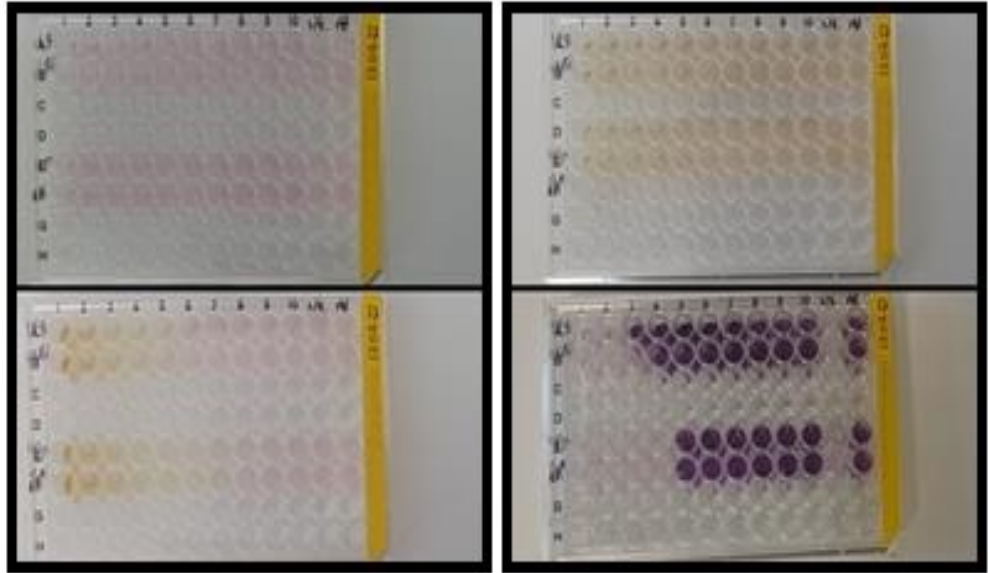
Şekil 3. 14. 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plağındaki CCD841 CoN hücrelerinin görüntüsü

5. 96 kuyucuklu kültür plağı kendimize doğru eğilerek tabana değdirilmeden dikkatli bir şekilde otomatik mikro pipet ile besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı.
6. Pozitif ve negatif kontrole yeni besiyeri, diğer kuyucuklarına ise seri dilüsyonu yapılan canlı ve inaktif CFS' ler çeşitli yüzde konsantrasyonları (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3,125, 1.56, 0,78, 0,39) uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı.
7. Toz halde temin edilen MTT reaktifinden 0,05 gram (g) tartılarak 10 ml DPBS içerisinde dışı alüminyum folyo ile kaplanarak oluşturulan karanlık ortamda vorteks ile çözdürüldü.
8. 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µl tüm kuyulara laminar akım kabininin ışığı kapatılıp çok kanallı otomatik mikro pipet ile eklenerek 37°C'de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonunda kuyucukların tamamından besiyeri-MTT fazı hücrelere zarar vermeden dikkatli bir şekilde çekilip atıldı.
10. MTT reaktifinin çözünerek görünür hale gelmesi için tüm kuyulara çok kanallı otomatik mikro pipet ile 100 µl DMSO pipetlenerek 5 dk boyunca 180 devir/dk çalkalanarak beklendi (şekil 3.15).

11. Çalkalama sonunda mikroparka okuyucusunda 570 nanometre (nm) dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.
12. Okuma sonucunda elde edilen absorbans verileri ile hücrelerin % canlılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Bibalan ve diğ. 2017; Melekoğlu ve diğ. 2020; Ansari ve diğ. 2022; Zhao ve diğ. 2024).

$$\% \text{ Hücre Canlılık: } ([OD]_{\text{Test}} - [OD]_{\text{Blank}}) / ([OD]_{\text{Kontrol}} - [OD]_{\text{Blank}}) \times 100$$

13. MTT sonuçlarına göre hücrelerin %50 canlılık gösterdiği ve en yüksek inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC₅₀) GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3. 15. MTT testi yapılan plakaların görüntüsü

3.2.12. Floresan Boyama

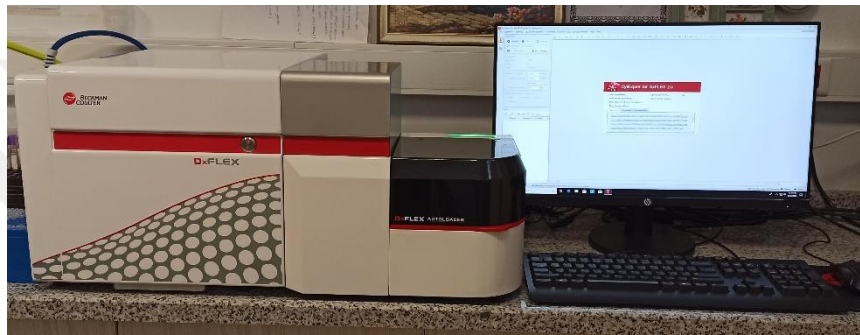
HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN, Hücrelerinde *L.bulgaricus* ve *L.paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT hesaplamaları sonucu belirlenen IC₅₀ değerleri ikili boyama yöntemi ile hücre çekirdeği boyanarak görünür hale getirildi. Akridin Oranj (AO) ve Propidyum İyodür (PI) hücrelerin canlılığını analiz eden nükleik asit bağlayıcı boyalardır. Hem canlı hem de ölü hücrelerin çekirdeğine etki edebilen AO boyası, canlı hücrelerin yeşil renk görünmesini sağlar. PI boyası ise yalnızca zayıf ve/veya yapısı bozulmuş ölü hücrelere girerek kırmızı-turuncu renge

boyar. Bu sayede apoptotik ve nekrotik hücreler belirlenebilmektedir. Laminer akım kabininde Floresan boyama yöntemi aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. T75 flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında sırasıyla bölüm 3.2.8 ve 3.2.10'da anlatılan pasajlama sonrasında ise hücre canlılığının hesaplanmasına ait tüm maddeler yapıldı.
2. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ l ekildi.
3. Hücrelerin kültür plaklarının üzerine tutunmaları için 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı.
4. İnkübasyon sonrasında hücrelerin 96 kuyucuklu kültür plaklarına tutunup tutunmadığının kontrolü invert mikroskopta kontrol edildi.
5. 96 kuyucuklu hücre kültür plağı kendimize doğru eğilerek tabana değdirilmeden dikkatli bir şekilde otomatik mikro pipet ile besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı.
6. Pozitif ve negatif kontrol grubuna yeni besiyeri, diğer kuyucuklarına ise seri dilüsyonu yapılan canlı ve inaktif hücresiz bakteri süpernatantlarının IC_{50} konsantrasyonu uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı.
7. Canlı ve ölü hücreler üzerine etkisini gözlemlemek için 10 g sodyum-etilendiamintetraasetik asit (Na-EDTA), 4 mg PI ve 50 ml FBS, 4 mg AO (2 ml 99% ETOH içinde çözülmüş) iyice karıştırılıp son hacim 200 ml olacak şekilde steril damıtılmış su eklenerek pipetaj yapıldı (Şeber ve diğ. 2020).
8. İnkübasyonu tamamlanan hücrelerden fazla besiyeri çekilip atılarak kuyular DPBS ile yıkandı.
9. Yıkama işlemi yapılan hücrelerin üzerine her kuyucuğa 20 μ l AO/PI boya karışımından eklenerek 5 dk inkübe edildi.
10. Farklı apoptotik özelliklere sahip hücrelerden floresan mikroskopta mikro fotoğraflar elde edildi. Görüntüler Cytovision Capture Station görüntüleme yazılımı kullanılarak değerlendirildi (Version 7.5; Genetix; Leica Microsystems).

3.2.13. Hücre Döngüsü Analizi

HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN, Hücrelerinde *L.bulgaricus* ve *L.paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT hesaplamaları sonucu belirlenen IC_{50} değerlerinin hücre döngüsünün hangi aşamasında etkili olduğu akış sitometrisi analizi ile belirlendi. Hücre döngüsü analizi için Vindelov'un PI reaktifi ile hazırlanan boyama çözeltisi kullanıldı. Akış sitometrisinde G0/G1, S, G2/M evrelerindeki hücre sayısı ve yüzdeleri DxFLEX B4-R2-V3 Flow Cytometer Autoloader cihazında okutuldu (Şekil 3.16) ve CytExpert DxFLEX yazılımı ile analiz edilerek belirlendi (Chen ve diğ. 2023).



Şekil 3. 16. DxFLEX B4-R2-V3 Flow Cytometer Autoloader cihazı

Laminer akım kabininde hücre döngüsü analizi aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. T75 flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında sırasıyla bölüm 3.2.8 ve 3.2.10'da anlatılan pasajlama sonrasında ise hücre canlılığının hesaplanmasına ait tüm maddeler yapıldı.
2. Hücre süspansiyonundan 6 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna 25×10^4 hücre olacak şekilde 2 ml ekildi.
3. Hücrelerin kültür plaklarının yüzlerine tutunmaları için 24 saat boyunca $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı.
4. İnkübasyon sonrasında hücrelerin 6 kuyucuklu kültür plaklarına tutunup tutunmadığının kontrolü invert mikroskopta kontrol edildi.
5. 6 kuyucuklu hücre kültür plağı kendimize doğru eğilerek tabana değdirilmeden dikkatli bir şekilde otomatik mikro pipet ile besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı.

6. Pozitif ve negatif kontrol gruplarına yeni besiyeri, diğer kuyucuklarına ise seri dilüsyonu yapılan canlı ve inaktif hücresiz bakteri süpernatantlarının IC_{50} konsantrasyonu uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyonu tamamlanan hücrelerden fazla besiyeri çekilip atılarak kuyular DPBS ile yıkandı.
8. Yıkama işlemi yapılan hücrelerin üzerine 100 μ l %0.05'lik Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 3 dk bekletildi.
9. Hücrelerin tutunmuş olduğu yüzeyden kalktığını gördükten sonra üzerlerine 500 μ l taze besiyeri konulup 1.5 ml'lik ependorflara alındı.
10. Daha sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
11. Ortamda tripsin kalma ihtimaline karşın hücreler DPBS ile yıkandı.
12. Pellet üzerine 1 ml DPBS eklenerek hafifçe karıştırıp ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
13. Santrifüj sonrasında süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak 1 ml DPBS koyulup hücreler süspanse edildi.
14. Süspanse edilen hücreler $-20^{\circ}C$ 'de bulunan 5 ml %70'lik Etanol üzerine vorteks yapılırken damla damla eklendi ve hemen $+4^{\circ}C$ 'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
15. İnkübasyon sonrasında hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
16. Alkolün ortamdan tamamen uzaklaşması amacıyla hücrelerin üzerine 1 ml DPBS eklenerek 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak örnek başına 1 ml DPBS ve 5 μ l %20 Triton X deterjanı örneklerle eklenerek hafifçe 3 dk boyunca çalkalanarak inkübe edildi.
18. İnkübasyonu tamamlanan hücreler 1700 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
19. Pellet üzerine örnek başına 500 μ l DPBS ve 3,3 μ l RNAase karışımı eklenerek 30 dk $37^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.
20. İnkübasyon sonrasında 10 mg/ml'lik PI boyasından örnek başına 10 μ l eklenerek karanlıkta 1 saat inkübe edildi.

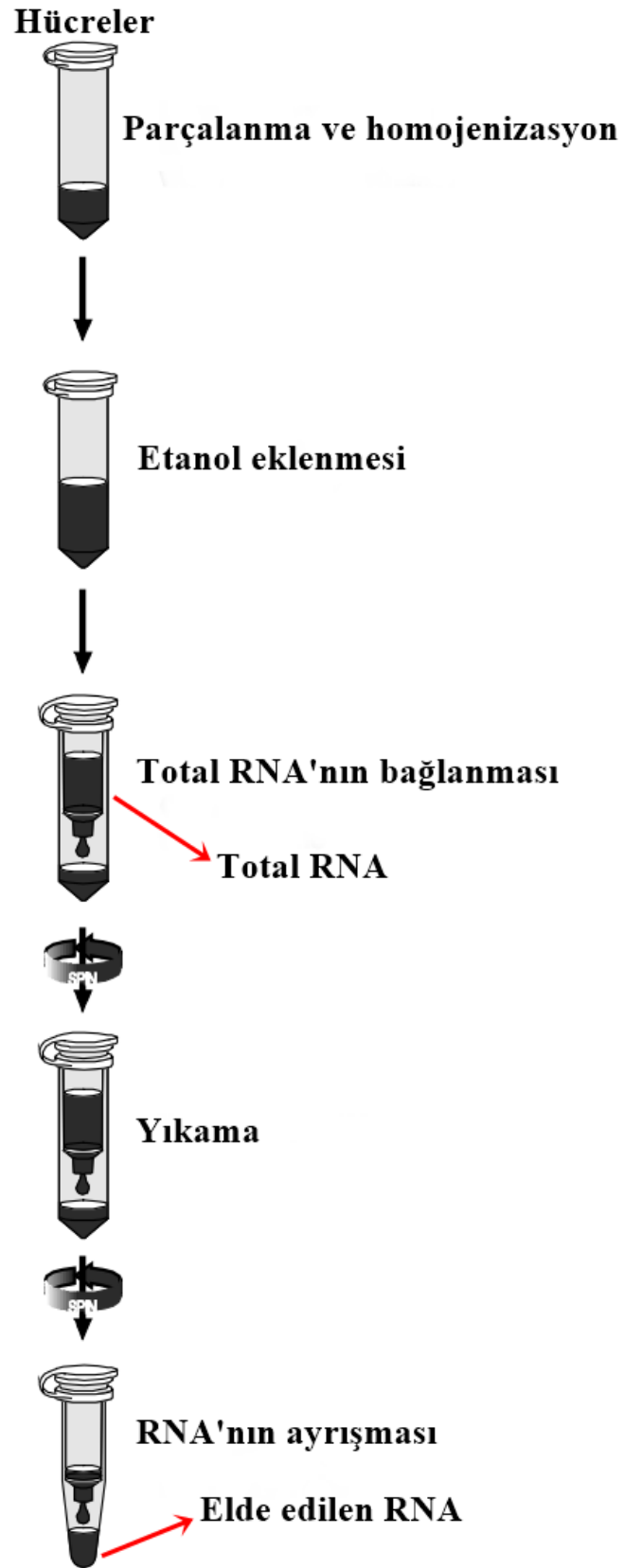
21. Daha sonra hücreler akış sitometri tüplerine aktararak okutuldu.

3.2.14. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN, Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının sitotoksosite analizi sonuçları göz önüne alınarak belirlenen IC₅₀ değerlerinin uygulamasından sonra apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerindeki değişikliği değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra RNA'nın saflığı ölçülerek komplementer DNA'sının sentezi gerçekleştirilerek gen ifade profilleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile belirlendi.

3.2.14.1. Total RNA İzolasyonu

HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücreleri 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekildi. Sitotoksosite deneyi sonucunda *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının belirlenen IC₅₀ değerleri hücrelere uygulandı ve 37°C'de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemi bulunan steril inkübatörde kültüre alındı. İnkübasyonun ardından IC₅₀ değerleri uygulanan hücreler ve uygulanmayan kontrol hücreleri iki defa PBS ile yıkandı. Daha sonra tripsin ile 6 kuyucuklu plaka tabanından hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin total RNA izolasyonları, PureLink® RNA Mini Kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (Şekil 3. 17) PureLink® RNA Mini Kit kullanılmaya başlanmadan önce tampon solüsyonları hazırlandı. Bunun için 600 µl lizis tamponu solüsyonuna 6 µl β 2-merkaptöetanol (β2-ME) eklendi. Konsantre olarak gelen Yıkama tamponuna şişe üzerinde belirtilen şekilde %96-100 etanolden 60 ml eklenerek çalışma solüsyonu elde edildi.



Şekil 3. 17. PureLink® RNA Mini Kit protokolünün şematik gösterimi

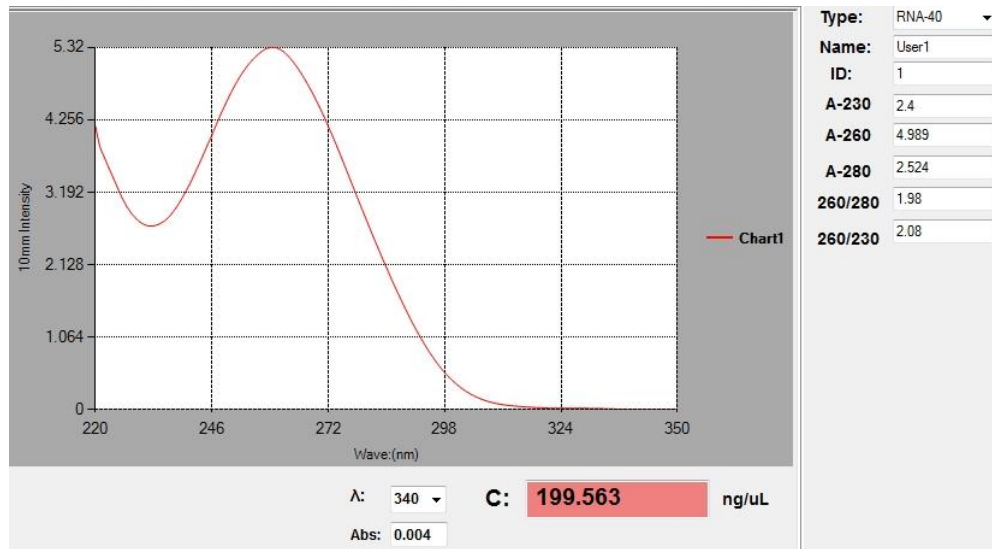
3.2.14.2. RNA miktarları ve Safılıklarının Ölçümü

Hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları, Nanodrop spektrofotometre cihazında ölçüldü (Şekil 3.18).

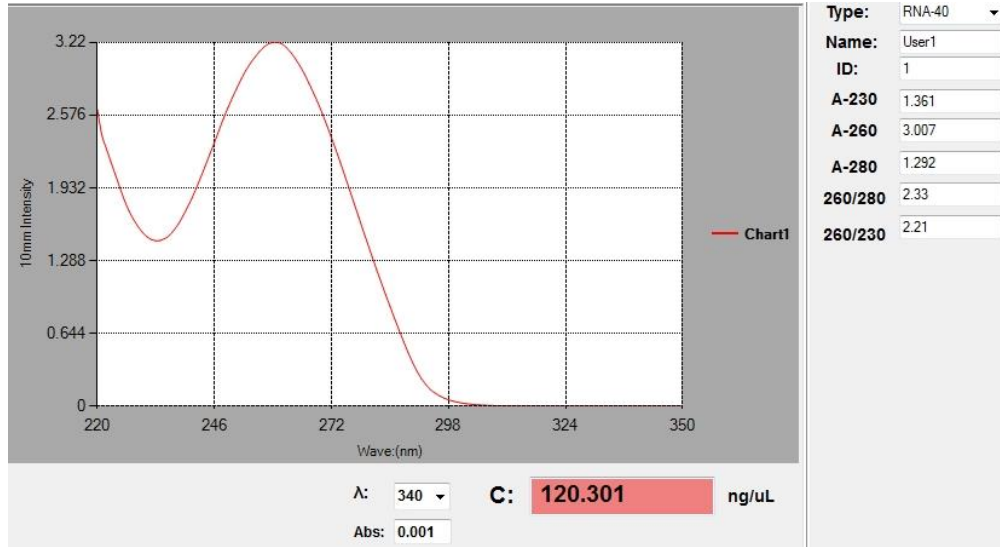


Şekil 3. 18. Nanodrop spektrofotometre cihazı

Elde edilen her bir örnekten 1 µl kullanılarak A_{260}/A_{280} nm ve A_{230}/A_{260} nm dalga boylarında OD (absorbans değerleri) ölçüldü. İdeal saflık değerlerinin; OD_{260}/OD_{280} 1.8- 2.2 aralığında ve OD_{230}/OD_{260} oranının aralığı ise 2,0- 2,4 olan örnekler ile çalışıldı (Şekil 3.19, Şekil 3.20).



Şekil 3. 19. Optimum değerlerde olan HT-29 hücre hattının RNA örneğine ait yoğunluk ve dalga boyu (nm) görüntüsü



Şekil 3. 20. Optimum değerlerde olan Caco-2 hücre hattının RNA örneğine ait yoğunluk ve dalga boyu (nm) görüntüsü

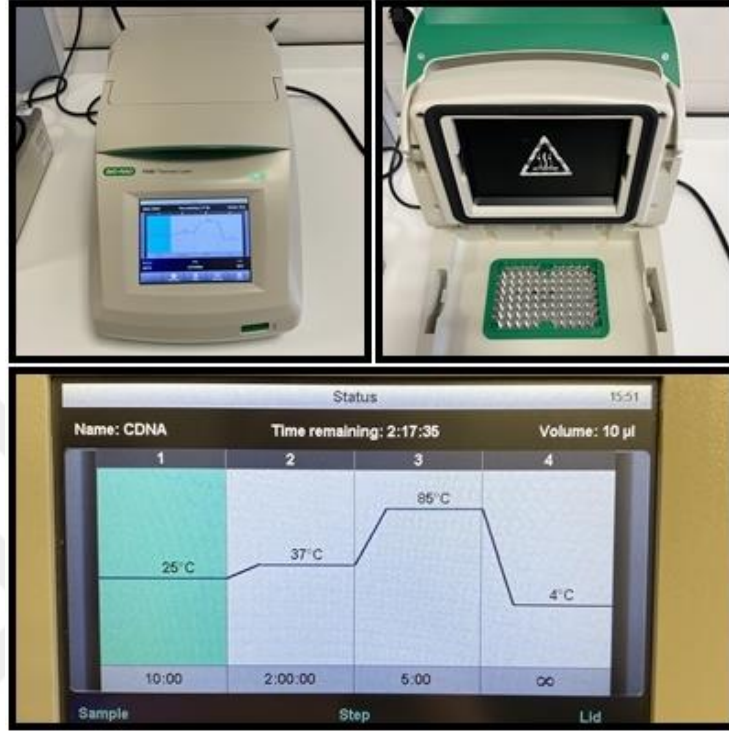
3.2.14.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Hücre hatlarından izole edilen total RNA örnekleri qPCR’de gerçekleştirilen gen ifade analizlerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi yapıldı. Bu amaçla Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Sci. Cat No:4368814) kullanıldı. cDNA sentezi için ölçüm yapılan RNA örneklerinden 500 ng/ μ L olacak şekilde hesaplandı. cDNA sentezinde gerekli olan reaksiyon bileşenlerinin buz üzerinde homojen bir şekilde karışımı sağlanarak hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3. 5. cDNA’da kullanılacak reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Bileşenler	Hacim (μ L)
10X RT Tamponu	2.0
25X dNTP Karışımı (100 mM)	0.8
10X RT Random Primer	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nükleaz içermeyen Su (H ₂ O)	4.2
Total hacim	10.0

Hazırlanan pcr tüpleri ters transkripsiyon yönetiminin uygulanabilmesi amacıyla T100 Thermal Cycler (Biorad) PCR cihazına yerleştirildi (Şekil 3.21). Tablo 3.6’da cDNA sentezi için gerekli olan reaksiyon koşulları yer almaktadır.



Şekil 3. 21. Thermal Cycler cihazı

Tablo 3. 6. cDNA sentezinin reaksiyon programı

Program	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25	37	85	4
Süre (dk)	10	120	5	∞

Sentezlenen cDNA’lar qPCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’ da gen ifade analizinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.14.4. qPCR ile Gen İfadesi Analizi

Gen ifade analizleri için en güvenilir, hassas ve en çok tercih edilen yöntem qPCR’ dir. Metod olarak rölatif kantitasyon yöntemi kullanıldı. HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN, hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları uygulanarak qPCR yöntemi ile apoptotik

genlerin ifade seviyelerindeki değişiklikler araştırıldı. Apoptoz ile ilişkili yollarda görev alan BCL-2 ile ilişkili X proteini (BAX), Kaspaz-9 (Cas 9), Kaspaz- 8 (Cas 8) Kaspaz- 3 (Cas 3) ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) olmak üzere 5 adet genin ifade değişimi tespit edildi. Normalizasyon için glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) referans gen (housekeeping gen) olarak kullanıldı. qPCR’de kullanılmak üzere hedef genlerin mRNA dizilerine Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)’ndan ulaşılarak primerler tasarlandı. Çalışmamızda qPCR analizi ile mRNA düzeyinde ifade seviyeleri değerlendirilen genler ile hedef ve referans genlerine ait primer dizileri Tablo 3.7 gösterildi.

Tablo 3. 7. Primer dizileri ve amplikon uzunlukları

Gen	İleri primer (5'→3')	Geri primer (5'→3')	NCBI Numarası
BAX	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	GGCCTTGAGCACCAGTTT	NM_001291429.2
Cas-9	CGACCTGACTGCCAAGAAA	CATCCATCTGTGCCGTAGAC	NM_001229.5
Cas-8	GCCCAAACCTTCACAGCATTAG	GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT	NM_001080124.2
Cas-3	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	TCAATGCCACAGTCCAGTTC	NM_001354779.2
Bcl-2	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA	NM_000633.3
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	NM_001256799.3

Hedef genlerin ifadeleri için SYBR Green kullanıldı. qPCR, “FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche, İsviçre)” protokolü kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3. 8).

Tablo 3. 8. qPCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Bileşenler	Hacim (µl)
2X MasterMix (with SYBR-Green)	5 µL
Forward Primer (10 µM)	0,5 µL
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µL
cDNA Örneęi	2,5 µL
RNase-Free Destile Su	1,5 µL
Total hacim	10.0

qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıda belirtildi (Tablo 3. 9). LightCycler Software 4.1 program versiyonu kullanılarak hedef mRNA normalizasyon oranları tespit edildi. Program örneklere ait amplifikasyon eğrilerinden normalizasyon oranları otomatik olarak hesaplandı. Çalışmamızda Roche LightCycler 2.0 cihazı kullanıldı (Şekil 3. 22).

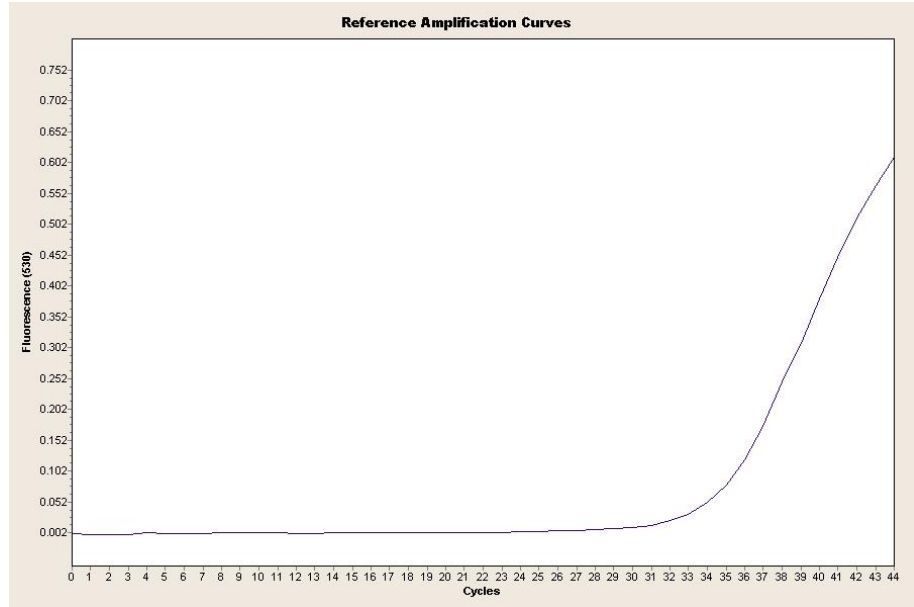
Tablo 3. 9. qPCR programı

Döngü sayısı	Program	Sıcaklık (° C)	Süre
1	Enzim Aktivasyonu	95	10 dk
45	Denatürasyon	95	20 sn
	Bağlanma	52	20 sn
	Uzama	72	20 sn
1	Erime Eğrisi	95	10 sn
		65	1 dk
		95	1 sn

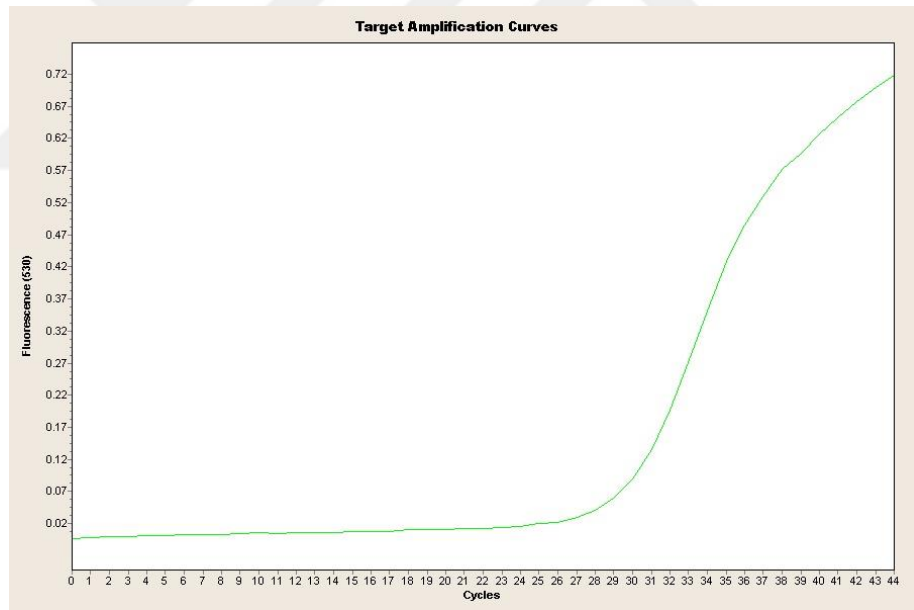


Şekil 3. 22. qPCR için kullanılan LightCycler 2.0 cihazı

Bir hücre hattına ait Cas 9 ve GAPDH genlerine ait qPCR analiz sonuçlarından amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri Şekil 3.23. ve Şekil 3.24.'de örnek olarak gösterildi.



Şekil 3. 23. HT-29 hücre hattında hedef gen (Cas 9) amplifikasyon eğrisi ve Ct Değeri



Şekil 3. 24. HT-29 Hücre hattında referans gen (GAPDH) amplifikasyon eğrisi ve Ct değeri

Çalışmamızda, eşik döngüsü (Ct) değerleri qPCR cihazı kullanılarak belirlendi. ΔCt yönteminde, her bir örnek için hedef gen ve referans gen Ct değerleri arasındaki fark kullanıldı ($\Delta Ct = C_{\text{hedef gen}} - C_{\text{referans gen}}$). Hedef genlerin ifadesi, $2^{-\Delta \Delta Ct}$

formülüne göre aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001)

1. Hedef grupta ve referans grupta yer alan her bir örnek için qPCR analizi sonucunda Ct değerleri belirlendi.
2. Hedef gruptaki her bir örnek için hedef mRNA'nın Ct değerinden referans RNA'nın Ct değeri çıkarılarak hedef gruba ait ΔCt değerleri hesaplandı.
3. Referans gruptaki her bir örnek için hedef mRNA'nın Ct değerinden referans RNA'nın Ct değeri çıkarılarak referans gruba ait ΔCt değerleri hesaplandı.
4. Hedef gruba ait ΔCt değerlerinden referans gruba ait ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı.
5. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak kat değişimi (Fold Change) hesaplandı.
6. Kat değişimi değeri 2'nin üzerinde olduğunda hedef grubun mRNA ifadesinin referans grubun mRNA ifadesine göre relatif olarak arttığı belirlendi. Kat değişimi değerinin 1'in altında olması durumunda ise hedef grubun mRNA ifadesinin referans grubun mRNA ifadesine göre relatif olarak azaldığı tespit edildi.

Bu yöntem, gen ifade düzeylerindeki değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı.

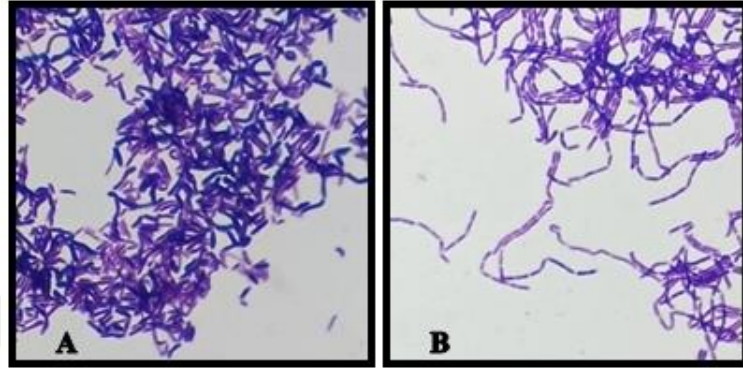
3.2.15. İstatistiksel Analiz

Tüm deneylerde kullanılan veriler üç tekrarlı olacak şekilde, ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. Grafikler Excel yazılımı (Microsoft Office 365) ve GraphPad Prism 8 programı kullanılarak hazırlandı. Daha sonra veriler, ANOVA kullanılarak değerlendirildi ve çoklu karşılaştırmalarda post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. İstatistiksel analizlerde p değerleri belirlendi. Buna göre p değerlerinin 0.05 ve altındaki durumlar istatistiksel olarak anlamlı olduğunda yıldızlı simgelerle görselleştirildi (****: $p \leq 0.0001$; ***: $p \leq 0.001$; **: $p \leq 0.01$; *: $p \leq 0.05$).

4. BULGULAR

4.1. Probiyotik Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Sonuçları

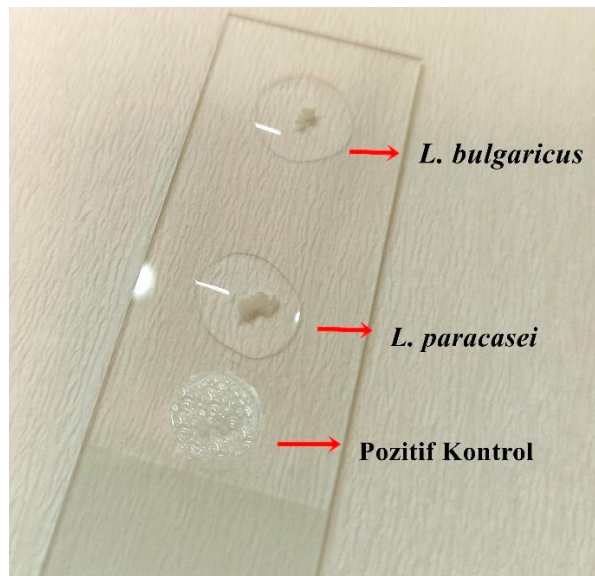
Deman, Rogosa And Sharpe agar üzerinde gelişen ‘yuvarlak ve beyaz kremi’ kolonilerden preparatlar hazırlandı. Gram boyama yöntemi ile boyanan preparatlarda Gram-pozitif bakteriler gözlemlendi (Şekil 4.1).



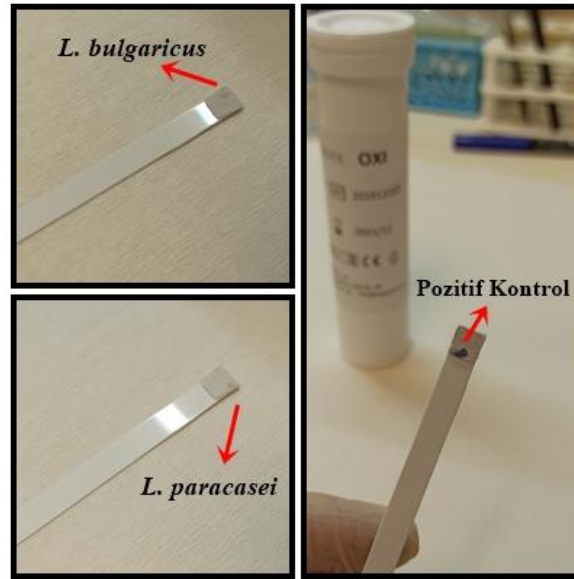
Şekil 4. 1. Gram boyama mikroskop görüntüsü, 100X

(A: *L. bulgaricus*, B: *L. paracasei*)

Tanımlaması yapılan probiyotik bakterilerin katalaz ve oksidaz testi sonuçları negatif olarak saptandı (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4. 2. Katalaz testi sonuçları



Şekil 4. 3. Oksidaz testi sonuçları

4.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Caco-2, HT-29 ve CCD 841 CoN hücrelerinin pasaj sonrası canlılıkları ve hücre sayıları, Thoma lamında Trypan-Blue boyası ile boyanarak tespit edildi. Her üç hücre hattı için de deney tipine göre 96 ve 6 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakalarına, hücre sayıları otomatik mikro pipet ile eklendi. Hücrelerin tutunmaları sağlanması amacıyla, 37°C’de %5 CO₂ ve %95 bağıl nemde inkübasyona bırakıldı.

4.3. Sitotoksisite Sonuçları

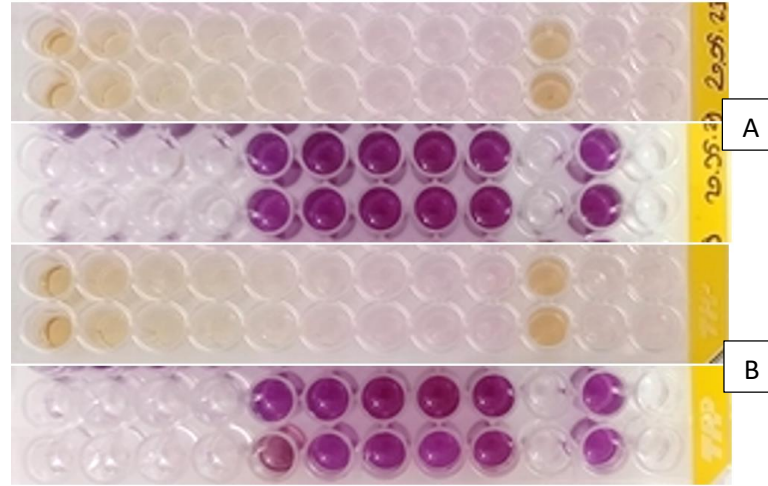
Çalışmamızda HT-29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücre hatları ile insan sağlıklı embriyonik kolon epitel hücresi olan CCD 841 CoN üzerine probiyotik bakterilerin hücresiz süpernatantların 24 saatlik sitotoksik etkisi MTT testi kullanılarak araştırıldı. Uygulama yapılmayan hücre hatları pozitif kontrol, çalışmalarda kullanılan besiyeri ise negatif kontrol olarak değerlendirildi. Tüm sitotoksisite deneyleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. MTT verilerinde, hücrelerin %50 canlılık gösterdiği ve en yüksek inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC₅₀) GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi.

4.3.1. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN, Hücrelerinde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT ve IC₅₀ değerleri

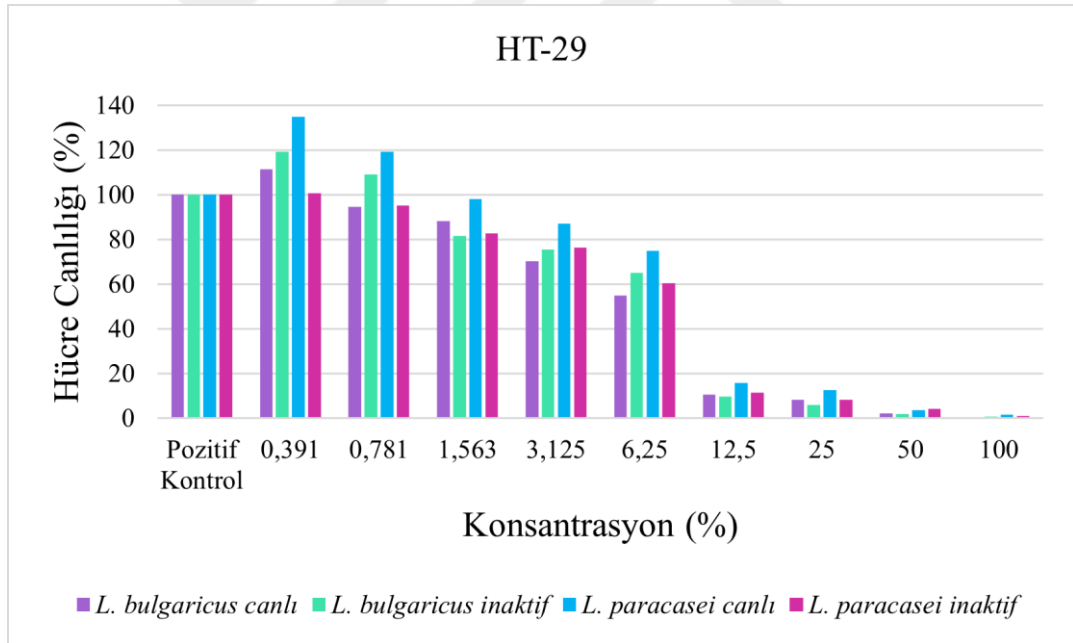
Çalışmamızda HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN, hücrelerine artan konsantrasyonlarda (0,39-100 %) *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının 24 saatlik uygulaması yapıldı. Sonrasında konsantrasyona bağlı hücre canlılığının incelenebilmesi amacıyla MTT testi uygulandı. Uygulama yapılmayan pozitif kontrol grubunun canlılık oranı %100 olarak kabul edildi. Diğer konsantrasyonlara ait canlılık yüzdeleri ve standart sapma değerleri, Microsoft Excel (Microsoft 365) programı kullanılarak hesaplandı.

Elde edilen sonuçlar HT-29 hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu gösterdi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırılan HT-29 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin istatistiksel anlamlılığı, one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi (**** $p < 0,0001$).

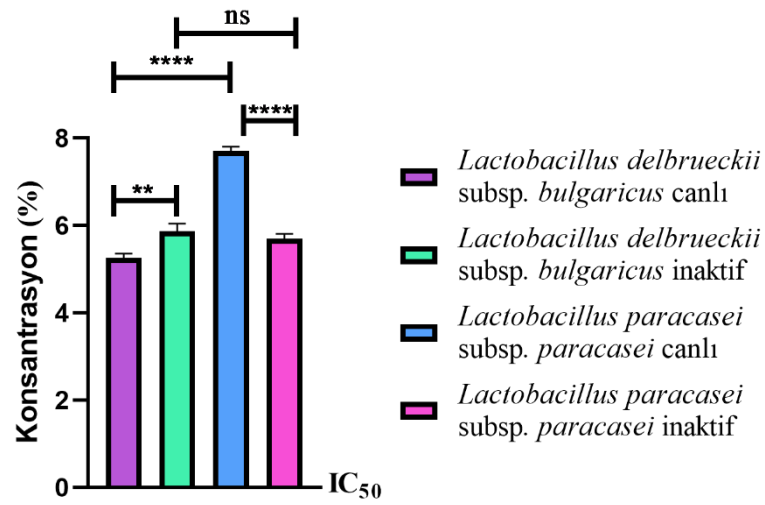
Hücre canlılığının belirlenmesinin ardından IC₅₀ değerlerinin hesaplaması GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak yapıldı. Hücresiz süpernatantların IC₅₀ değerleri; *L. bulgaricus* %5,255±0,102 (canlı) ve %5,872±0,171 (inaktif); *L. paracasei* %7,714±0,099 (canlı) ve %5,695±0,114 (inaktif) olarak belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 4. HT-29 hücrelerine uygulanan *L. bulgaricus* (A) ve *L. paracasei* (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü



Şekil 4. 5. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı HT-29 hücrelerinde canlılık grafiği

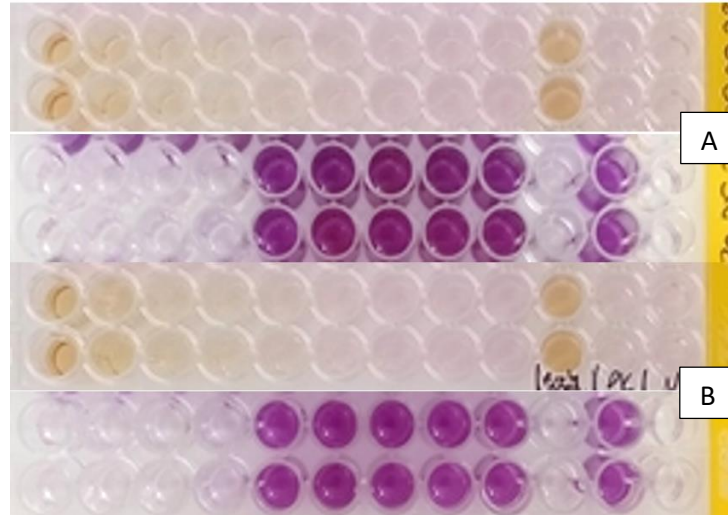


Şekil 4. 6. HT-29 hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ sonuçları

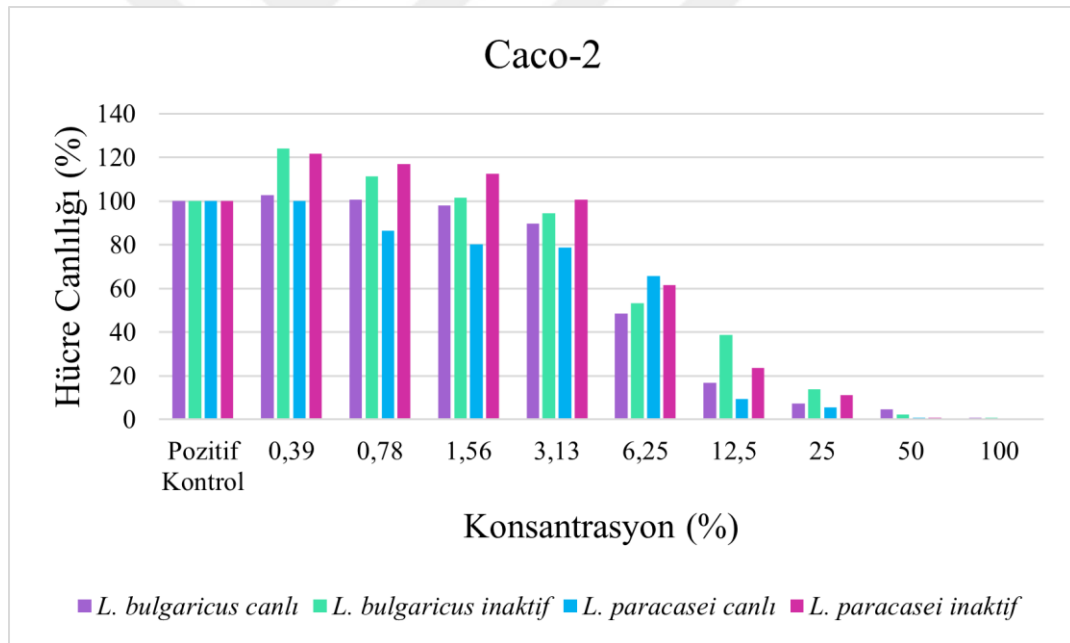
(* $p < 0,0109$ ** $p < 0,0014$ **** $p < 0,0001$ ns: anlamlı değil)

Caco-2 hücrelerinde, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulama sonuçları incelendiğinde, artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu değerlendirildi (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Kontrol grubuna göre karşılaştırılan Caco-2 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin istatistiksel anlamlılığı, one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi (**** $p < 0,0001$).

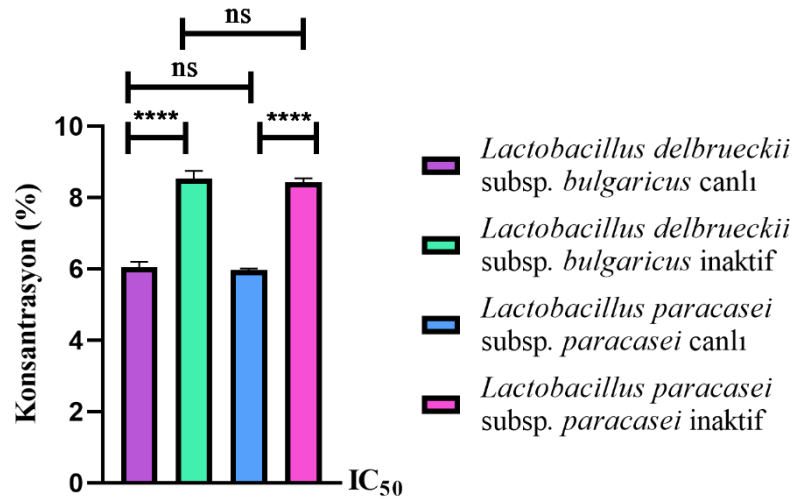
Hücre canlılığının belirlenmesinin ardından IC₅₀ değerlerinin hesaplaması GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak yapıldı. Hücresiz süpernatantların IC₅₀ değerleri; *L. bulgaricus* %6,057±0,138 (canlı) ve %8,530±0,216 (inaktif); *L. paracasei* %5,970±0,039 (canlı) ve %8,430±0,109 (inaktif) olarak belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4. 7. Caco-2 hücrelerine uygulanan *L. bulgaricus* (A) ve *L. paracasei* (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü



Şekil 4. 8. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı Caco-2 hücrelerinde canlılık grafiği

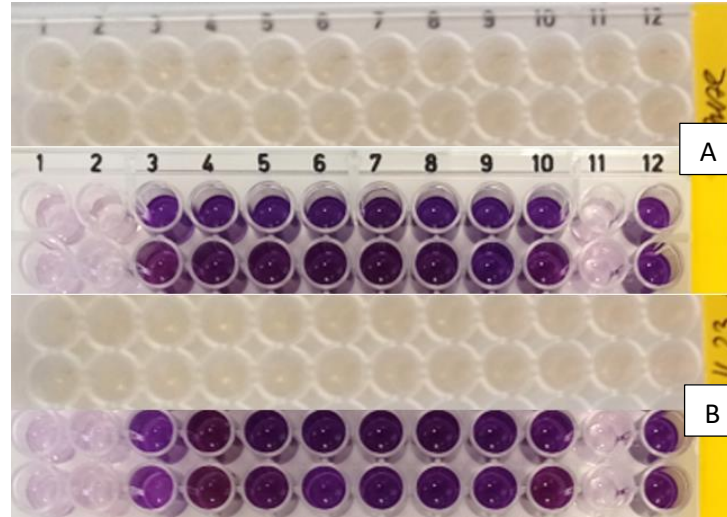


Şekil 4. 9. Caco-2 hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ sonuçları

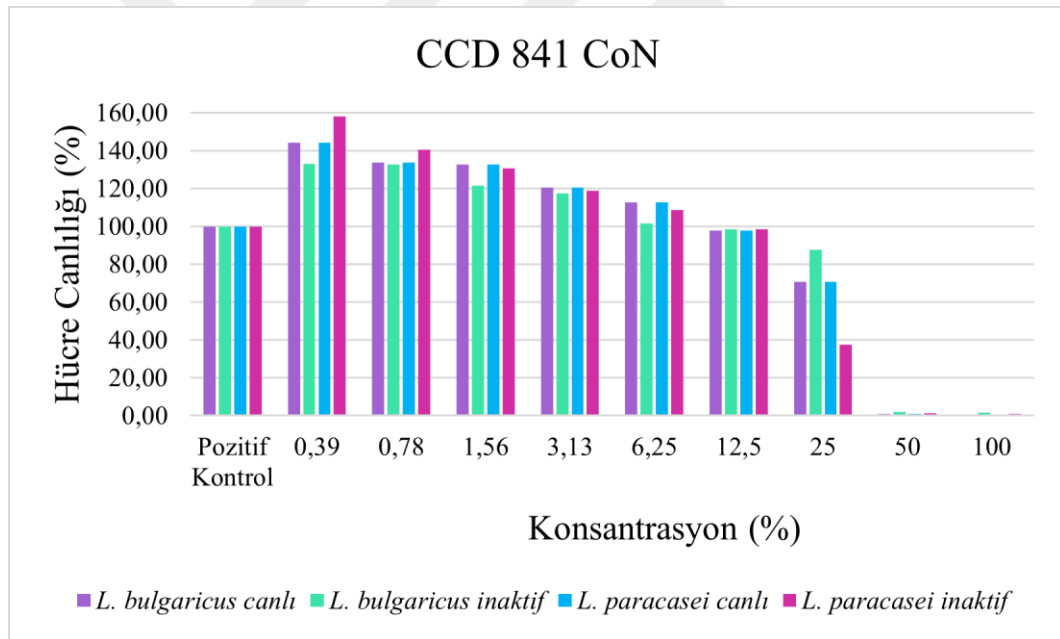
(**** $p < 0,0001$ ns: anlamlı değil)

CCD841 CoN hücrelerinde, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulama sonuçları incelendiğinde, artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu değerlendirildi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Kontrol grubuna göre karşılaştırılan CCD841 CoN hücrelerinin canlılık yüzdelерinin istatistiksel anlamlılığı, one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi (**** $p < 0,0001$).

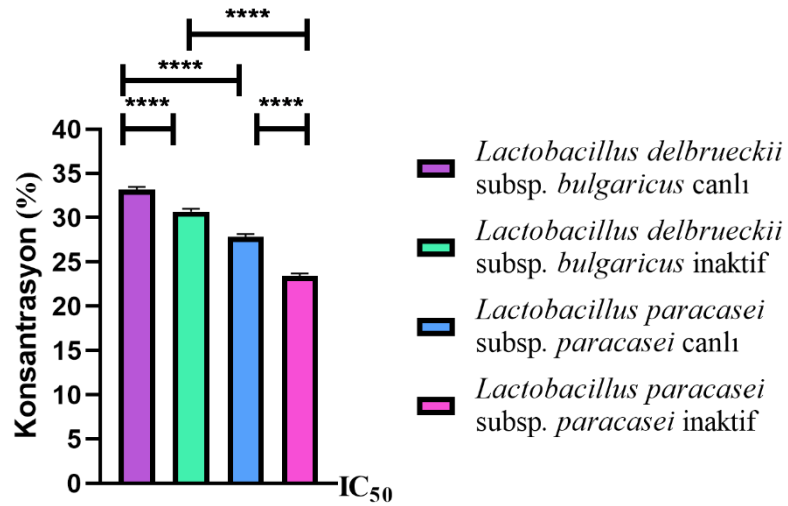
Hücre canlılığının belirlenmesinin ardından IC₅₀ değerlerinin hesaplaması GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak yapıldı. Hücresiz süpernatantların IC₅₀ değerleri; *L. bulgaricus* %33,196±0,272 (canlı) ve %30,682±0,324 (inaktif); *L. paracasei* %27,802±0,342 (canlı) ve %23,400±0,303 (inaktif) olarak belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4. 10. CCD841 CoN hücrelerine uygulanan *L. bulgaricus* (A) ve *L. paracasei* (B) izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının MTT plağı görüntüsü



Şekil 4. 11. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının uygulandığı CCD841 CoN hücrelerinde canlılık grafiği

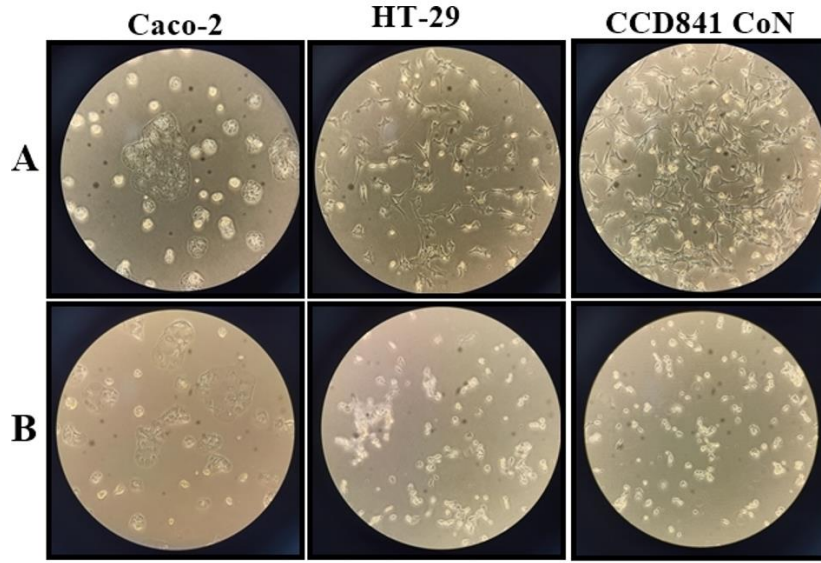


Şekil 4. 12. CCD841 CoN hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ sonuçları

(**** $p < 0,0001$)

4.4. Floresan Boyama Sonuçları

L. bulgaricus ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler, floresan mikroskopla boyanmasının ardından incelendi. Inverted mikroskop gözlemlerine göre, 24 saatlik canlı ve inaktif bakteri süpernatantlarının uygulaması sonucunda HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinde sayıca azalma meydana geldiği ve normal hücre şeklinin kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).

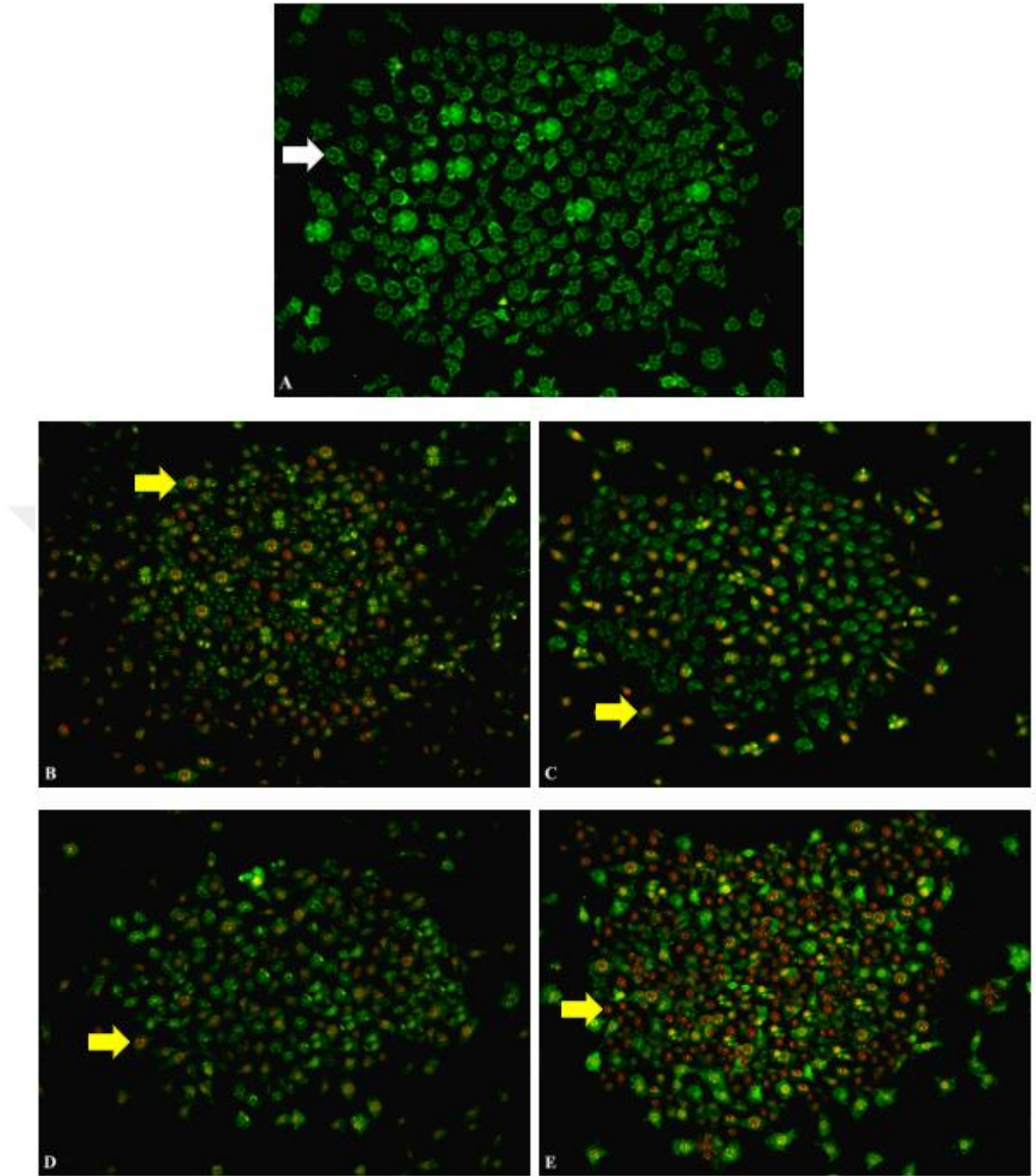


Şekil 4. 13. *L. paracasei* izolatlarının inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen Caco-2, HT-29 ve CCD841 CoN hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri

(A: Kontrol grupları, B: IC₅₀ konsantrasyonları uygulanan hücreler, 40X)

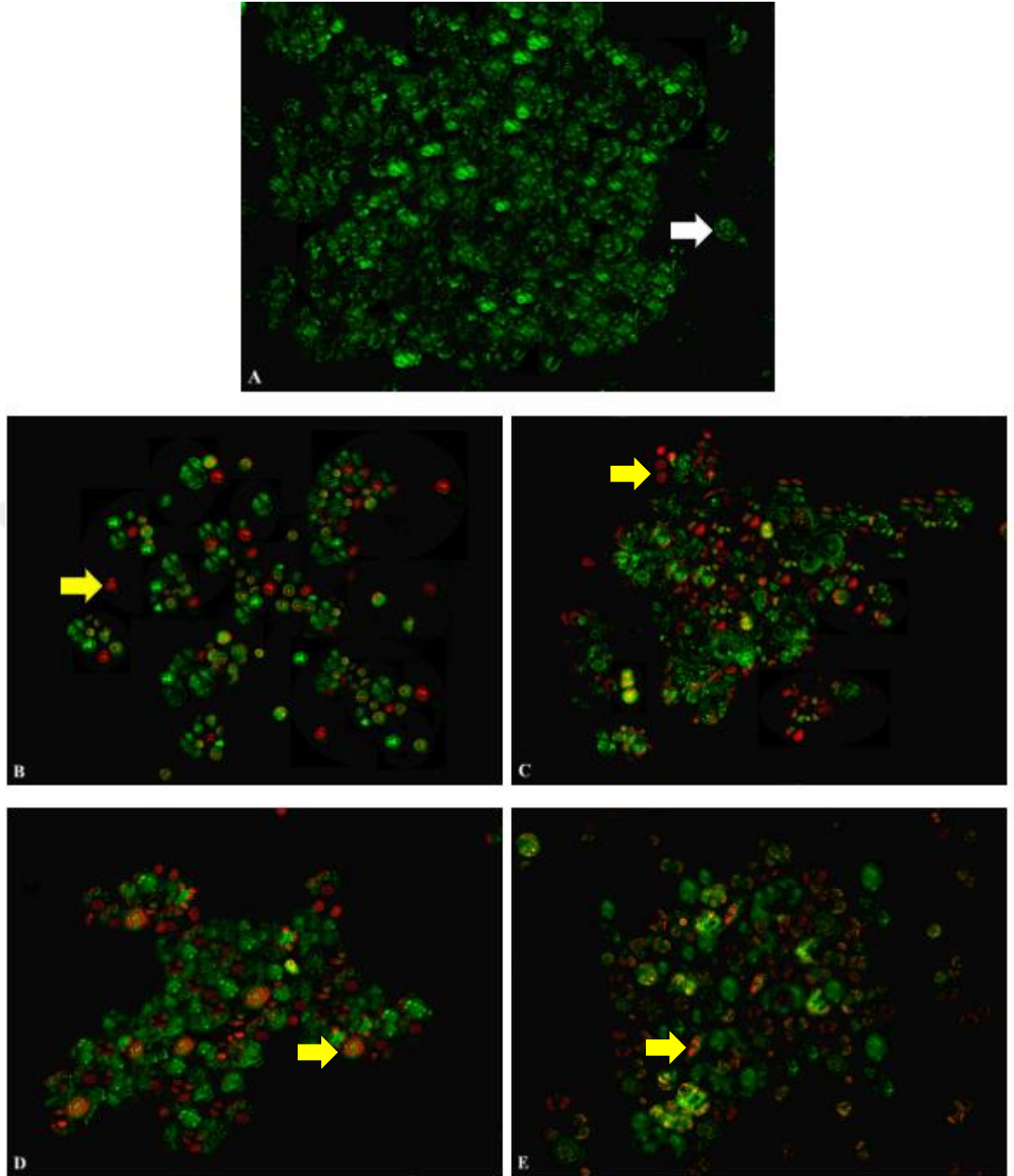
Hücrelerin apoptotik ve/veya nekrotik yoldan ölümlerini nükleus şekli ve boyanma özelliklerine dayanarak incelemek amacıyla, hücreler canlı ve inaktif bakteri süpernatantlarının uygulamasını takiben 20 µl AO/PI ile boyandı ve floresan mikroskopta fotoğraflandı. HT-29, Caco-2 ve CCD 841 CoN hücrelerinde büzülme ve kondensasyon gibi nükleus morfolojisindeki değişiklikler ile nekrotik hücre ölümü gibi sitolojik etkiler araştırıldı. Yeşil floresan ışık veren hücreler AO ile boyanan canlı hücreler (beyaz ok), turuncu/kırmızı floresan ışık veren hücreler ise PI ile boyanan apoptotik hücrelerdir (sarı ok). Probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde apoptoza uğrayan hücre sayısının, kontrol hücrelerine kıyasla yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16). Ayrıca, HT-29, Caco-2 ve CCD 841 CoN hücrelerinin canlı ve inaktif süpernatantlarla muamelesi sonrasında apoptotik hücre popülasyonlarının yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulguların MTT testinden elde edilen sonuçları desteklediği tespit edildi.

Hücresiz süpernatantların HT-29 ve Caco-2 hücreleri için belirlen IC₅₀ değerlerinin insan sağlıklı embriyonik kolon epitel hücresi olan CCD 841 CoN hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği ortaya konuldu (Şekil 4.17).



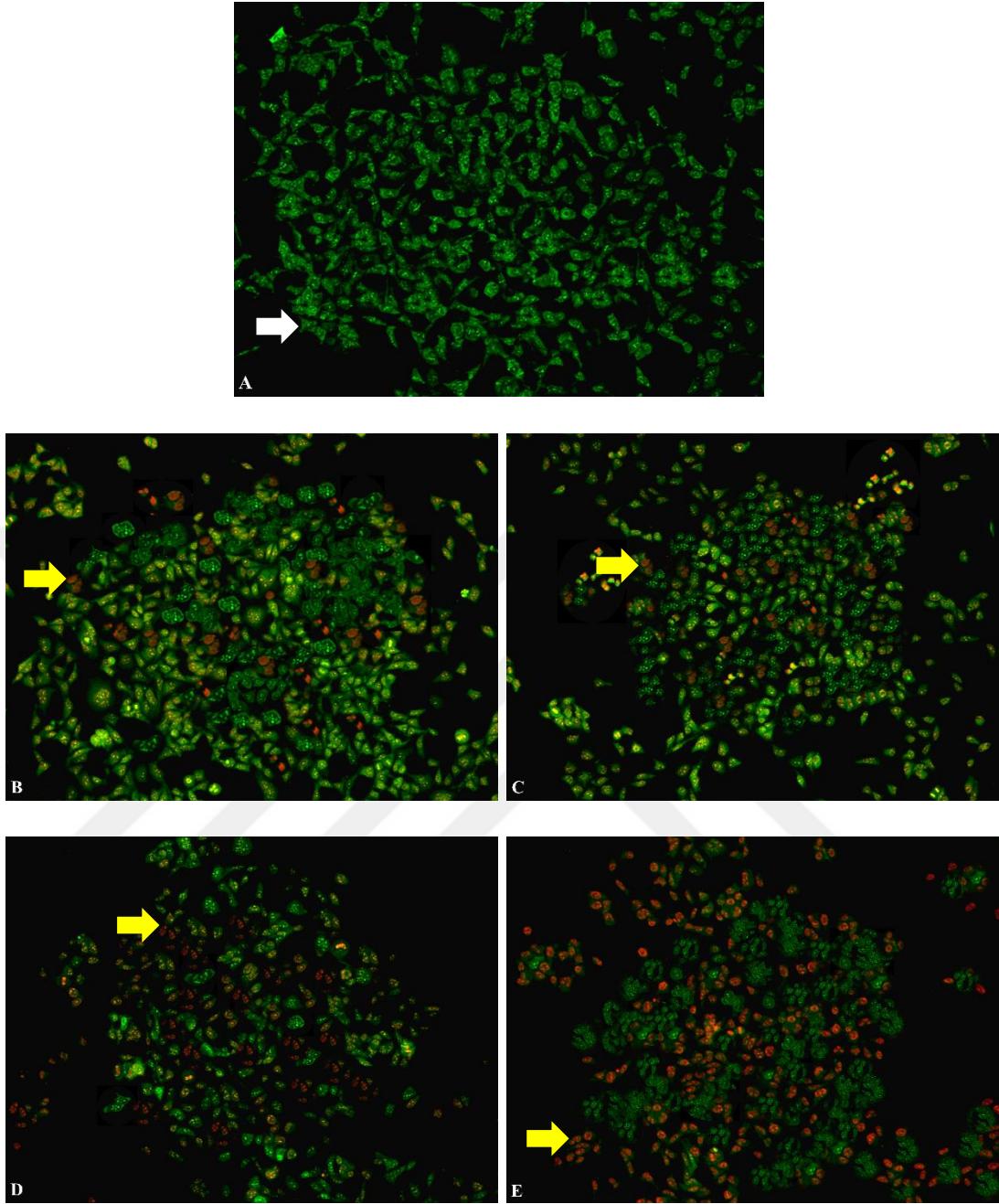
Şekil 4. 14. HT-29 hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)

A) Kontrol B) *L. bulgaricus* canlı, C) *L. bulgaricus* inaktif, D) *L. paracasei* canlı E) *L. paracasei* inaktif (beyaz ok: canlı hücreler, sarı ok: apoptotik hücreler)



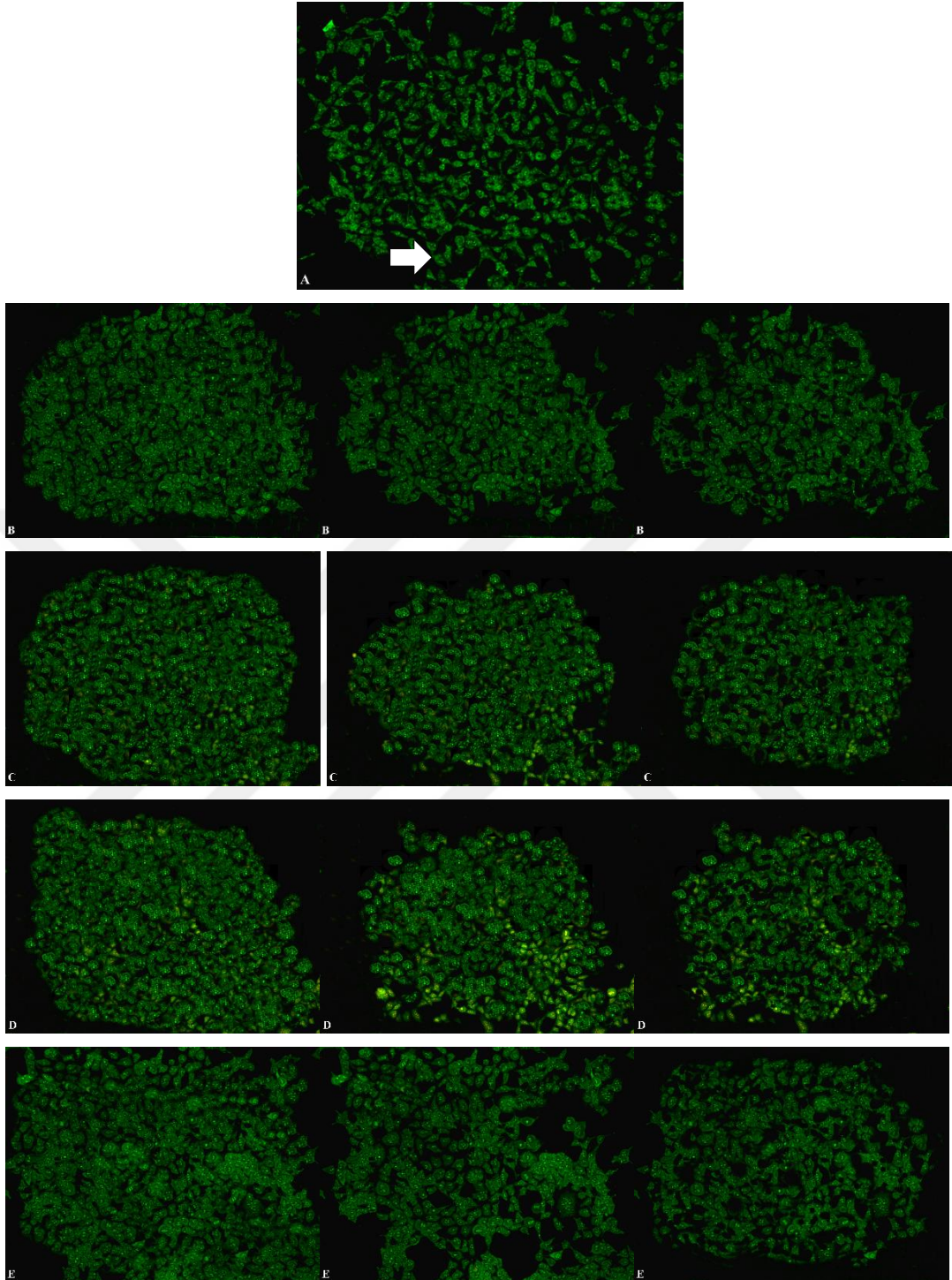
Şekil 4. 15. Caco-2 hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC_{50} konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)

A) Kontrol B) *L. bulgaricus* canlı, C) *L. bulgaricus* inaktif, D) *L. paracasei* canlı E) *L. paracasei* inaktif (beyaz ok: canlı hücreler, sarı ok: apoptotik hücreler)



Şekil 4. 16. CCD841 CoN hücrelerinde probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X).

A) Kontrol B) *L. bulgaricus* canlı, C) *L. bulgaricus* inaktif, D) *L. paracasei* canlı E) *L. paracasei* inaktif (beyaz ok: canlı hücreler, sarı ok: apoptotik hücreler)



Şekil 4. 17. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde belirlenen IC₅₀ dozlarının, CCD 841 CoN hücrelerinde uygulandığı floresan mikroskop görüntüsü (20X)

A) Kontrol B) *L.bulgaricus* canlı, C) *L. bulgaricus* inaktif, D) *L. paracasei* canlı E) *L. paracasei* inaktif (beyaz ok: canlı hücreler)

4.5. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları

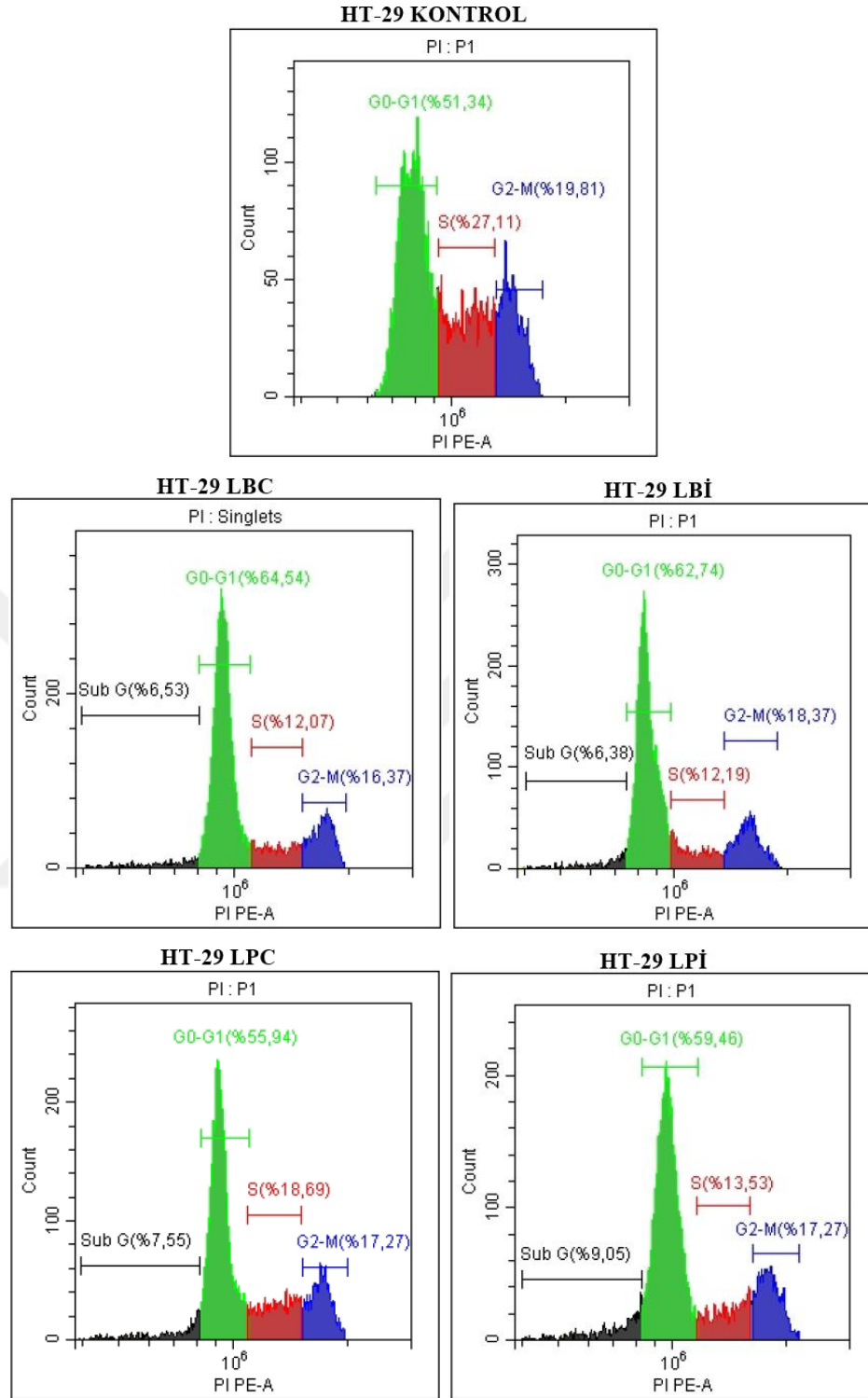
L. bulgaricus ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücreleri temelinde PI boyama prosedürü kullanılarak akım sitometre cihazında hücre döngüsü analizleri gerçekleştirildi. Akım sitometre cihazında (DxFLEX B4-R2-V3 Flow Cytometer Autoloader) yapılan her analizde, 1×10^4 hücre değerlendirildi ve hücrelerin döngünün hangi evresinde olduğu, CytExpert DxFLEX yazılımı kullanılarak belirlendi. Hücre döngüsünün Sub G, G0/G1, S, G2/M evrelerindeki hücre oranlarının yüzde (%) dağılımı değerlendirildi. Her çalışma üç kez tekrar edildi.

HT-29 hücrelerine herhangi bir probiyotik bakteri CFS' sinin uygulanmadığı kontrol grubunda Sub G, G0/G1, S ve G2/M fazlarında hücre oranları sırasıyla %0, %51,63±0,34, %27,25±0,69 ve %19,49±0,72 olarak tespit edildi. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde 24 saat sonra ise hücre döngüsü fazlarında değişiklikler gözlemlendi. Yapılan PI tabanlı akış sitometri analizine göre *L. bulgaricus* canlı hücresiz süpernatantları uygulanan HT-29 hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarında hücre oranları sırasıyla %6,8±0,24, %64,65±0,31, %12,24±0,69, %16,41±0,58 olarak belirlendi. *L. paracasei* canlı uygulanan hücrelerde ise hücre oranları sırasıyla %7,67±0,3, %55,6±0,65, %18,52±0,58, %17,36±0,6 olarak bulundu. *L. bulgaricus* inaktif hücresiz süpernatantları uygulanan HT-29 hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarında hücre oranları sırasıyla %6,56±0,25, %62,73±0,28, %12,49±0,75, %18,38±0,61 olarak belirlendi. *L. paracasei* inaktif uygulanan hücrelerde ise sırasıyla %9,02±0,15, %59,4±0,63, %13,44±0,6 ve %17,37±0,58 olarak tespit edildi.

Hücre döngüsü analizine göre, kontrol grubu ile kıyaslandığında CFS' lerin IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinin G0-G1 evresinde *L. bulgaricus* canlı %13,02 ve inaktif %11,1; *L. paracasei* canlı %3,97 ve inaktif %7,77 artarak arreste (birikim) sebep olduğu analiz edildi. Ayrıca hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde Sub G hücre oranını yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrole göre yapılan karşılaştırmada, Sub G ve G0-G1 evrelerinin yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Tablo 4.1).

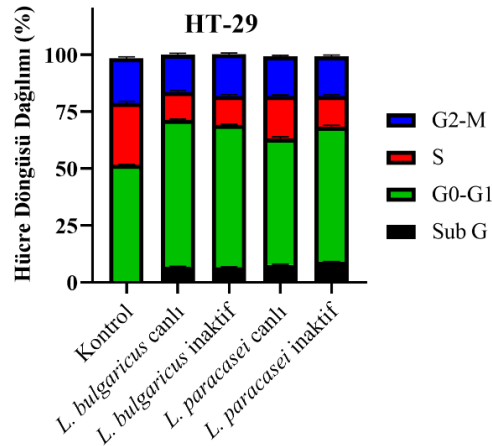
Kontrol grubu ile kıyaslandığında CFS'lerin IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinin S evresinde *L. bulgaricus* canlı %15,01 ve inaktif %14,76; canlı *L. paracasei* %8,73 ve inaktif %10,81 azalma gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte yine kontrol grubu ile kıyaslandığında hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinin G2-M evresini canlı *L. bulgaricus* %3,08 ve %1,11 inaktif; *L. paracasei* %2,13 (canlı) ve %2,12 (inaktif) azalttığı değerlendirildi. Kontrole göre yapılan karşılaştırmalarda, S ve G2-M evrelerindeki yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Tablo 4.1)





Şekil 4. 18. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hüresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri

(LBC: *L. bulgaricus* canlı, LBİ: *L. bulgaricus* inaktif, LPC: *L. paracasei* canlı, LPİ: *L. paracasei* inaktif)



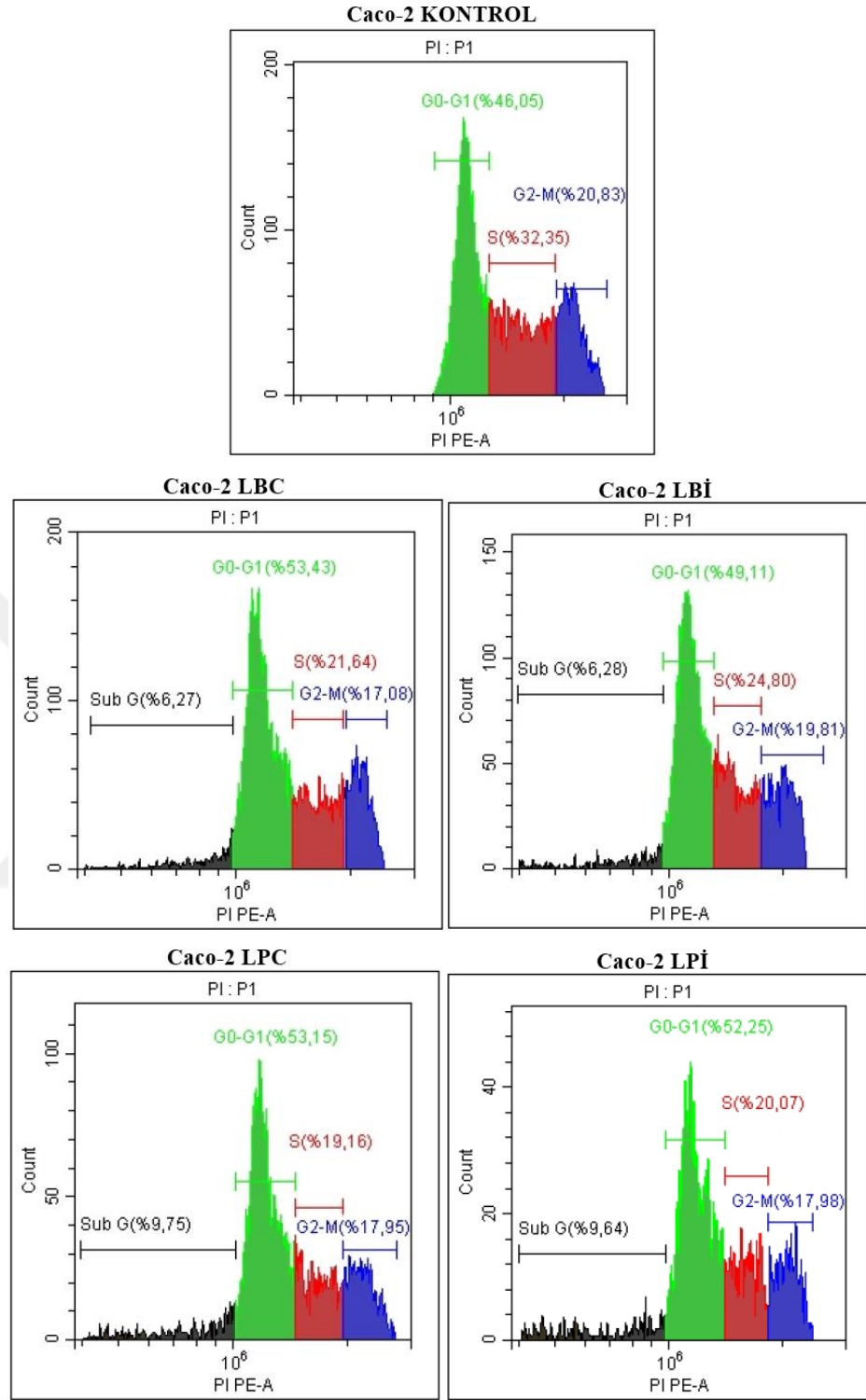
Şekil 4. 19. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29 hücre gruplarında dağılımın % grafiği

Tablo 4. 1. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29 hücre döngüsü üzerine kontrole göre gösteren akış sitometri sonuçları

Hücre Döngüsü Evreleri	Uygulama Grubu	Ortalama (%)	Standart Sapma (±SD)	p Değeri
Sub G	Kontrol	0	0	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	6,8	0,24	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	6,56	0,25	
	<i>L. paracasei</i> canlı	7,67	0,3	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	9,02	0,15	
G0-G1	Kontrol	51,63	0,34	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	64,65	0,31	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	62,73	0,28	
	<i>L. paracasei</i> canlı	55,6	0,65	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	59,4	0,63	
S	Kontrol	27,25	0,69	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	12,24	0,69	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	12,49	0,75	
	<i>L. paracasei</i> canlı	18,52	0,58	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	13,44	0,61	
G2-M	Kontrol	19,49	0,72	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	16,41	0,58	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	18,38	0,61	0,0436
	<i>L. paracasei</i> canlı	17,36	0,6	<0,0001
	<i>L. paracasei</i> inaktif	17,37	0,58	

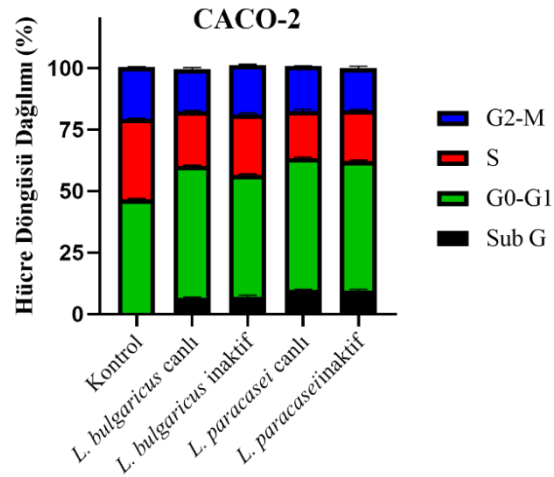
Caco-2 hücreleri üzerine herhangi bir probiyotik bakteri CFS' sinin uygulanmadığı kontrol grubunda Sub G, G0/G1, S ve G2/M fazlarında hücre oranları sırasıyla %0, %46,6±0,49, %32,73±0,34 ve %21,03±0,22 olarak belirlendi. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile yapılan 24 saatlik muamele sonrasında hücre döngüsü fazlarında değişimler gözlemlendi. Yapılan PI tabanlı akış sitometri analizine göre *L. bulgaricus* canlı hücresiz süpernatantları uygulanan Caco-2 hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarında hücre oranları sırasıyla %6,59±0,37, %53,61±0,34, %22,11±0,69, %17,26±0,67 olarak, *L. paracasei* canlı uygulanan hücrelerde ise sırasıyla %9,73±0,28, %53,64±0,44, %19,31±0,63, %18,06±0,16 olarak bulundu. *L. bulgaricus* inaktif CFS uygulanan Caco-2 hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarındaki hücre oranları sırasıyla %7,01±0,64, %49,59±0,45, %24,55±0,61, %20,09±0,33 olarak, *L. paracasei* inaktif uygulanan hücrelerde ise sırasıyla %9,6±0,43, %52,66±0,38, %20,51±0,47, %17,24±0,77 olarak tespit edildi (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Tablo 4.2). Hücre döngüsü analizine göre kontrol grubu ile kıyaslandığında CFS' lerin IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen Caco-2 hücrelerinin G0-G1 evresinde *L. bulgaricus* canlı %7,01 ve inaktif %2,99; *L. paracasei* canlı %7,04 ve inaktif %6,02 artarak arreste (birikime) sebep olduğu analiz edildi. Ayrıca hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen Caco-2 hücrelerinde Sub G hücre oranını yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrole göre yapılan karşılaştırmada, Sub G ve G0-G1 evrelerinin yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen Caco-2 hücrelerinin S evresinde *L. bulgaricus* canlı %10,62 ve inaktif %8,18; *L. paracasei* canlı %13,42 ve inaktif %12,22 azalttığı tespit edildi. Ayrıca G2-M evresinde, *L. bulgaricus* canlı %3,77 ve inaktif %0,94; *L. paracasei* canlı %2,97 ve inaktif %3,79 azalttığı değerlendirildi. Kontrol ile yapılan karşılaştırmada, S ve G2-M evrelerindeki yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Tablo 4.2).



Şekil 4. 20. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri

(LBC: *L. bulgaricus* canlı, LBİ: *L. bulgaricus* inaktif, LPC: *L. paracasei* canlı, LPİ: *L. paracasei* inaktif)

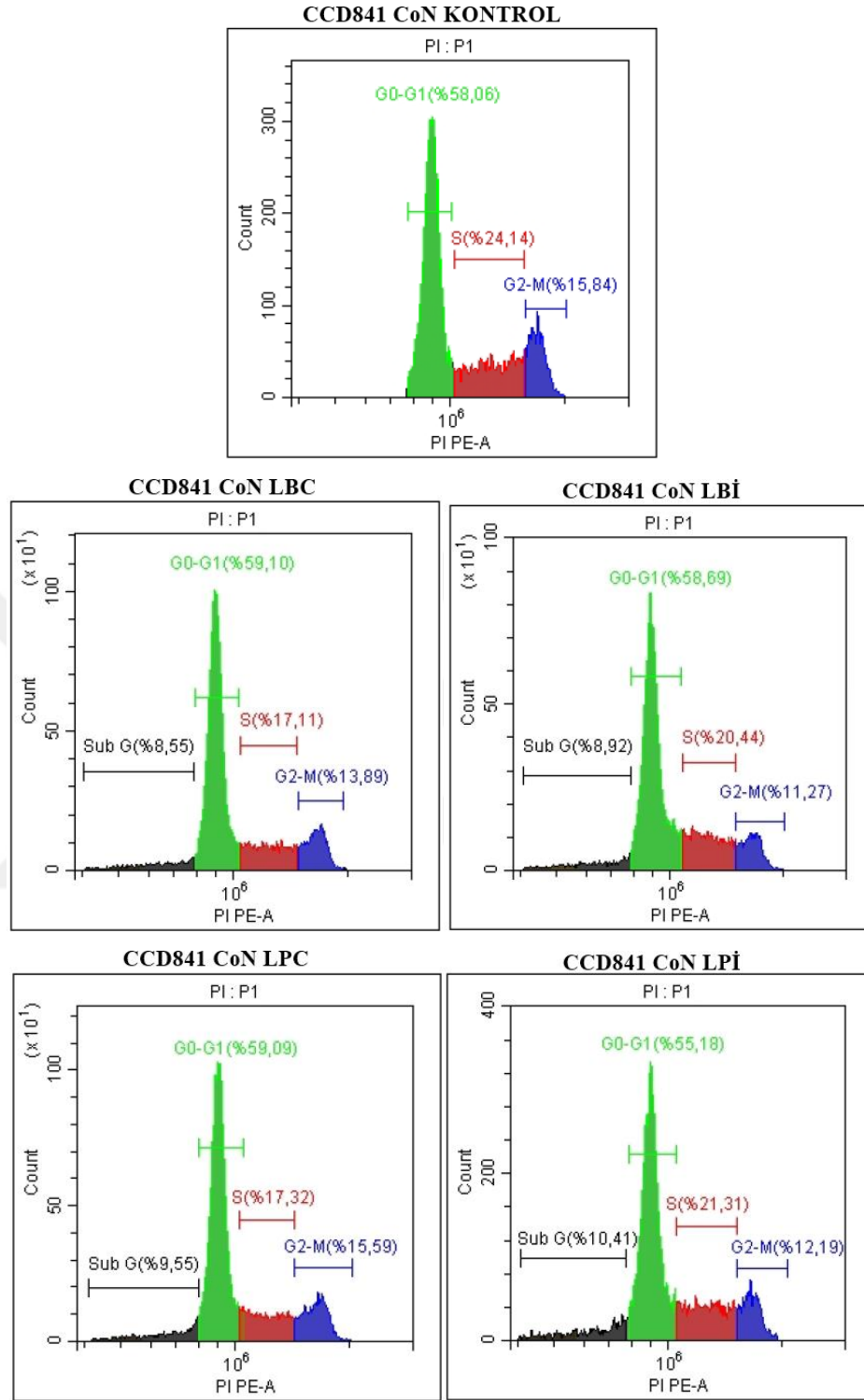


Şekil 4. 21. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre gruplarında dağılımın % grafiği

Tablo 4.2. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının Caco-2 hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri sonuçları

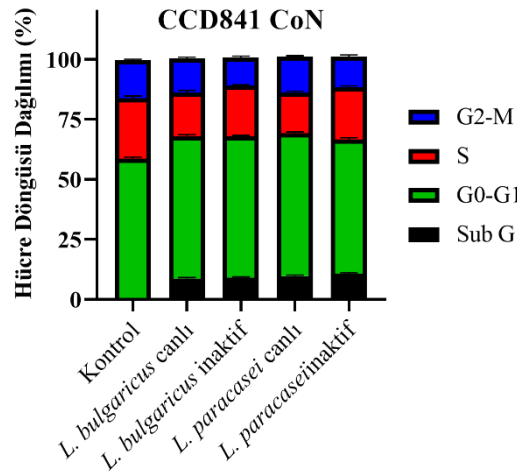
Hücre Döngüsü Evreleri	Uygulama Grubu	Ortalama (%)	Standart Sapma (±SD)	P Değeri
Sub G	Kontrol	0	0	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	6,59	0,37	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	7,01	0,64	
	<i>L. paracasei</i> canlı	9,73	0,28	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	9,6	0,43	
G0-G1	Kontrol	46,6	0,49	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	53,61	0,34	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	49,59	0,45	
	<i>L. paracasei</i> canlı	53,64	0,44	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	52,66	0,38	
S	Kontrol	32,73	0,34	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	22,11	0,54	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	24,55	0,61	
	<i>L. paracasei</i> canlı	19,31	0,63	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	20,51	0,47	
G2-M	Kontrol	21,03	0,22	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	17,26	0,67	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	20,09	0,33	0,0558
	<i>L. paracasei</i> canlı	18,06	0,16	<0,0001
	<i>L. paracasei</i> inaktif	17,24	0,77	

CCD841 CoN hücreleri üzerine herhangi bir probiyotik bakteri CFS' sinin uygulanmadığı kontrol grubunda Sub G, G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre oranları sırasıyla %0, %58,67±0,54, %25,24±0,93 ve %15,83±0,41 olarak belirlendi. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile yapılan 24 saatlik muamele sonrasında hücre döngüsü fazlarında değişiklikler tespit edildi. Yapılan PI tabanlı akış sitometri analizine göre, *L. bulgaricus* canlı hücresiz süpernatantları uygulanan CCD841 CoN hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarındaki hücre oranları sırasıyla %8,63±0,46, %59,37±0,69, %18,14±0,91, %14,33±0,48 olarak, *L. paracasei* canlı uygulanan hücrelerde ise sırasıyla %9,65±0,44, %59,6±0,53, %17,85±0,53, %15,88±0,31 olarak bulundu. *L. bulgaricus* inaktif hücresiz süpernatantları uygulanan CCD841 CoN hücrelerinde Sub G, G0/G1, S, G2/M fazlarındaki hücre oranları sırasıyla %9,03±0,31, %58,98±0,29, %20,95±0,52, %11,82±0,57 olarak, *L. paracasei* inaktif uygulanan hücrelerde ise sırasıyla %10,58±0,46, %55,97±0,84, %21,83±0,62, %12,84±0,6 olarak tespit edildi (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Tablo 4.3). Hücre döngüsü analizine göre kontrol grubu ile kıyaslandığında hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen CCD841 CoN hücrelerinin G0-G1 evresinde *L. bulgaricus* canlı %0,7 ve inaktif %0,31; *L. paracasei* canlı %0,93 ve inaktif %1,3 artarak arreste (birikime) sebep olduğu analiz edildi. Ayrıca hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen CCD841 CoN hücrelerinde Sub G hücre oranını yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrole göre karşılaştırılması yapılan CCD841 CoN hücrelerinde Sub G ve G0-G1 evrelerinin yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen CCD841 CoN hücrelerinin S evresinde *L. bulgaricus* canlı %7 ve inaktif %4,19; *L. paracasei* canlı %7,29 ve inaktif %3,31 azalttığı tespit edildi. Bununla birlikte yine kontrol grubu ile kıyaslandığında hücresiz süpernatantların IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen CCD841 CoN hücrelerinin G2-M evresinde *L. bulgaricus* %1,5 (canlı) ve %4,01(inaktif); *L. paracasei* %0,03 (canlı) ve %2,99 (inaktif) azalttığı değerlendirildi. Kontrol ile yapılan karşılaştırmada, S ve G2-M evrelerindeki yüzde değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Tablo 4.3).



Şekil 4. 22. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hüresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri görüntüleri

(LBC: *L. bulgaricus* canlı, LBİ: *L. bulgaricus* inaktif, LPC: *L. paracasei* canlı, LPİ: *L. paracasei* inaktif)



Şekil 4. 23. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre gruplarında dağılımın % grafiği

Tablo 4.3. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının CCD841 CoN hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren akış sitometri sonuçları

Hücre Döngüsü Evreleri	Uygulama Grubu	Ortalama (%)	Standart Sapma (±SD)	P Değeri
Sub G	Kontrol	0	0	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	8,63	0,46	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	9,03	0,31	
	<i>L. paracasei</i> canlı	9,65	0,44	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	10,58	0,46	
G0-G1	Kontrol	58,67	0,54	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	59,37	0,69	0,3731
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	58,98	0,29	0,9038
	<i>L. paracasei</i> canlı	59,6	0,53	0,1533
	<i>L. paracasei</i> inaktif	59,97	0,84	<0,0001
S	Kontrol	25,14	0,93	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	18,14	0,91	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	20,95	0,52	
	<i>L. paracasei</i> canlı	17,85	0,53	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	21,83	0,62	
G2-M	Kontrol	15,83	0,41	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	14,33	0,48	0,0079
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	11,82	0,57	<0,0001
	<i>L. paracasei</i> canlı	15,8	0,31	0,9999
	<i>L. paracasei</i> inaktif	12,84	0,6	<0,0001

4.6. Gen İfadesi Analiz Sonuçları

Sitotoksosite, hücre döngüsü ve floresan boyama testlerinden elde edilen bulgular doğrultusunda, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantları ile belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücre hatlarına 24 saat uygulandı. Bu uygulama sonrasında Bax, Cas 9, Cas 8, Cas 3 ve Bcl-2 genlerinin ifade düzeyleri, RT-qPCR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda, gen ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler tespit edildi ve bu değişimlerin süpernatantların sitotoksik etkileri ile ilişkili olduğu gözlemlendi.

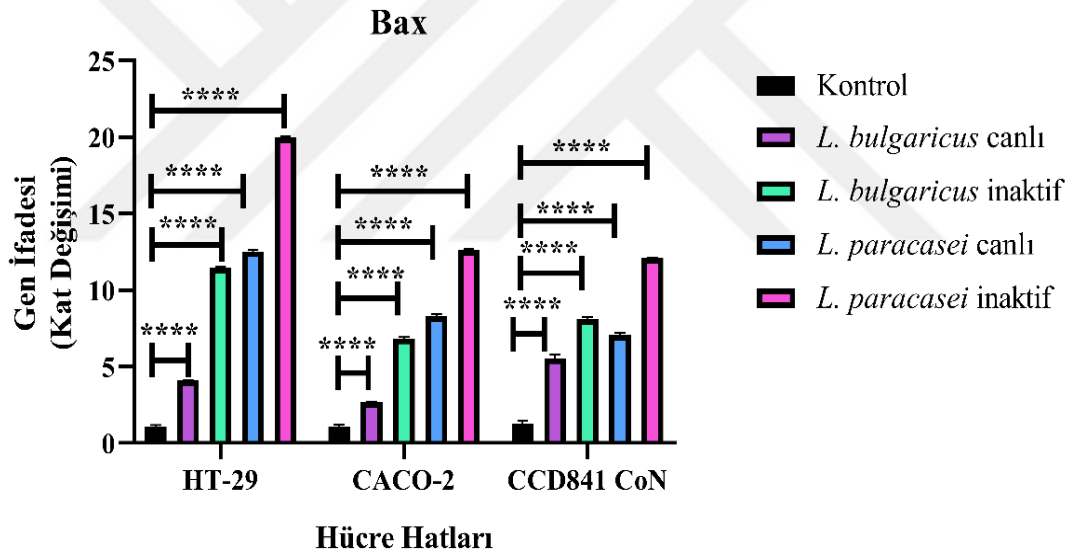
4.6.1. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Bax Gen İfadesi Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda Bax gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.24, Tablo 4. 4). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin bir şekilde sağladığı tespit edildi. Kontrol grubunda Bax gen ifadesinin kat değişim değeri $1,07 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $4,09 \pm 0,04$ kat, inaktif grupta ise $11,45 \pm 0,06$ kat daha fazla Bax geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $2,54 \pm 0,07$ kat, inaktif grupta ise $19,99 \pm 0,05$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 4). Bu bulgular, süpernatantların Bax gen ifadesi üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla uygulanan tüm gruplarda Bax gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.24, Tablo 4. 4). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,09 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $2,69 \pm 0,03$ kat, inaktif grupta ise $6,85 \pm 0,08$ kat daha fazla Bax geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $8,33 \pm 0,11$ kat, inaktif grupta ise $12,64 \pm 0,02$ kat artışa

neden olduğu belirlendi (Tablo 4.4). Bu sonuçlar, inaktif süpernatantların Bax gen ifadesini artırmada daha etkili olduğunu göstermektedir.

CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Bax gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 4.24, Tablo 4. 4). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,24\pm0,24$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $5,54\pm0,26$ kat, inaktif grupta ise $8,10\pm0,15$ kat daha fazla Bax geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $7,09\pm0,11$ kat, inaktif grupta ise $12,12\pm0,02$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 4). Bu bulgular, inaktif süpernatantların Bax gen ifadesini artırmada daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 24. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki BAX geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği

Tablo 4.4. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki BAX geninin kat değişimleri ve *p* değerleri

Bax	Uygulama Grubu	Kat Değişimleri		<i>p</i> Değeri
		Ortalama (%)	Standart Sapma (±SD)	
HT-29	Kontrol	1,07	0,11	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	4,09	0,04	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	11,45	0,06	
	<i>L. paracasei</i> canlı	12,54	0,07	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	19,99	0,05	
CACO-2	Kontrol	1,09	0,11	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	2,69	0,03	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	6,85	0,08	
	<i>L. paracasei</i> canlı	8,33	0,11	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	12,64	0,02	
CCD841 CoN	Kontrol	1,24	0,24	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	5,54	0,26	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	8,10	0,15	
	<i>L. paracasei</i> canlı	7,09	0,11	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	12,12	0,02	

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* CFS'lerinin HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücrelerinde Bax geninin ifadesinde anlamlı bir artışa yol açtığını gösterdi. Her iki bakterinin de inaktif formlarının, canlı formlarına kıyasla Bax gen ifadesinde daha belirgin bir artış sağladığı tespit edildi. Bu bulgular, inaktif hücresiz süpernatantların apoptotik süreçleri tetikleme potansiyelinin daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

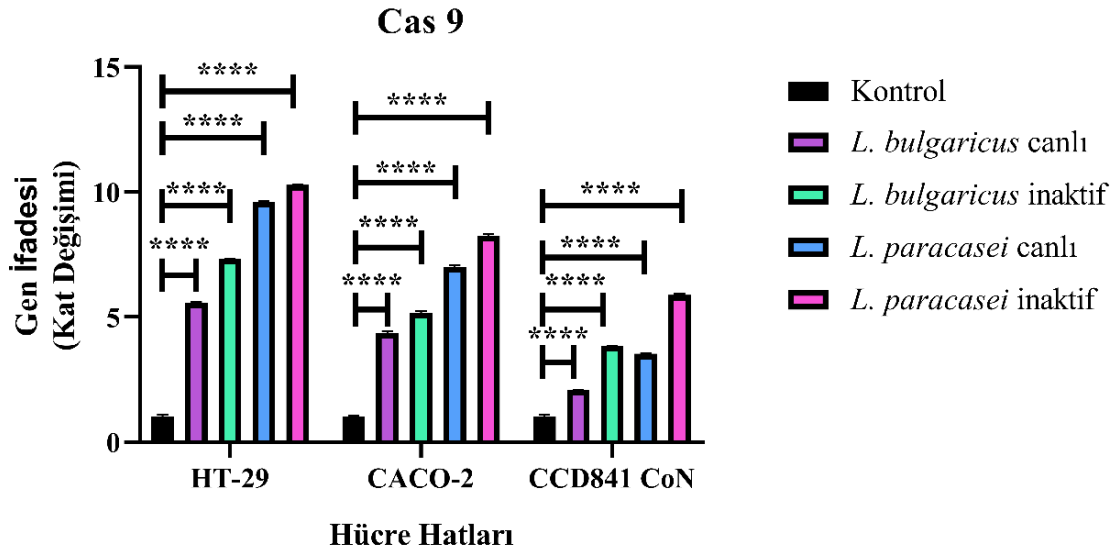
4.6.2. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 9 Gen İfadesi Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 9 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.25, Tablo 4. 5). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin bir şekilde sağladığı tespit edildi. HT-29 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,03 \pm 0,08$

olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $5,58 \pm 0,03$ kat, inaktif grupta ise $7,32 \pm 0,01$ kat daha fazla Cas 9 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $9,60 \pm 0,04$ kat, inaktif grupta ise $10,28 \pm 0,01$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 5).

Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla uygulanan tüm gruplarda Cas 9 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.25, Tablo 4. 5). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,01 \pm 0,06$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $4,35 \pm 0,07$ kat, inaktif grupta ise $5,15 \pm 0,05$ kat daha fazla Cas 9 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $7,01 \pm 0,08$ kat, inaktif grupta ise $8,26 \pm 0,06$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4.5).

CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 9 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.25, Tablo 4. 5). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,02 \pm 0,07$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $2,09 \pm 0,00$ kat, inaktif grupta ise $3,83 \pm 0,01$ kat daha fazla Cas 9 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $3,53 \pm 0,01$ kat, inaktif grupta ise $5,88 \pm 0,04$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 5).



Şekil 4. 25. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 9 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği

Tablo 4. 5. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 9 geninin kat değişimleri ve *p* değerleri

Cas 9	Uygulama Grubu	Kat Değişimleri		<i>p</i> Değeri
		Ortalama	Standart Sapma	
Hücre Hatları		(%)	(±SD)	
HT-29	Kontrol	1,03	0,08	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	5,58	0,03	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	7,32	0,01	
	<i>L. paracasei</i> canlı	9,60	0,04	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	10,28	0,01	
CACO-2	Kontrol	1,01	0,06	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	4,35	0,07	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	5,15	0,05	
	<i>L. paracasei</i> canlı	7,01	0,08	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	8,26	0,06	
CCD841 CoN	Kontrol	1,02	0,07	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	2,09	0,00	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	3,83	0,01	
	<i>L. paracasei</i> canlı	3,53	0,01	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	5,88	0,04	

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* CFS'lerin HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücrelerinde Cas 9 geninin ifadesinde anlamlı bir artışa yol açtığı görüldü. Her iki bakterinin de inaktif formları, canlı formlarına kıyasla Cas 9 gen ifadesinde daha belirgin bir artış sağladı. Bu sonuçlar, inaktif hücresiz süpernatantların apoptotik süreçleri daha güçlü bir şekilde tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

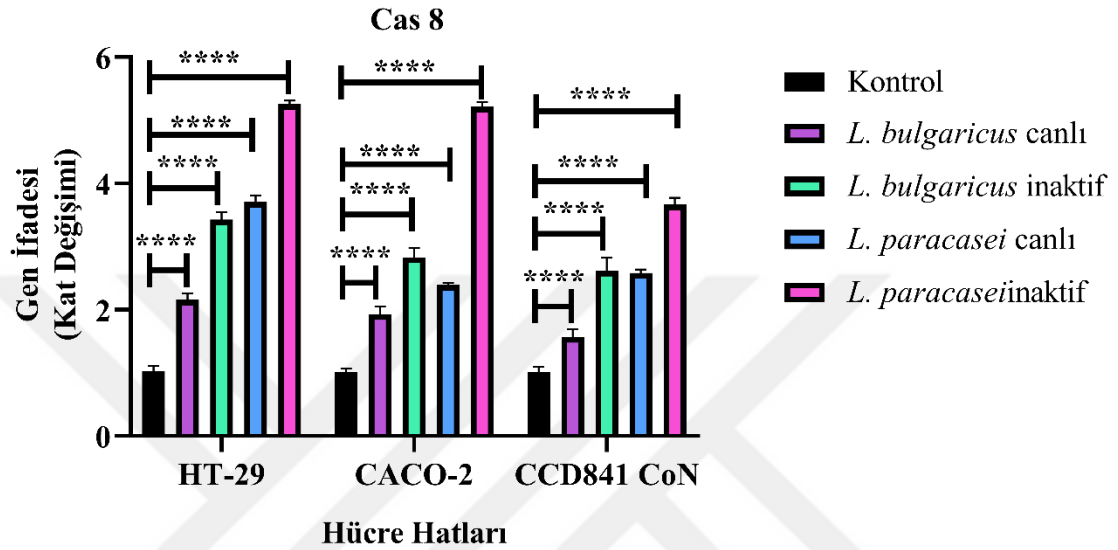
4.6.3. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 8 Gen İfadesi Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 8 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.26, Tablo 4. 6). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin bir şekilde sağladığı tespit edildi. HT-29 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,03 \pm 0,08$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $2,16 \pm 0,10$ kat, inaktif grupta ise $3,43 \pm 0,12$ kat daha fazla Cas 8 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $3,71 \pm 0,10$ kat, inaktif grupta ise $5,26 \pm 0,05$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 6).

Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 8 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.26, Tablo 4. 6). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,01 \pm 0,06$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $1,93 \pm 0,12$ kat, inaktif grupta ise $2,83 \pm 0,15$ kat daha fazla Cas 8 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $2,39 \pm 0,03$ kat, inaktif grupta ise $5,22 \pm 0,08$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4.6).

CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 8 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.26, Tablo 4. 6). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim

değeri $1,02 \pm 0,08$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $1,57 \pm 0,13$ kat, inaktif grupta ise $2,62 \pm 0,21$ kat daha fazla Cas 8 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $2,58 \pm 0,06$ kat, inaktif grupta ise $3,67 \pm 0,10$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 6).



Şekil 4. 26. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 8 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği

Tablo 4. 6. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 8 geninin kat değişimleri ve *p* değerleri

Cas 8	Uygulama Grubu	Kat Değişimleri		<i>p</i> Değeri
		Ortalama	Standart Sapma	
Hücre Hatları		(%)	(±SD)	
HT-29	Kontrol	1,03	0,08	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	2,16	0,10	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	3,43	0,12	
	<i>L. paracasei</i> canlı	3,71	0,10	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	5,26	0,05	
CACO-2	Kontrol	1,01	0,06	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	1,93	0,12	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	2,83	0,15	
	<i>L. paracasei</i> canlı	2,39	0,03	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	5,22	0,08	
CCD841 CoN	Kontrol	1,02	0,08	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	1,57	0,13	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	2,62	0,21	
	<i>L. paracasei</i> canlı	2,58	0,06	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	3,67	0,10	

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bakılarak *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* hücresiz süpernatantlarının HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücrelerinde Cas 8 geninin ifadesinde anlamlı bir artışa yol açtığı görüldü. Her iki bakterinin de inaktif formları, canlı formlarına kıyasla Cas 8 gen ifadesinde daha belirgin bir artış sağladı. Bu sonuçlar, inaktif hücresiz süpernatantların apoptotik süreçleri daha fazla tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

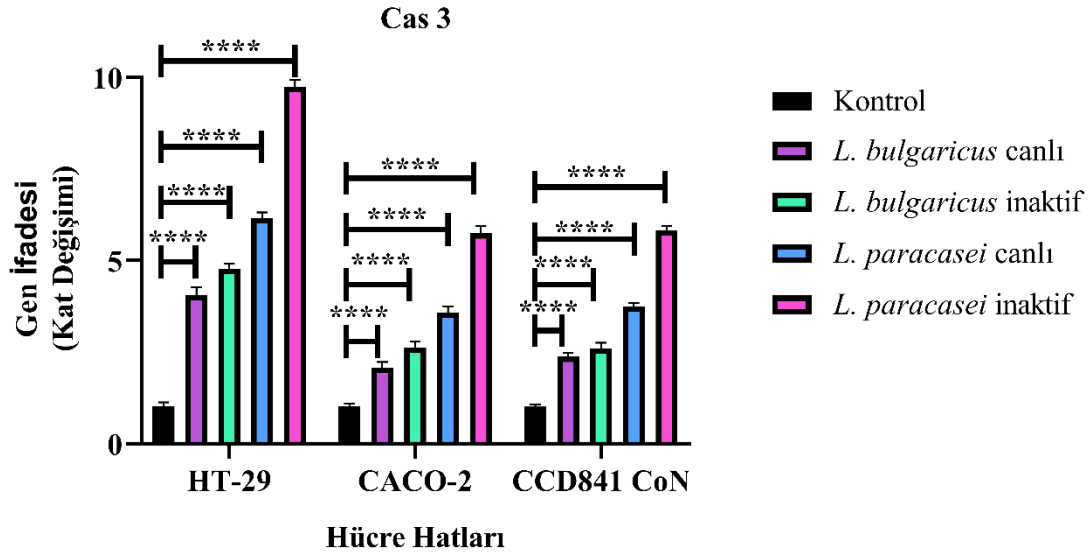
4.6.4. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Cas 3 Gen İfadesi Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.27, Tablo 4. 7). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin bir şekilde sağladığı tespit edildi. HT-29 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,02 \pm 0,11$

olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $4,06 \pm 0,21$ kat, inaktif grupta ise $4,77 \pm 0,15$ kat daha fazla Cas 3 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $6,16 \pm 0,16$ kat, inaktif grupta ise $9,74 \pm 0,19$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 7).

Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.27, Tablo 4. 7). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,02 \pm 0,08$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $2,07 \pm 0,16$ kat, inaktif grupta ise $2,63 \pm 0,15$ kat daha fazla Cas 3 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $2,58 \pm 0,15$ kat, inaktif grupta ise $5,75 \pm 0,20$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4.7).

CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Cas 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.27, Tablo 4. 7). Özellikle inaktif formların bu artışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,01 \pm 0,05$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $2,38 \pm 0,10$ kat, inaktif grupta ise $2,61 \pm 0,15$ kat daha fazla Cas 3 geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $3,75 \pm 0,09$ kat, inaktif grupta ise $5,83 \pm 0,11$ kat artışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 7).



Şekil 4. 27. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Cas 3 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği

Tablo 4. 7. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Cas 3 geninin kat değişimleri ve p değerleri

Cas 3	Uygulama Grubu	Kat Değişimleri		p Değeri
		Ortalama (%)	Standart Sapma (±SD)	
HT-29	Kontrol	1,02	0,11	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	4,06	0,21	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	4,77	0,15	
	<i>L. paracasei</i> canlı	6,16	0,16	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	9,74	0,19	
CACO-2	Kontrol	1,02	0,08	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	2,07	0,16	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	2,63	0,15	
	<i>L. paracasei</i> canlı	3,58	0,15	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	5,75	0,20	
CCD841 CoN	Kontrol	1,01	0,05	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	2,38	0,10	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	2,61	0,15	
	<i>L. paracasei</i> canlı	3,75	0,09	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	5,83	0,11	

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bakılarak *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* hücresiz süpernatantlarının HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücrelerinde Cas 3 geninin ifadesinde anlamlı bir artışa yol açtığı görüldü. Her iki bakterinin de inaktif formları, canlı formlarına kıyasla Cas 3 gen ifadesinde daha belirgin bir artış sağladı. Bu sonuçlar, inaktif hücresiz süpernatantların apoptotik süreçleri daha fazla tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

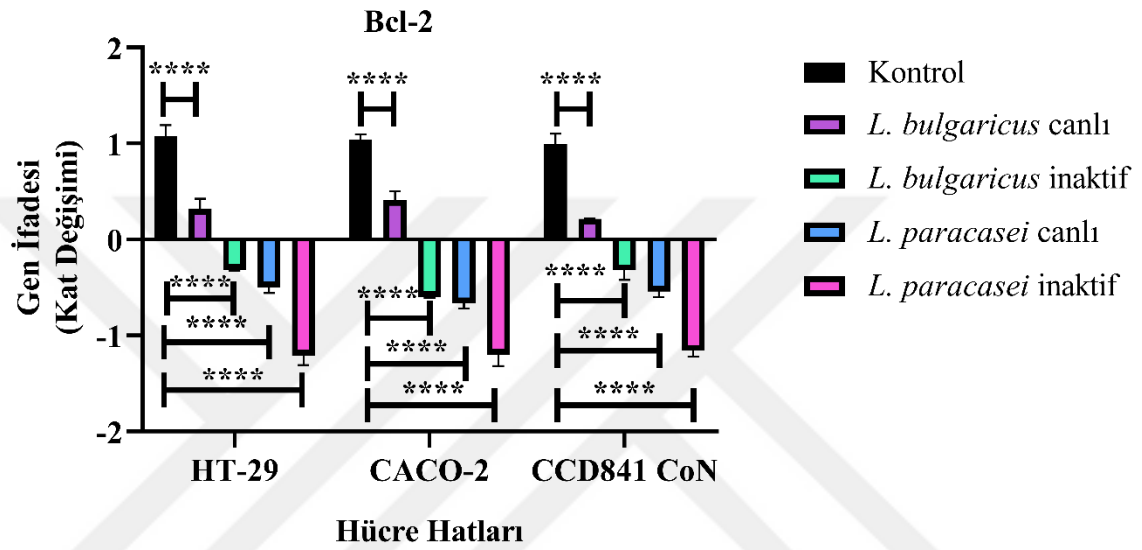
4.6.5. HT-29, Caco-2, CCD 841 CoN Hücrelerinde *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif hücresiz süpernatantlarının Bcl-2 Gen İfadesi Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Bcl-2 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.28, Tablo 4. 8). Özellikle inaktif formların bu azalışı daha belirgin bir şekilde sağladığı tespit edildi. HT-29 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,08 \pm 0,12$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $0,32 \pm 0,11$ kat, inaktif grupta ise $-0,32 \pm 0,01$ kat daha fazla Bcl-2 geninin ifadesinde azalış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $-0,50 \pm 0,06$ kat, inaktif grupta ise $-1,21 \pm 0,10$ kat azalışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 8).

Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Bcl-2 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.28, Tablo 4. 8). Özellikle inaktif formların bu azalışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu için kat değişim değeri $1,04 \pm 0,05$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $0,41 \pm 0,09$ kat, inaktif grupta ise $-0,60 \pm 0,01$ kat daha fazla Bcl-2 geninin ifadesinde azalış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $-0,66 \pm 0,06$ kat, inaktif grupta ise $-1,20 \pm 0,12$ kat azalışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4.8).

CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubuna göre uygulanan tüm grupların Bcl-2 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.28, Tablo 4. 8). Özellikle inaktif formların bu azalışı daha belirgin ve güçlü bir şekilde sağladığı tespit edildi. CCD841-CoN hücrelerinde kontrol grubu için kat

değişim değeri $1,00 \pm 0,10$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda *L. bulgaricus* izolatının uygulandığı canlı grubunda $0,21 \pm 0,01$ kat, inaktif grupta ise $-0,32 \pm 0,10$ kat daha fazla Bcl-2 geninin ifadesinde azalış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre *L. paracasei* canlı grubunda $-0,54 \pm 0,06$ kat, inaktif grupta ise $-1,16 \pm 0,06$ kat azalışa neden olduğu belirlendi (Tablo 4. 8).



Şekil 4. 28. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücrelerindeki Bcl-2 geninin kontrol grubuna göre kat değişim grafiği

Tablo 4. 8. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının canlı ve inaktif süpernatantlarının IC₅₀ uygulamasının HT-29, CACO-2 ve CCD841 CoN hücreleri üzerindeki Bcl-2 geninin kat değişimleri ve p değerleri

Bcl-2	Uygulama Grubu	Kat Değişimleri		p Değeri
		Ortalama	Standart Sapma	
Hücre Hatları		(%)	(±SD)	
HT-29	Kontrol	1,08	0,12	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	0,32	0,11	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	-0,32	0,01	
	<i>L. paracasei</i> canlı	-0,50	0,06	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	-1,21	0,10	
CACO-2	Kontrol	1,04	0,05	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	0,41	0,09	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	-0,60	0,01	
	<i>L. paracasei</i> canlı	-0,66	0,06	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	-1,20	0,12	
CCD841 CoN	Kontrol	1,00	0,10	<0,0001
	<i>L. bulgaricus</i> canlı	0,21	0,01	
	<i>L. bulgaricus</i> inaktif	-0,32	0,10	
	<i>L. paracasei</i> canlı	-0,54	0,06	
	<i>L. paracasei</i> inaktif	-1,16	0,06	

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bakılarak *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* hücresiz süpernatantlarının HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücrelerinde Bcl-2 geninin ifadesinde anlamlı bir azalışa yol açtığı görüldü. Her iki bakterinin de inaktif formları, canlı formlarına kıyasla Bcl-2 gen ifadesinde daha belirgin bir azalış sağladı. Bu sonuçlar, inaktif hücresiz süpernatantların apoptotik süreçleri daha fazla tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya genelinde ölüme neden olan hastalıklar arasında en yaygın ve karmaşık olanlardan biridir. Bu durum, kanseri ciddi bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Geleneksel kanser tedavilerinin, tümör hücrelerini hedef almasının yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verme eğiliminde olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum, tedavi sürecinde çeşitli yan etkilerin ortaya çıkmasına ve hastaların yaşam kalitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Amara ve Shibl, 2015; O’Flaherty, 2023). Bu nedenle, araştırmacılar daha başarılı ve yan etkileri az olan tedavi seçeneklerini geliştirme konusunda yoğun bir çaba sarf etmektedir (Huang ve diğ. 2021). Bu doğrultuda, bilim insanları doğal bileşiklerin ve biyolojik kaynakların kanser tedavisinde terapötik ajan olarak potansiyel kullanımı ile ilgili araştırmalara yönelmişlerdir (Thoda ve Touraki, 2023; Sivamaruthi ve diğ. 2020; Gholizadeh ve diğ. 2024). Son yıllarda probiyotik bakterilerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri ve kanserle mücadeledeki rolleri üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır (Ranjbar ve diğ. 2019; Abouelela ve Helmy 2024).

Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların ürettiği biyoaktif bileşikler, kanser hücrelerini seçici olarak hedefleme özellikleri ve minimal yan etkileri ile giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Bu tür bileşiklerin kanser tedavisindeki etkileri üzerine yapılan araştırmalar, probiyotiklerin potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır (Thoda ve Touraki, 2023; Dimitrovski ve diğ. 2014). Probiyotiklerden elde edilen CFS’lerin içerdikleri biyoaktif bileşikler aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebileceği ve apoptozu indükleyebileceği gösterilmektedir (Huang ve diğ. 2021; Thoda ve Touraki, 2023). Bu biyoaktif bileşikler arasında, peptitler, asitler ve enzimler gibi çeşitli metabolitler bulunmaktadır. Bu bileşiklerin, kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalma mekanizmalarını etkileyerek antikanser etkiler geliştirdiği belirtilmektedir (Ghorbani ve diğ. 2022; Dimitrovski ve diğ. 2014).

Son çalışmalar, bu biyoaktif bileşiklerin kolon kanseri gibi GİS’i etkileyen kanser türleri üzerinde özellikle etkili olduğunu göstermektedir (Sivamaruthi ve diğ. 2020). Özellikle *Lactobacillus* türlerinden elde edilen probiyotik mikroorganizmaların CFS’sinin, kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını azaltma, hücre döngüsünü durdurma ve oksidatif stresi artırma gibi çeşitli antikanser mekanizmalar sergilediği rapor edilmektedir (Amara ve Shibl, 2015; O’Flaherty, 2023).

Bu tez çalışmasında, öncelikle *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* bakterilerinin kültürü yapılmıştır. Bu bakterilerden elde edilen CFS'lerin antikanser etkilerini araştırmak amacıyla kolon kanseri hücre hatları kültüre edilmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, CFS'nin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla MTT deneyi gerçekleştirilmiş ve IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu belirlenen konsantrasyonlarla birlikte, hücre döngüsü analizi yapılarak CFS' nin hücre döngüsünü durdurma potansiyeli incelenmiştir. Böylece kanser hücrelerinin bölünme ve çoğalma süreçleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, floresan boyama yöntemi kullanılarak CFS' nin hücre morfolojileri üzerine etkileri görsel olarak değerlendirilmiştir. Son olarak, gen ifade düzeylerinin belirlenmesiyle biyoaktif bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki moleküler etkileri analiz edilmiştir.

Chuah ve diğ. (2019), *L. plantarum*'un UL4, 1 TL, RS5, RG14, RG11, RI11 suşlarından elde edilen CFS'leri %10, %20 ve %30 konsantrasyonlarında çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (MCF-7, HeLa, HT-29, HEP-G2, K562 ve HL60) incelemişlerdir. Bu araştırma sonuçları, CFS'lerin süspanse kanser hücre hatlarında (HL60 ve K562), adherent kanser hücrelerine (MCF-7, HeLa, Hep-G2 ve HT-29) kıyasla daha güçlü sitotoksik bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Adherent kanser hücreleri arasında ise MCF-7 hücrelerinde *L. plantarum* suşlarından elde edilen tüm CFS'lerin en yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, CFS'lerin MCF-7 hücrelerinin diğer hücre hatlarına göre daha seçici ve güçlü bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle UL4 suşundan elde edilen CFS' nin, 72 saatlik inkübasyonu sonrası %10 (v/v) IC₅₀ konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinde en güçlü sitotoksik etkiyi sergilediğini bulmuşlardır. Bu bulgu, UL4 CFS' sinin düşük dozlarda bile yüksek etkinlik gösterebileceğini ve bu suşun kanser tedavisi için potansiyel bir aday olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, bu çalışma *L. plantarum* suşlarından elde edilen CFS'lerin çeşitli kanser hücre hatlarında etkili sitotoksik özelliklere sahip olduğunu ve bazı hücre tiplerinde daha güçlü inhibitör etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Nowak ve diğ. (2022), 39 adet LAB suşlarından elde edilen CFS ve hücre ekstraktlarının (CE) kolon (Caco-2) ve serviks (HeLa) kanser hücre hatları ile normal bağırsak (IEC-6) hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri karşılaştırmalı olarak

araştırmışlardır. Bulgular, CFS ve CE'nin özellikle Caco-2 hücreleri üzerinde, sırasıyla $77,8 \pm 0,8$ ve $58,4 \pm 1,6$ 'ya varan güçlü doza bağlı anti-proliferatif aktivite sergilediğini göstermiştir. Bu etkilerin kanserli (Caco-2 ve HeLa) hücrelerde, normal (IEC-6) hücrelere kıyasla daha belirgin olduğunu saptamışlardır. Sonuçlar, CFS ve CE'lerin hücre yanıtlarının bakterinin türüne ve hatta suş düzeyinde çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin, *L. plantarum* 0996, *L. brevis* 0912 ve 0983 gibi suşların CFS'leri, tüm konsantrasyonlarda Caco-2 hücreleri üzerinde CE'lerden daha güçlü bir inhibitör etki göstermiştir. En yüksek konsantrasyon (%20) uygulamalarında, CFS'nin CE'ye kıyasla daha yüksek sitotoksikite sergilediği kaydedilmiştir. Bu bağlamda, *L. plantarum* 0991, 0995, 0996 ve *L. brevis* 0983 gibi suşlar, Caco-2 hücreleri üzerinde güçlü anti-proliferatif etkiler sunmuştur. CE'ler arasında ise *L. rhamnosus* GG ve *P. parvulus* 4/2K suşları sırasıyla $58,4 \pm 1,6$ ve $58,3 \pm 2,0$ gibi yüksek anti-proliferatif etkiler sergilemiştir. CFS ve CE'nin inhibitör aktiviteleri genellikle doza bağlı olarak artış göstermiş, ancak bazı suşlarda konsantrasyondan bağımsız olarak güçlü anti-proliferatif etkiler de gözlenmiştir (örneğin, *L. rhamnosus* 0908, *L. casei* Shirota ve 0924). Öte yandan, *L. rhamnosus* 0997 ve *L. diolivorans* 04/1 suşları gibi bazı suşlar daha zayıf yanıtlar sergilemiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada tüm *L. acidophilus* suşlarının Caco-2 hücrelerine karşı CFS'lerin yüksek konsantrasyonda (%20) güçlü aktivite sergilediği görülmüştür ve bu etki $40,4 \pm 1,6$ (suş 0946) ile $58,6 \pm 2,1$ (suş 0937) arasında değişiklik göstermiştir. Diğer taraftan, *S. similis* 04/2'nin anti-proliferatif etkisi ortalama düzeyde gözlenirken, *L. diolivorans* 04/1 ve *L. mucosae* 0988 daha zayıf etkiler göstermiştir. Bununla birlikte, *L. mucosae* 0988'in CE'leri $28,7 \pm 2,0$ ile $44,2 \pm 0,6$ arasında değişen güçlü sitotoksik etkilere sahiptir. Çalışmada ayrıca *A. amylophilus* 0843 suşunun hem CFS hem de CE'lerinin Caco-2 hücrelerine karşı en güçlü inhibitörlerden biri olduğu gözlenmiş ve bu suş ileri çalışmalar için seçilen beş suş arasında yer almıştır. Benzer şekilde, *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 suşunun CFS'si $9,2 \pm 0,3$ (%1 konsantrasyon) ile $59,7 \pm 1,2$ (%20 konsantrasyon) arasında değişen yüksek anti-proliferatif etkinlik sergilemiştir. Bu suşun CE'leri de güçlü sitotoksik özellikler göstermiştir. *L. mesenteroides*'in CFS'si ise özellikle %20 konsantrasyonunda $68,8 \pm 1,6$ 'ya varan anti-proliferatif aktivite ile dikkat çekmiştir.

Pahumunto ve Teanpaisan (2023) yaptıkları bir çalışmada dört farklı probiyotik suşun (*L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD4 ve *L. rhamnosus* SD11 ile bir ticari probiyotik suş olan *Lactobacillus* GG (LGG) CFS' leri Caco-2 ve insan bağırsak epitelyal hücreleri (HIEC-6) üzerindeki etkileri incelenmişlerdir. Çalışmada, CFS' ler farklı konsantrasyonlarda (0-140 µg/mL) tek tabakalı hücre kültürlerine uygulanmış ve negatif kontrol olarak büyüme ortamı kullanılmıştır. Sonuçlar, CFS konsantrasyonunun artmasının Caco-2 üzerinde belirgin bir büyüme baskılanması sağladığını göstermiştir. Özellikle, 80-120 µg/mL aralığında uygulanan CFS, *L. paracasei* SD1 (%48,0 ± 0,1- %99,0 ± 0,2), *L. rhamnosus* SD11 (%47,7 ± 0,1- %98,5 ± 0,6), *L. rhamnosus* SD4 (%46,9 ± 0,1- %91,7 ± 0,4) ve LGG (%45,8 ± 0,7- %89,6 ± 0,9) için önemli ölçüde yüksek oranda hücre büyümesi baskılanması sağlamıştır. Tüm suşlar, 140 µg/mL CFS konsantrasyonunda %100 hücre büyümesi baskılanması göstermiştir. Normal bağırsak hücre hattı (HIEC-6) için yapılan incelemelerde, Caco-2 hücre hattına kıyasla tüm suşlar için daha düşük bir büyüme baskılanması gözlenmiştir. *L. rhamnosus* SD4 ve LGG, diğer iki suş olan *L. paracasei* SD1 ve *L. rhamnosus* SD11 ile karşılaştırıldığında HIEC-6 hücrelerinde büyüme baskılanmasında daha yüksek anlamlı farklar tespit edilmiştir. Bu çalışma hem CFS' nin hem de CE'lerin kanser hücrelerinde belirgin anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu ve normal hücrelerde daha düşük toksisite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Hoxha ve diğ. (2023) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, çeşitli geleneksel fermente gıdalardan izole edilen on LAB türü [beş *L. plantarum* izolatu (KC 5-12, KC 5-14, KZC 8-21-1, KZC 8-23-5 ve KO 4-4), bir *Pediococcus pentosaceus* izolatu (KC 5-13), bir *L. sakei* izolatu (C 10-31-3), bir *L. coryniformis* izolatu (KO 3-7-5) ve iki *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolatu (KZM 2-11-1 ve KZM 2-11-3)] değerlendirilmiştir. Bu izolatlardan elde edilen CFS' lerin sitotoksikite testlerini, Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattında gerçekleştirmişlerdir. Test sürecinde, CFS' lerin seri dilüsyonları hazırlanarak, hücreler 48 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Antiviral aktivite çalışmalarına geçmeden önce, bu CFS' lerin hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkilerini ayrıntılı olarak değerlendirmişlerdir. CFS' lerin hücre büyümesi, morfolojik değişiklikler ve mitokondriyal metabolizma üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada toplamda on iki farklı CFS, MDBK hücreleri üzerinde %100 ile %1,5 arasında değişen

konsantrasyonlarda test edilmiştir. Çalışma sonucunda, tüm izolatların doza bağımlı olarak değişen etkiler sergilediği gözlemlenmiştir. Maksimum tolerans konsantrasyonu, mikroskopik incelemelerle hücre tabakasında oluşan morfolojik değişiklikler göz önüne alınarak belirlenmiş ve %25'in altındaki konsantrasyonlarda belirgin bir morfolojik değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, CFS' lerin güvenli konsantrasyon aralıklarının ve doz-bağımlı etkilerinin belirlenmesi açısından önemli veriler sunmaktadır.

Erfanian ve diğ. (2023), *L. acidophilus* tarafından üretilen CFS' lerin farklı konsantrasyonlarının (%0,62-%40 v/v), HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile sağlıklı insan dermal fibroblast (HDF) hücreleri üzerindeki antikanser etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, hücreler ve CFS' lerin doz ve zamana bağlı etkileri 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek değerlendirilmiştir. MTT testi sonuçları, *L. acidophilus* CFS' lerinin, uygulama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla kanser hücrelerinin çoğalmasını bu sürelerde belirgin şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Bulgular, HT-29 hücrelerine uygulanan 24 saatlik CFS tedavisi sonucunda IC₅₀ değerinin %20 v/v olarak belirlendiğini göstermektedir. Ayrıca, inkübasyon süresinin 48 ve 72 saate uzatılmasıyla IC₅₀ değerlerinde düşüş gözlenmiş ve CFS' lerin sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu çalışma, *L. acidophilus* CFS' lerinin kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkiler sağladığını, ancak sağlıklı HDF hücreleri üzerindeki etkilerin sınırlı olduğunu göstermiştir. HDF hücrelerinde, 72 saatlik inkübasyon süresi boyunca %40 (v/v) konsantrasyonda CFS uygulaması haricinde belirgin bir sitotoksik etki gözlenmemiş ve IC₅₀ değeri saptanmamıştır. Bu sonuçlar, *L. acidophilus* CFS' lerinin sağlıklı hücreler üzerindeki minimal etkilerini ortaya koyarak, kanser tedavisinde güvenli kullanım potansiyelini desteklemektedir.

Salek ve diğ. (2024), katır sütünden izole edilen *L. fermentum* ve *L. plantarum* ile standart probiyotik suş *L. rhamnosus* GG CFS' lerin insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve embriyonik sağlıklı böbrek hücre hattı HEK-293 üzerindeki antikanser etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın bulguları, HT-29 hücre hattında 50 µg/ml 5-FU konsantrasyonunun IC₅₀ değerine ulaştığını ve bu konsantrasyonun HEK-293 hücrelerinin canlılığını %41,27 oranında azalttığını ortaya koymaktadır. Laktobasil suşlarının hücre ekstraktlarının farklı seyreltmelerinin (1:10, 1:100 ve 1:1000) HT-29

hücre hattı üzerindeki etkileri incelendiğinde, 1:10 seyreltmesinin en fazla sitotoksik etkiye neden olduğu ve bu seyreltme ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca, laktobasil suşlarının CFS-5-FU ile kombinasyon halinde kullanılması, HT-29 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmış ve apoptozu indüklemiştir. Bu bulgular, laktobasil suşlarının antikanser potansiyelini desteklemekte ve 5-FU'nin birlikte kullanıldığında kanser hücrelerinin ölümünü teşvik edebileceğini göstermektedir. Öte yandan, bu kombinasyonun HEK-293 hücrelerini 5-FU'nun sitotoksik etkilerinden koruyarak canlılıklarını arttırdığını ve böylece laktobasil suşlarının olası koruyucu etkilerini ortaya koymuştur.

Yapılan tez çalışmasında HT-29, Caco-2 ve CCD841 CoN hücre hatlarında, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının farklı konsantrasyonlardaki (0,39-100%) canlı ve inaktif CFS'lerin sitotoksik etkileri MTT testi ile incelendi. Bu çalışma, CFS'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini inceleyerek literatüre hem canlı hem de inaktif formlarının karşılaştırmalı etkilerini sunmaktadır. Elde edilen sonuçlarda HT-29 hücrelerinde *L. bulgaricus* için $5,255 \pm 0,102$ (canlı) ve $5,872 \pm 0,171$ (inaktif), *L. paracasei* için $7,714 \pm 0,099$ (canlı) ve $5,695 \pm 0,114$ (inaktif) olarak saptanmıştır. Caco-2 hücrelerinde, *L. bulgaricus*'un IC_{50} değerleri $6,057 \pm 0,138$ (canlı) ve $8,530 \pm 0,216$ (inaktif), *L. paracasei*'nin ise $5,970 \pm 0,039$ (canlı) ve $8,430 \pm 0,109$ (inaktif) olarak hesaplanmıştır. CCD841 CoN hücrelerinde ise *L. bulgaricus* için $33,196 \pm 0,272$ (canlı) ve $30,682 \pm 0,324$ (inaktif), *L. paracasei* için $27,802 \pm 0,342$ (canlı) ve $23,400 \pm 0,303$ (inaktif) IC_{50} değerleri elde edilmiştir. Bu çalışma ile benzer araştırmalardan elde edilen bulgular canlı ve inaktif CFS'lerin kanser hücrelerine karşı belirgin sitotoksik etki gösterdiğini, buna karşılık sağlıklı kolon hücre hattında daha sınırlı bir etki sağladığını ortaya koydu. CCD841 CoN hücre hattında gözlemlenen yüksek IC_{50} değerleri, CFS'lerin sağlıklı hücrelerde daha düşük toksisite sergilediğini ve bu bağlamda sitotoksisite açısından güvenilir bir profil sunduğunu düşündürmektedir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, CFS uygulamalarının kolorektal kanser hücre hatları Caco-2 ve HT-29 ile normal hücre hattı CCD841 CoN üzerindeki etkileri floresan boyama, hücre döngüsü analizi ve gen ifade düzeylerinin belirlenmesi yöntemleriyle incelendi. Floresan boyama yöntemleriyle yapılan analizler (AO/PI, DAPI veya Hoechst gibi) apoptotik hücrelerin morfolojik özelliklerini belirlemede

etkin olarak kullanılmaktadır (Hassan ve diğ. 2015; Chuah ve diğ. 2019; Srikkham ve diğ. 2021; Nowak ve diğ. 2022; Omid Sarajar ve diğ. 2023; Salek ve diğ. 2024).

Hassan ve diğ. (2015), *E. faecalis* ve *S. hominis* suşlarına ait canlı ve ısıyla öldürülmüş hücrelere (HKC) ek olarak CFS'lerin de antikanser etkisini incelenmişlerdir. Bakterilerin canlı hücreleri, HKC ve CFS'leri ile 25, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında MCF-7 hücre hattında uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen IC₅₀ değerlerinde hücrelerin morfolojik değişiklikleri AO/PI yöntemi kullanılarak floresan mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 24-72 saat arasında bakteri uygulanan MCF-7 hücrelerinin morfolojisinin, çoğunlukla canlı hücreler içeren bakteri uygulanmamış kontrole kıyasla açıkça değiştiğini göstermiştir. Bu çalışmanın floresan mikroskobu sonuçları şu şekilde yorumlanmıştır: kırmızı/turuncu renkte boyanan hücreler ölü, sarı-yeşil renkli hücreler apoptotik, yeşil renkli yuvarlak morfolojiye sahip hücreler ise canlı ve sağlıklı hücrelerdir.

Chuah ve diğ. (2019), *L. plantarum* UL4, 1 TL, RS5, RG14, RG11, RI11 suşlarından elde edilen CFS'leri MCF-7, HeLa, HT-29, HEP-G2, K562 ve HL60 hücre hatlarında incelemişlerdir. Sitotoksikite testinde en iyi sonuç alınan UL4 suşunun CFS'si MCF-7 hücreleri üzerinde uygulama yapılarak AO/PI floresan mikroskobik gözlem için belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, %15 ve %30 (v/v) UL4 CFS'nin MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, AO/PI boyaması kullanılarak gözlemlenen morfolojik değişiklikler arasında hücre büzülmesi, nükleer membranda yoğunlaşan kromatin kümelenmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu rapor edilmiştir. Ayrıca, floresan mikroskobu altında gözlemlenen sitoplazmik ve nükleer parçalanma, CFS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde belirgin apoptotik değişikliklerin meydana geldiğini göstermiştir. Bu bulgular, UL4 CFS'nin apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini ve hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin apoptotik sürecin bir göstergesi olduğunu ortaya koymaktadır.

Srikkham ve diğ. (2021), anne sütünden izole edilen *S. salivarius* suşlarını yeni probiyotik adayları olarak karakterize etmişlerdir. Bu suşların CFS'lerini, HepG2 ve MCF-7 kanseri hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif ve antioksidan aktivitelerini

incelemişlerdir. Potansiyel probiyotiklerin apoptotik etkisi MTT sonucunda elde ettikleri IC₅₀ konsantrasyonu ile AO/PI boyama yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Uygulama yapılmamış HepG2 hücrelerinde (kontrol), apoptozun olmadığını parlak yeşil renkte gözlemlemişlerdir. Buna karşılık, *S. salivarius* BP8, *S. salivarius* BP156 ve *S. salivarius* BP160 suşlarının CFS' si ile muamele edilen HepG2 hücrelerinin geç apoptozu ve / veya hücre ölümünü gösteren turuncu renkte boyandığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, uygulama yapılmamış MCF-7 hücrelerinde (kontrol) parlak yeşil renkte herhangi bir apoptoz belirtisi gözlemlememişlerdir. Ancak, *S. salivarius* BP8, *S. salivarius* BP156 ve *S. salivarius* BP160 ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, turuncu renkli geç apoptotik veya ölü hücrelerin bulunduğunu saptamışlardır. Bu çalışma, insan anne sütünden izole edilen *S. salivarius* suşlarının CFS' lerinin kanser tedavisinde umut vadeden probiyotik adayları olabileceğini vurgulamaktadır.

Nowak ve diğ. (2022), *Lactobacillus* türlerinden elde edilen CFS ve hücre ekstraktlarının (CE)' lerin Caco-2 ve HeLa hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerini değerlendirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada normal bağırsak IEC-6 hücreleri de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Hücrelerin morfolojik değişimlerini gözlemek amacıyla önceden belirlenmiş IC₅₀ değeri olan %10 (v/v) CFS ve CE uygulamalarına 24 saat maruz bırakarak kristal viyole boyama yöntemiyle gözlemlemişlerdir. Elde edilen bulgulara CFS ve CE tüm hücre gruplarında, kontrol grubuna kıyasla gözle görülebilen hücre sayısında ve yoğunluğunda azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değişiklikler, apoptotik bir sürecin belirtileri olan kromatin parçalanması, hücre şişmesi ve sitoplazmik vakuolizasyon ile desteklenmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar ayrıca DAPI boyama yöntemi ile de incelenen hücrelerde çekirdek anormallikleri gözlemlemişlerdir.

Omidi Sarajar ve diğ. (2023), *L.sakei* probiyotiği ve koruyucu kültür FreshQ® (FQ)'den elde edilen CFS ve CE' lerinin HCT-116 hücreleri üzerindeki proliferasyon ve apoptoz etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, *L. sakei* ve FQ den elde edilen CFS ve CE' lerin 1.25-20 mg/ml aralığındaki konsantrasyonları ile HCT-116 hücrelerinde apoptozu yol açma potansiyelleri AO/EB boyama yöntemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Floresan boyama sonuçları, postbiyotiklerin apoptoz oranlarının konsantrasyon bağımlı olarak artabileceğini göstermiştir. Floresan boyama

sonuçlarında, FQ CFS' nin hücre popülasyonunu azaltma ve proapoptotik etkiler bakımından en yüksek etkiyi sağladığını, buna karşın *L. sakei* CFS' nin ise daha az etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada AO/EB sonuçlarından elde edilen veriler *L. acidophilus* ve *L. delbrueckii*' den elde edilen CFS ve CE' lerin HT-29 hücrelerinde anti-proliferatif ve apoptoz indükleyici etkileri hakkında önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu rapor etmişlerdir (Baghbani-Arani ve diğ. 2020; Maghsood ve diğ. 2020). Ayrıca bu çalışmada AO/EB boyama sonuçları ile *L. sakei* ve FQ'nun artan CFS konsantrasyonlarının, kırmızımsı-turuncu boyalı hücre artışına bağlı olarak apoptozu tetikleyici bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular, CFS' lerin kanserli hücrelerde apoptozu indükleyebileceğini öne süren önceki çalışmalarla tutarlıdır.

Salek ve diğ. (2024), katır sütünden izole edilen *L. fermentum* ve *L. plantarum* suşları ile standart probiyotik suş *L. rhamnosus* GG (LGG) CFS' lerin, HT-29 ve HEK-293 üzerindeki antikanser etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, 50 µg/ml 5-FU ve 1:10 seyreltme CFS uygulamaları IC₅₀ değerleri olarak belirlemişlerdir. Daha sonra AO/EB boyama yöntemiyle hücrelerdeki apoptoz ve nekroz oranlarını değerlendirmişlerdir. Bu araştırma sonuçları, HT-29 hücrelerinde 5-FU ve CFS' lerin hem erken hem de geç apoptoz oranlarını artırdığını göstermiştir. Özellikle SJ06 suşunun CFS' si 5-FU ile uygulandığında erken apoptoz oranını artırdığı, LGG suşunun CFS' sinin ise geç apoptoz oranını arttırdığını tespit etmişlerdir. HEK-293 hücrelerinde ise 5-FU, erken apoptoz oranını artırırken, CFS' lerin bu artışı baskılayarak sağlıklı hücrelerde apoptozu kontrol altında tuttuğunu saptamışlardır. Nekroz oranları açısından, HT-29 hücrelerinde 5-FU'nun nekroz oranını artırdığı, ancak CFS' ler ile kombine edildiğinde anlamlı bir değişim olmadığını gözlemlemişlerdir. HEK-293 hücrelerinde ise CFS' lerin, 5-FU'nun neden olduğu nekroz oranını azalttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışma, CFS' lerin kanser hücrelerinde apoptozu indükleyici etkiler gösterebileceğini ve sağlıklı hücrelerde 5-FU'nun yan etkilerini azaltabileceğini öne sürmektedir.

Bu tez çalışmasında, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarından elde edilen canlı ve inaktif CFS' lerin kolon kanseri hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) üzerine IC₅₀ uygulanmasının, kontrol gruplarına kıyasla apoptozu uğrayan hücre sayısını belirgin şekilde arttırdığı tespit edildi. Özellikle HT-29, Caco-2 ve sağlıklı kolon epitelyum

hücre hattı olan CCD 841 CoN hücrelerinde CFS uygulaması sonrasında gözlenen yüksek apoptotik hücre oranları, MTT testi sonuçlarıyla da benzer bulunmuştur. Çalışmanın bulguları hem canlı hem de inaktif CFS uygulamalarının apoptozu tetiklediğini ve bu süreçte meydana gelen nükleer morfolojik değişikliklerin literatürdeki diğer çalışmalarla paralel olduğunu göstermektedir. Literatürde, özellikle ısıyla inaktive edilmiş ve canlı CFS'lerin kolorektal kanser hücrelerine etkisini inceleyen çalışmalar sınırlıdır; bu nedenle, elde edilen bulgular bu alandaki bilgi boşluğunu doldurmaya yönelik değerli katkılar sunmaktadır. Ayrıca, bu tez çalışmasında kanser hücreleri için belirlenen IC₅₀ dozlarının, CCD 841 CoN hücrelerinde sitotoksik bir etkiye neden olmadığı belirlendi. Bu bulgu, CFS'nin kanser hücrelerine karşı spesifik etkisinin sağlıklı hücreler üzerinde zararlı bir etki göstermeksizin güvenli bir şekilde uygulanabileceğini işaret etmektedir. Çalışmamız, CFS'nin kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceğine işaret ederken, özellikle seçici sitotoksik etkinin normal kolon epitelyum hücrelerinde gözlenmemesi literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Bu sonuçlar, ileride yapılacak çalışmalar için ısı ile inaktive edilmiş ve canlı CFS uygulamalarının apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasına ışık tutmaktadır.

Literatürde canlı ve inaktif probiyotik bakteri CFS'lerinin hücre döngüsü analiziyle antikanser aktivitesini araştırarak sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Howard ve Pelc 1953; Wang ve diğ. 2012; Hu ve diğ. 2015; Dehghani ve diğ. 2020; Erfanian ve diğ. 2023).

Hücre döngüsü, DNA'nın çoğaltılması ve hücre bölünmesinin düzenlenmesini sağlayan, belirli bir sıralamayla ilerleyen olaylar dizisi olarak ifade edilmektedir (Leal-Esteban ve Fajas, 2020). Hücre döngüsü, interfaz ve mitoz olmak üzere iki ana evreye ayrılmaktadır. Bu evrelerden ilki olan interfaz "G₀, G₁, S ve G₂" aşamalarını içerirken, M fazı ise kromozomların ayrıldığı ve hücre bölünmesinin tamamlandığı mitoz sürecini kapsamaktadır (Panda ve diğ. 2019).

Wang ve diğ. (2012), Batı Çin'in geleneksel fermente gıdalarından izole edilen beş *Lactobacillus* suşunun (X11, X12, M5, K11 ve K14) kolon kanserinde hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü blokajı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu

suşlardan elde edilen hücre duvarları ve CFS' leri, anti-proliferatif aktivite ve apoptoz indüksiyonu açısından değerlendirmişlerdir. *Lactobacillus*' un anti-proliferatif etkilerini araştırmak amacıyla, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde CFS ve hücre duvarları ile uygulama sonrası hücre döngüsü analizi yapmışlardır. Çalışmada, *Lactobacillus* hücre duvarlarının veya CFS' lerin hücre döngüsünün durmasını indükleyerek kanser hücrelerini etkilediğini gözlemlemişlerdir. HT-29 hücrelerine 80 µg/ml M5, K11 ve K14 hücre duvarları ve 1:10 oranında K14-M5 CFS uygulandıktan sonra hücrelerin büyük bir kısmının 72 saat sonunda S fazında biriktiğini saptamışlardır. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, S fazındaki hücre oranının tüm uygulamalar sonrasında %50'nin üzerinde arttığı rapor edilmiştir. Bu durum, S fazında artışa paralel olarak G1 fazında azalma ile sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, beş *Lactobacillus* suşunun hücre duvarları ve M5 ile K14'ün CFS' lerinin, HT-29 hücrelerine karşı anti-proliferatif aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Hassan ve diğ. (2015), *E. faecalis* ve *S. hominis*' in farklı konsantrasyonlardaki (25 ve 200 µg/ml) canlı hücrelerinin ve CFS' lerinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerini incelenmişlerdir. Bulgular, her iki bakteriyel formun da hücre döngüsünün G0/G1 fazını durdurarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini göstermiştir. Özellikle, canlı *E. faecalis* ve *S. hominis* ile yapılan inkübasyon, Sub G1 fazında hücre birikimini artırırken G0/G1 fazındaki hücre sayısını azalttığı rapor edilmiştir. Bu etki, konsantrasyona bağlı olarak daha belirgin hale gelmiş ve MTT testi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları kanser hücrelerinin G0/G1 fazında durdurulmasının kanser tedavisinde etkili bir hedef olduğunu ve probiyotiklerin, kemoterapötiklere alternatif olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Hu ve diğ. (2015), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M5L (*L. paracasei* M5L) izolatının CFS'lerinin, antikanser potansiyelini ve mekanizmalarını incelemek amacıyla HT-29 hücreleriyle birlikte kültüre etmişlerdir. Çalışmada *L. paracasei* M5L CFS'lerini farklı oranlarda (1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1) ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48, 72 saat) MTT testinde uygulamışlardır. canlı ve inaktif formlarının HT-29 hücre proliferasyonunu anlamlı derecede inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Canlı ve inaktif bakterilerin anti-proliferatif etkileri karşılaştırıldığında, inaktif bakterilerin daha yüksek inhibisyon oranı gösterdiği ve bu durumun özellikle 100:1 enfeksiyon oranında daha belirgin olduğunu bulmuşlardır.

Özellikle de 72 saatlik uygulama sonrası inaktif *L. paracasei* M5L'nin, HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve apoptotik oranı kontrol grubuna kıyasla ($p < 0.05$) anlamlı ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan hareketle belirledikleri IC_{50} dozu ve süresi ile hücre döngüsü analizi yapmışlardır. Analiz bulguları canlı laktobasillerin G1 fazındaki hücre sayısını azaltırken, G2 ve S fazlarındaki hücre oranını artırdığını göstermiştir. Öte yandan, inaktif laktobasiller de S fazındaki hücre sayısını artırarak hücre döngüsü ilerlemesini durdurmuş ve böylece HT-29 hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir. Bu bulgular, *L. paracasei* M5L'nin HT-29 hücrelerinde anti-proliferatif etkiler gösterdiğini ve bu etkilerin hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptoz indüksiyonu yoluyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Huang ve diğ. (2016), kuzeybatı Çin'in geleneksel peynirinden izole edilen *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (*L. paracasei*) X12'nin kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, bakterinin hücre döngüsü ve memeli rapamisin hedefi (mTOR) sinyal yolağı üzerindeki etkileri incelenmiştir. *L. paracasei* X12'nin farklı konsantrasyonları Multiplicity of infection-Enfeksiyon çokluğu (Bakteriyofaj sayısı/bakteri sayısının oranı (MOI) : 0, 10, 50 ve 100 ile yapılan akış sitometrisi analizleri, özellikle yüksek MOI seviyelerinde (50 ve 100), hücre döngüsünün G1 fazında durduğunu göstermiştir. Bu durum, DNA sentezinin baskılanması ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar, bu etkileri qRT-PCR yöntemiyle detaylandırmış ve *L. paracasei* X12'nin siklin D1 ve siklin E1 gibi hücre döngüsü pozitif düzenleyici genlerin ifadesini baskılayarak, p27 gibi inhibitör genlerin ifadesini artırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca, bu değişimlerin mTOR/4EBP1 sinyal yolağının inhibisyonuyla bağlantılı olduğu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, bakterinin mTOR yolağını baskılayarak G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve böylece HT-29 hücrelerinin çoğalmasını etkili bir şekilde engellediği rapor edilmiştir. Sonuç olarak, G1 fazının kanser tedavisinde önemli bir hedef olduğu ve *L. paracasei* X12'nin bu süreci etkileyerek kolon kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı görülmektedir. Bu bulgular, Çin'in geleneksel peynirinden izole edilen *L. paracasei* X12'nin kolon kanserine karşı umut verici bir biyoterapötik ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

Chuah ve diğ. (2019), *L. plantarum* UL4, 1 TL, RS5, RG14, RG11 ve RI11 suşlarından elde edilen CFS'lerin MCF-7, HeLa, HT-29, HEP-G2, K562 ve HL60

hücre hatlarında sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, UL4 suşunun CFS'inin MCF-7 hücreleri üzerinde en etkili sitotoksisiteyi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda (%15 ve %30 v/v) ve inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) UL4 CFS' si ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsünü akış sitometri yöntemi ile araştırmışlardır. Hücre döngüsü analizleri sonucunda %15 (v/v) ve %30 (v/v) konsantrasyonlarındaki UL4 CFS' sinin 48 saatlik inkübasyondan sonra MCF-7 hücrelerinin ağırlıklı olarak G0/G1 fazında duraksadığını rapor etmişlerdir. Özellikle, %30 (v/v) UL4 konsantrasyonu ile uygulama yapılan hücrelerde, apoptotik hücrelerin zaman ve doza bağlı olarak belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, G0/G1 fazında hücre döngüsü duraksaması ve akış sitometri analizleriyle tespit edilen fosfatidilserin maruziyeti, UL4 CFS' sinin MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir. Araştırmacılar, bu bulguların, postbiyotik UL4'ün potansiyel bir kanser tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini desteklediğini rapor etmişlerdir.

Dehghani ve diğ. (2021), *L. rhamnosus* probiyotik bakteri süpernatantının HT-29 hücrelerinde sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, HT-29 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerince çeşitli CFS konsantrasyonları (0,0038-0,0192-0,096-0,48-2,4-12,00-60,00 ve 1000 mg/ml) ile uygulama yapmışlardır. Araştırmacılar, CFS' lerin sitotoksitesini MTT testi ile değerlendirmiş ve hücre canlılık oranlarını rapor etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 24, 48 ve 72 saat sonra 1,95-0,25 ve 0,053 mg/ml olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, belirledikleri IC₅₀ CFS konsantrasyonları ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde hücre döngüsünün G0/G1 fazında duraksama meydana getirdiğini ve hücrelerin Sub-G1 fazına geçiş oranının önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır. Sub-G1 fazında hücre popülasyonunu, tedavi edilmeyen hücrelere kıyasla 48 saat sonra %30,67 ve 72 saat sonra %55,75 olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca, hücre döngüsü analizleri probiyotik CFS' lerin G0/G1 fazında hücre birikimine neden olduğunu ve hücre proliferasyonunu engellediğini göstermiştir. Araştırmacılar, probiyotik bakterilerin anti-kanser etkilerinin cins ve suşa bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu bağlamda, yeterli tamamlayıcı testlerden sonra, yerli *L. rhamnosus* suşlarının kanserde hücre büyümesini engelleyebilecek potansiyel bir tamamlayıcı tedavi olarak değerlendirilebileceğini rapor etmişlerdir.

Erfanian ve diğ. (2023), *L. acidophilus* tarafından üretilen hücresiz CFS çeşitli konsantrasyonlarının (%0,62-%40 v/v), HT-29 kolon kanseri hücre hattı ve sağlıklı insan dermal fibroblast (HDF) hücreleri üzerindeki antikanser etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemişlerdir. MTT testi bulgularına göre, *L. acidophilus* CFS'lerinin kanser hücrelerinin proliferasyonunu kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, 24 saatlik CFS uygulaması sonucunda IC₅₀ değerini %20 (v/v) olarak belirlemiş ve inkübasyon süresinin uzamasıyla IC₅₀ değerlerinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, CFS'lerin kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkiler sağladığını, ancak HDF hücreleri üzerindeki etkilerin sınırlı olduğunu bulmuşlardır. HDF hücrelerinde yalnızca %40 (v/v) CFS uygulamasında, 72 saatlik inkübasyon sonunda belirgin bir sitotoksik etki tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, *L. acidophilus* CFS'lerinin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsü durmasını indüklediğini ve anti-proliferatif ve anti-migrasyon etkiler sergilediğini tespit etmişlerdir. Buna karşılık, kontrol grubunu oluşturan fibroblast hücreleri üzerinde anti-proliferatif bir aktivite göstermediklerini bulmuşlardır. Akış sitometrisi analizleri, CFS uygulamasının hücre döngüsü üzerinde önemli bir etki yarattığını ortaya koymuş ve G1 fazında belirgin bir inhibisyon saptamışlardır. Ayrıca, uygulama yapılan hücrelerin oranında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlemişlerdir. Aynı zamanda, S ve G2/M fazlarındaki hücre oranlarında kayda değer bir azalma tespit etmişler ve bu bulgular, CFS uygulamasının hücrelerin öncelikle G1 fazında ilerlemesini etkilediğini düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasında, *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarından elde edilen canlı ve inaktif CFS'lerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen üç farklı hücre hattı (HT-29, Caco-2, CCD841 CoN) üzerinde hücre döngüsünde gözlemlenen değişiklikler değerlendirildi. Özellikle, probiyotik CFS'lerin uygulandığı hücre hatlarında, G0/G1 fazındaki hücre birikimi, hücre döngüsünün durdurulmasına ve hücrelerin proliferasyonunun baskılanmasına işaret etmektedir. Yapılan tez çalışmasında *L. bulgaricus* (canlı ve inaktif) ve *L. paracasei* (canlı ve inaktif) CFS'lerinin hücre hatlarında G0/G1 fazındaki hücre birikimi, probiyotiklerin hücre döngüsünün başlangıç aşamasında hücreleri durdurarak çoğalmalarını engellediği ve bu sayede anti-proliferatif etkiler sergilediği tespit edildi. Bu çalışmada, Sub G fazında gözlemlenen artış, hücrelerin döngüsünü tamamlamadan ölüm aşamasına

geçmeleriyle ilişkili olarak yorumlandı. Bu durum, hücrelerin apoptotik yolu tetikleyerek ölüm oranlarının arttığını ve dolayısıyla apoptotik etkinin güçlendiğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, S fazındaki azalmayla birlikte DNA replikasyonunun inhibe olduğu ve hücre bölünmesinin durduğu görülmektedir. Bu bulgular, hücrelerin bölünme süreçlerinin inhibe edildiğini ve proliferasyonlarının durdurulduğunu göstermektedir. Ayrıca, G2/M fazındaki azalma, mitoz aşamasındaki hücrelerin ilerlemesinin engellendiğini ve hücre döngüsünün çoğunlukla G0/G1 fazında birikmeye eğilimli olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde, probiyotik bakterilerin canlı ve inaktif CFS'lerin etkilerine yönelik çalışmaların sınırlı olduğu ve bu alandaki verilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Mevcut araştırmalarda farklı bakteri izolatları ve referans suşlarında yapılan hücre döngüsü çalışmalarından farklı sonuçların elde edildiği görülmektedir. Bu durumun, probiyotiklerin antikanser etkilerinin suş, izolat ve uygulama konsantrasyon değerlerine bağlı olarak farklılık gösterdiğini ve dolayısıyla etki mekanizmalarının değişebileceğini göstermektedir.

Probiyotik bakterilerin hücre döngüsünü ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerini anlamada apoptozda aktif genler üzerine yapılan çalışmalar kritik bir rol oynamaktadır. Apoptoz genlerinin regülasyonu, kanser tedavisinde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Literatürde, probiyotik bakterilerden türetilen CFS'lerin apoptotik mekanizmalar üzerindeki etkileri giderek daha fazla araştırılmaktadır.

Rajoka ve diğ. (2018) insan anne sütünden izole edilen *L. casei* ve *L. paracasei* suşlarının CFS'lerini HeLa kanser hücre hattına karşı antikanser potansiyelini incelemişlerdir. Bu çalışma için probiyotik özelliklere sahip üç izolat olan *L. casei* SR1, *L. casei* SR2 ve *L. paracasei* SR4'ü 16S rRNA dizilimi ile tanımlamışlardır. Araştırmacılar, hücresiz kültür süpernatantlarının antikanser aktivitesini sitotoksosite ve apoptoz analizleriyle değerlendirmişler, RT-qPCR ve western blot analizleri ile antikanser mekanizmaları incelemişlerdir. Sonuçlar, CFS'lerin apoptotik genler olan Bax, BAD, Cas 3, Cas 8 ve Cas 9'un ifadesini artırdığını ve anti-apoptotik Bcl-2 geninin ifadesini azalttığını göstermişlerdir. Bu bulgular, HeLa hücre hattında CFS'lerin apoptozu indüklediğini ve anlamlı antikanser etkiler sergilediğini doğrulamaktadır. Sonuç olarak, insan anne sütünden izole edilen *L. casei* SR1, *L. casei* SR2 ve *L. paracasei* SR4 izolatlarının serviks kanseri hücre hattına karşı yüksek

antikanser aktivite gösterdiği, kontrol hücrelerine göre pro-apoptotik genlerin yukarı regülasyonunu ve anti-apoptotik genlerin aşağı regülasyonunu sağladığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bu sonuçların, izole edilen *Lactobacillus* suşlarının probiyotik potansiyelini desteklediğini ve fonksiyonel gıda ürünlerinde starter kültür olarak kullanımını önerdiklerini belirtmişlerdir.

Tükenmez ve diğ. (2019) *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen EPS' lerin yapısal özellikleri ile kolon kanseri hücrelerinde apoptoz indüksiyonu arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmada, *L. plantarum* GD2, *L. rhamnosus* E9, *L. brevis* LB63 ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşlarından elde edilen EPS' lerin kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, EPS' lerin monosakkarit bileşimi, moleküler ağırlık ve bağlantı türünü HPLC, SEC ve NMR teknikleri kullanarak analiz etmişlerdir. Ayrıca, qPCR ve Western blot yöntemleri ile apoptoz belirteçlerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Sonuçlar, EPS' lerin Bax, Cas 3 ve 9'un ifadesini artırarak ve Bcl-2 ile Survivin ifadesini azaltarak apoptozu indüklediğini göstermiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşunun EPS' si en yüksek apoptoz indüksiyonunu göstermiştir. Araştırmacılar, EPS'nin apoptoz indüksiyonu ile monosakkarit bileşimi arasında bir ilişki bulmuşlardır ve özellikle mannoz içeriğinin apoptozu artırmada etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Karimi Ardestani ve diğ. (2019), ısıyla öldürülmüş *L. brevis* ve *L. paracasei* bakterilerinin HT-29 kolon kanseri hücre hattında anti-proliferatif ve apoptotik indükleyici etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, İran yerel gıdası "Terxine"den izole edilen bu bakterilerin, kanser hücrelerinde büyümeyi engelleyici etkilerini MTT testi ile değerlendirmişlerdir. Ayrıca, apoptotik yanıtlar Annexin-FITC akış sitometrisi, DNA fragmentasyonu, DAPI boyama ve gen ifade analizleri (Bax, Bcl-2, Cas 3, Cas 9) ile araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarında ısıyla öldürülmüş her iki bakterinin de zaman, doz ve suşa bağlı olarak HT-29 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Çalışmada, *L. brevis*' in *L. paracasei*' ye göre daha güçlü bir apoptoz indüksiyonu sağladığı rapor edilmiştir. Bax gen ifadesi her iki bakteri uygulanan hücrelerde anlamlı artış gösterirken, anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Uygulama süresi uzadıkça (48 saatten 72 saate), Bax/Bcl-2 oranında ve Cas 3 ile Cas 9 ifade seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, bu bulguların ısıyla öldürülmüş probiyotik bakterilerin intrinsik

mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indüklediğini ve özellikle *L. brevis*' in, *L. paracasei*' den daha yüksek apoptotik aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak, her iki bakterinin de HT-29 hücrelerinde kaspaz bağımlı hücre ölüm mekanizmasını tetiklediğini göstermişlerdir.

Faghfoori ve diğ. (2021), bazı *Bifidobacterium* türlerinin kolon kanseri hücre hatları üzerindeki apoptotik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, apoptoz mekanizmalarına odaklanarak, *B. adolescentis* (ATCC 15703, PTCC1536), *B. animalis* subsp. *lactis* (PTCC1736), *B. animalis* subsp. *animalis* (ATCC 25527, PTCC 1631), *B. bifidum* (ATCC 29521, PTCC 1644) ve *B. angulatum* (ATCC 27535, PTCC 1366) türlerinin HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarına karşı antikanser etkilerini, normal epitel hücreler (KDR/293) ile karşılaştırarak araştırmışlardır. Bu çalışmada *Bifidobacterium* CFS' leri ile muamele edilen HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarında IC₅₀ değerlerinin 48 saat sonra 65-80 µg/ml arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, kontrol grubu olarak kullanılan KDR/293 hücrelerinin ise en yüksek konsantrasyon olan 80 µg/ml ile muamele edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada, *Bifidobacterium* CFS' lerinin ve 5-fluorourasil (5-FU) uygulamaları sonrasında, kolon kanseri ve normal hücre hatlarındaki pro-apoptotik (Cas 3, Cas 8, Cas 9, Fas-R, BAD) ve anti-apoptotik (Bcl-2) anahtar genlerin ifade seviyelerini değerlendirmişlerdir. Faghfoori ve diğ, 5-FU uygulamasının cas-9 hariç tüm pro-apoptotik genlerin ifade seviyelerini önemli ölçüde artırdığını ve anti-apoptotik gen olan Bcl-2'nin ifadesini azalttığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışma farklı *Bifidobacterium* türlerinin kolon kanseri hücre hatlarında antikanser aktivite sergilediğini ve bu etkilerin gen ifadelerinde değişikliklere sebep olduğunu ortaya koymaktadır.

Yeganeh ve diğ. (2021), yerel *L. paracasei* (IBRC_10784) süpernatantının pankreas adenokarsinom hücre hattı AsPC-1 üzerindeki sitotoksik etkilerini ve Bax, Bcl-2 ve DPC4 apoptotik genlerinin ifade düzeylerini incelemişlerdir. Çalışmada, AsPC-1 hücrelerini 24 saat boyunca *L. paracasei* CFS' leri ile muamele etmişlerdir. Ardından RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirmişlerdir. Araştırma bulgularında, *L. paracasei* CFS' sinin Bax gen ifadesini referans gene göre 1,86 kat artırdığını ve anti-apoptotik bcl-2 gen ifadesini ise 4,56 kat azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, TGF-β yolundaki önemli tümör baskılayıcı faktörlerden biri olan DPC4 gen

ifadesinde, referans gene göre 2,67 kat artış rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışmada *L. paracasei* CFS' sinin apoptotik genlerin ifade seviyelerini değiştirerek pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

Haji Mehdi Nouri ve diğ. (2023) *L. casei* süpernatantının MCF-7 meme kanseri ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarına karşı anti-proliferatif etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, *L. casei* CFS' si ile muamele edilen HT-29 ve MCF-7 kanser hücre hatlarında sitotoksosite ve apoptozda yer alan genlerin ifadesindeki değişiklikleri incelemişlerdir. Bakteriyel süpernatantın farklı konsantrasyonlarıyla yapılan uygulama sonrasında, MTT testi ile kanser hücrelerinin canlılıkları değerlendirilmiş ve apoptozla ilgili genlerin ifadeleri qPCR tekniği ile analiz edilmiştir. Çalışma bulgularında, CFS' nin 3,125-100 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarının MCF-7 kanser hücrelerinin canlılıklarında önemli bir azalma sağladığını, aynı şekilde 12,5-100 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde de sağ kalımı önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, her iki hücre hattında, CFS' nin IC₅₀ konsantrasyonlarının pro-apoptotik genler olan Cas 3, Cas 9 ve Bax' ın ifadesinin artışı ile anti-apoptotik gen olan Bcl-2' nin ifadesinin azalmasıyla ilişkili olduğunu ve bu değişikliklerin apoptoz ile programlanmış hücre ölümünü tetiklediğini göstermişlerdir. Sağlıklı HFF hücrelerinde ise kanser hücrelerine kıyasla göz ardı edilebilir bir sitotoksosite gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, *L. casei* CFS' sinin kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiğini ve bu özelliğin kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Dameshghian ve diğ. (2024) *L. brevis* (CFS2) ve *L. casei* (CFS5)' den izole edilen hücresiz süpernatantlarının MCF-7 kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe etme ve apoptozu tetikleme kapasitelerini incelemişlerdir. Araştırmada, her iki CFS' nin terapötik etkilerini, hücre çoğalmasını engelleme ve apoptozu başlatma yeteneklerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, *L. brevis* ve *L. casei* CFS' lerinin antikanser aktivitesini MTT testi, akış sitometrisi ve qRT-PCR teknikleri kullanarak analiz etmişlerdir. Her iki bakteri türünün CFS' sinin de MCF-7 hücrelerinde hücre ölümünü indükleme potansiyeline sahip olduğunu, ancak CFS2'nin sitotoksitesinin CFS5'ten önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar hem CFS2 hem de CFS5 ile yapılan muamele sonrası pro-apoptotik genlerin ifadesinde,

özellikle Cas 9, Bax ve Bax/Bcl-2 oranlarında bir artış gözlemlenmiştir. Anti-apoptotik gen olan Bcl-2'nin ifadesinin ise muamele sonrası kontrol genine kıyasla azaldığını bulmuşlardır. Ancak, programlanmış hücre ölümüyle ilişkili genlerin ifadesindeki değişikliklerin, CFS2 ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, CFS5 ile muamele edilen hücrelere kıyasla daha belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. Gen ifadesi verileri, akış sitometrisi ve MTT testi ile belirlenen apoptoz indüksiyonu bulgularını desteklemiştir. Sonuçlar, CFS2'nin CFS5'e kıyasla daha yüksek apoptotik aktivite gösterdiğini ve Bax ile Cas 9 gen ifadelerinde daha büyük bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, CFS'lerin kanser tedavisindeki potansiyelini vurgulamaktadır ve kanser hücrelerinin büyümesini baskılayabileceğini göstermektedir.

Abedi ve diğ. (2024) İran'ın Arak ilinden geleneksel ve işlenmemiş yoğurttan izole edilen *L. buchneri* HBUM07105'in mikro veziküllerinin (MV) mide ve kolon kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Antikanser aktivitesini; MTT, akış sitometrisi ve qRT-PCR teknikleri ile incelemişlerdir. Çalışmada, MV'lerin tüm konsantrasyonlarının (12,5-200 µg/ml) 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonrasında insan gastrik adenokarsinom hücre hattı (AGS) ve HT-29 üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hem AGS hem de HT-29 hücrelerine MV uygulama sonrası hücre canlılığında azalma olduğunu ve G0/G1 fazında durdurulduğunu tespit etmişlerdir. Gen ifade düzeylerinde MV'lerin pro-apoptotik genlerin (Bax, Cas 3, Cas 9) ifadesini artırarak apoptotik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Pro-apoptotik genlerdeki en yüksek artış 72 saatlik tedaviden sonra gözlemlenmiş ve AGS hücre hattında Bax ve Cas 9 genlerinin yukarı regülasyonu, HT-29 hücre hattındaki aynı genlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, *L. buchneri* MV'lerinin kanser hücrelerinin canlılığını engelleme potansiyeline sahip olduğunu ve probiyotiklerin kanserin ilerlemesini engellemede etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

Vachkova ve diğ. (2023) *L. paracasei* suşlarının antikanser ve probiyotik özelliklerini değerlendirmek amacıyla insan kolon kanseri hücre hattı HT-29'u kullanmışlardır. Laktik asit bakterilerini, sekoya karıncalarının yaşadığı dağ karınca yuvalarından izole etmişlerdir. Kolon kanseri hücre hattına, dört farklı *L. paracasei* izolatından üretilen CFS'ler (P4, C8, C15, M2.1) ile 24 saatlik uygulama yapmışlardır.

P4 %10 CFS'lerin çoğalan kanser hücrelerinde kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve P4 ile M2.1 CFS'lerinin farklılaşmış hücrelerde Bax/Bcl-2 oranını anlamlı şekilde azalttığını göstermişlerdir. Çalışmada, izole edilen *L. paracasei* suşlarının antikanser ve probiyotik özelliklere sahip olduğunu ve fonksiyonel süt ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır. Ayrıca, P4, C8 ve M2.1'in farklılaşmamış HT-29 hücrelerinde farklılaşmayı ve apoptozu teşvik ederek, çoğalmayı baskıladığını ve umut verici antikanser özellikler sergilediğini ortaya koymuşlardır. P4 ve M2.1 suşlarının en iyi probiyotik adayları olduğunu ve farklılaşmış hücrelerde anti-apoptotik etkilere yol açtığını göstermişlerdir. Bu bulgular, *L. paracasei* suşlarının birleştirilmesinin antikanser etkinliğini artırarak nutrasötik ürünlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarının CFS'lerinin HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN hücre hatlarındaki etkileri incelenerek ve apoptotik süreçleri tetikleyen Bax, Cas 9, Cas 8, Cas 3 ve Bcl-2 gen ifadelerinin düzeyleri analiz edildi. Sonuçlar, inaktif süpernatantların, canlı form süpernatantlara kıyasla tüm gen ifadelerinde daha belirgin artışlara yol açtığını gösterdi. Özellikle inaktif formlarla muamele edilen hücrelerde kontrol grubuna göre pro-apoptotik genlerde (Bax, Cas 9, Cas 8 ve Cas 3) önemli ölçüde artışlar tespit edildi. Ayrıca her üç hücre hattında anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesinde anlamlı bir azalışa yol açtığını ve inaktif formların bu etkiyi daha belirgin şekilde sağladığı görüldü.

Bu tez çalışması ve benzer yapılan çalışmalarda; CFS, EPS özütleri, bakteri duvarı bileşenleri, MV ve ısıyla öldürülmüş bakteriler gibi probiyotik bakterilerden türetilen farklı postbiyotiklerin terapötik potansiyeli incelenmiştir (Wang ve diğ. 2014; Khodaii ve diğ. 2017; Karimi Ardestani ve diğ. 2019; Abedi ve diğ. 2024). Postbiyotik metabolitler, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu tetikleyip, hücre ölümüne yol açmaktadır (Behzadi ve diğ. 2021). Yaptığımız bu çalışmada *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarından elde edilen CFS'nin HT-29, Caco-2 uygulamalarının kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, probiyotiklerin ve metabolitlerinin kanser hücrelerinin yayılma ve invazyonunu engelleyerek kanserin ilerlemesini durdurabileceğini gösteren bir bulgudur. Çalışma sonuçları, inaktif CFS'lerin apoptotik etkinliği daha güçlü bir şekilde tetiklediğini ve bu izolatların kanser tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak

değerlendirilebileceğini düşündürmüştür. Literatürle karşılaştırıldığında, bu sonuçlar, probiyotik bakterilerin inaktif formlarının apoptotik süreçleri tetikleme potansiyelini vurgulayan önceki çalışmalara benzer şekilde bulunmuştur (Dalla ve diğ. 2015; Costanzo ve diğ. 2018; Shang ve diğ. 2020).

Bu tez çalışmasının bazı sınırlamaları bulunmaktadır. İlk olarak, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* probiyotik izolatlarının, yalnızca kolorektal kanser hücre hatları üzerinde incelenmiş ve diğer kanser türleri üzerindeki anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerinin değerlendirilmemiştir. Bu durum, elde edilen sonuçların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. İkinci olarak, çalışmada kullanılan bu probiyotik türlerinin antitümör aktivitelerine katkıda bulunan spesifik biyoaktif bileşen (ler) tanımlanmamış olup, potansiyel etkili moleküllerin belirlenmesi ileri çalışmalar için açık bir araştırma alanı sunmaktadır. Ayrıca, araştırmanın amacı ve finansal kısıtlamalar nedeniyle, bu probiyotiklerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin proteomik düzeyde incelenmesi gerçekleştirilememiştir. Bu durum, özellikle hücre sinyalizasyon mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Son olarak, çalışma yalnızca *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup, *in vivo* modellerle desteklenmemiştir; dolayısıyla elde edilen sonuçların klinik geçerliliği henüz kanıtlanmamıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, probiyotik kaynaklı CFS' lerin kanser hücreleri üzerinde gösterdiği seçici etkiler ve sağlıklı hücreler üzerindeki düşük toksisite profiliyle kansere karşı umut vaat eden bir tedavi seçeneği olabileceğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda bu sonuçlar ışığında probiyotik bakterilerden elde edilen CFS' lerin klasik kanser tedavilerine yenilikçi bir yaklaşım getirebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Ar-Ge Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* probiyotik suşlarından elde edilen CFS' lerin, insan kolorektal adenokarsinom hücre hatları olan Caco-2 ve HT-29 üzerindeki anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu değerlendirmelerde, sağlıklı bir bağırsak epitelyum hücresi olan CCD841 CoN hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda;

1. *L. bulgaricus* ve *L. paracasei* izolatlarından elde edilen hem canlı hem de inaktif CFS' lerin, kolon kanseri hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) üzerinde anlamlı sitotoksik etkiler gösterdiği MTT belirlendi. Hücresiz süpernatantların;
 - HT-29 hücreleri için IC₅₀ değerleri *L. bulgaricus* %5,255±0,102 (canlı) ve %5,872±0,171 (inaktif); *L. paracasei* %7,714±0,099 (canlı) ve %5,695±0,114 (inaktif) olarak
 - Caco-2 için IC₅₀ değerleri *L. bulgaricus* %6,057±0,138 (canlı) ve %8,530±0,216 (inaktif); *L. paracasei* %5,970±0,039 (canlı) ve %8,430±0,109 (inaktif) olarak belirlendi.
2. Elde edilen sonuçlara göre, probiyotik CFS' lerin uygulandığı kanser hücrelerinde hayatta kalma oranlarının önemli ölçüde düştüğü, buna karşılık sağlıklı kolon epitelyum hücre hattı (CCD841 CoN) üzerinde daha sınırlı toksisite gözlemlendi. Hücresiz süpernatantların;
 - CCD841 CoN IC₅₀ değerleri *L. bulgaricus* %33,196±0,272 (canlı) ve %30,682±0,324 (inaktif); *L. paracasei* %27,802±0,342 (canlı) ve %23,400±0,303 (inaktif) olarak tespit edildi.
3. Probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif CFS' lerin kolon kanseri hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) üzerine IC₅₀ konsantrasyonlarında uygulanması sonrası yapılan floresan boyama AO/PI sonuçlarında kontrol gruplarına kıyasla apoptoza uğrayan hücre sayısını belirgin şekilde arttırdığı tespit edildi. Ayrıca, kanser hücreleri için belirlenen IC₅₀ dozunun, CCD 841 CoN hücrelerinde sitotoksik bir etkiye neden olmadığı belirlendi.

4. Probiyotik bakterilerden elde edilen canlı ve inaktif CFS' lerin, hücre döngüsünün erken aşamasında hücreleri durdurarak anti-proliferatif etkiler sergilediği flow sitometri ile tespit edildi. Probiyotik bakteri izolatlarının canlı ve inaktif CFS' lerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen kanser hücre hatlarında;
 - Hücrelerin G0/G1 fazında birikmesine neden olduğu, bu sayede hücre döngüsünün durdurularak proliferasyonun baskılandığı tespit edildi.
 - Hücre döngüsünün Sub G fazında gözlemlenen artış, hücrelerin döngüyü tamamlamadan ölüm aşamasına geçiş yaptığını ve apoptotik sürecin tetiklediği belirlendi.
 - S fazında gözlemlenen azalma, DNA replikasyonunun inhibe edildiğini ve hücre bölünmesinin durdurulduğunu ortaya koydu. Bu bulgu, hücre bölünmesi sürecinin inhibe edildiğini ve hücre proliferasyonunun engellendiğini desteklemektedir.
 - G2/M fazında görülen azalma, mitoz aşamasındaki hücrelerin ilerlemesini engellendiğini ve hücrelerin büyük oranda G0/G1 fazında biriktiğini gösterdi.
5. İnaktif CFS' lerin, canlı form süpernatantlara kıyasla Bax, Cas 9, Cas 8 ve Cas 3 gibi pro-apoptotik gen ifadelerinde daha belirgin bir artışa neden olduğu tespit edildi.
6. İnaktif CFS' lerin, üç farklı hücre hattında (HT-29, Caco-2 ve CCD841-CoN) Bcl-2 gibi anti-apoptotik gen ifadesinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı görüldü.
7. İnaktif CFS' lerin etkileri, hem kanser hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) hem de normal hücre hattı (CCD841-CoN) üzerinde gözlemlendi ve gen ifadelerindeki değişikliklerin her üç hücre hattında da tutarlı olduğu saptandı.

8. Bu çalışmada elde edilen bulgular, probiyotik bakterilerden elde edilen canlı ve inaktif CFS' lerin antikanser potansiyelini ve özellikle kolon kanseri tedavisini destekleyici terapötik ajan olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

- *İn vivo* modellerde etkinliklerinin değerlendirilmesi ve klinik çalışmalarda güvenlik profillerinin ayrıntılı şekilde incelenmesi, CFS' lerin kanser tedavisinde yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayabilir.
- Apoptoz mekanizmaları ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerin moleküler düzeyde araştırılması, gen ifade analizleriyle desteklenerek bu ajanların etki mekanizmalarının daha kapsamlı şekilde anlaşılmasını mümkün kılabilir.
- Farklı probiyotik suşlar ve farklı kanser hücre hatları üzerinde yapılacak karşılaştırmalı çalışmalar, literatürdeki bilgi eksikliklerini gidermeye ve probiyotiklerin terapötik potansiyeline ait bilgileri artırmaya olanak sağlayabilir.
- CFS' lerin diğer antikanser ajanlarla sinerjistik etkilerinin araştırılması, daha etkili ve seçici tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yeni bir perspektif sunabilir.
- Sağlıklı kolon epitelyum hücrelerinde gözlemlenen düşük toksisite, CFS' lerin güvenli ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında kullanım potansiyelini artırarak bu alanda önemli bir ilerleme sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- AARONS, C. B., SHANMUGAN, S., BLEIER, J. I. 2014. Management of malignant colon polyps: Current status and controversies. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(43): 16178.
- ABDEL-SHAFI, S., AL-MOHAMMADI, A. R., NEGm, S., ENAN, G. 2014. Antibacterial activity of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus isolated from Zabady. *Life Sciences Journal*, 11(8): 264-270.
- ABEDI, A., TAFVIZI, F., JAFARI, P., AKBARI, N. 2024. The inhibition effects of *Lentilactobacillus buchneri*-derived membrane vesicles on AGS and HT-29 cancer cells by inducing cell apoptosis. *Scientific Reports*, 14(1): 3100.
- ABOUELELA, M. E., HELMY, Y. A. 2024. Next-generation probiotics as novel therapeutics for improving human health: Current trends and future perspectives. *Microorganisms*, 12(3): 430.
- ACUÑA, L., CORBALAN, N. S., FERNANDEZ-NO, I. C., MORERO, R. D., BARROS-VELAZQUEZ, J., BELLOMIO, A. 2015. Inhibitory effect of the hybrid bacteriocin Ent35-MccV on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in model and food systems. *Food and Bioprocess Technology*, 8: 1063-1075.
- AGGARWAL, A., PARMAR, A., PANIGRAHI, S. P., VERMA, T., DHYANO, P., BAJYA, S. L., SINGH, M. K. 2024. Exploring the probiotic and prebiotic dynamics of cheese: An updated review. *Annals of Phytomedicine*, 13: 360-369.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E., GARCIA-VARELA, R., GARCIA, H. S., MATA-HARO, V., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F., VALLEJO-CORDOBA, B., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75: 105-114.
- ALAM, W., ULLAH, H., SANTARCANGELO, C., DI MINNO, A., KHAN, H., DAGLIA, M., ARCIOLA, C. R. 2021. Micronutrient food supplements in

patients with gastro-intestinal and hepatic cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15): 8014.

ALEXANDRAKI, V., KAZOU, M., BLOM, J., POT, B., PAPADIMITRIOU, K., TSAKALIDOU, E. 2019. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* support important traits concerning the evolution, biology and technological properties of the species. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2916.

ALLEGRA, C. J., YOTHERS, G., O'CONNELL, M. J., SHARIF, S., PETRELLI, N. J., COLANGELO, L. H., ... WOLMARK, N. 2011. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: Results of NSABP protocol C-08. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1): 11-16.

AMARA, A. A., SHIBL, A. 2015. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2): 107-114.

ANSARI, M. J., JASIM, S. A., TABAN, T. Z., BOKOV, D. O., SHALABY, M. N., AL-GAZALLY, M. E., ... KHATAMI, M. 2023. Anticancer drug-loading capacity of green synthesized porous magnetic iron nanocarrier and cytotoxic effects against human cancer cell line. *Journal of Cluster Science*, 34(1): 467-477.

APÁS, A. L., DUPRAZ, J., ROSS, R., GONZÁLEZ, S. N., ARENA, M. E. 2010. Probiotic administration effect on fecal mutagenicity and microflora in the goat's gut. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5): 537-540.

APOSTOLIDIS, E., KWON, Y. I., GHAEDIAN, R., SHETTY, K. 2007. Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food Biotechnology*, 21(3): 217-236.

ARENA, M. P., SILVAIN, A., NORMANNO, G., GRIECO, F., DRIDER, D., SPANO, G., FIOCCO, D. 2016. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7: 464.

- ARNOLD, M., SIERRA, M. S., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. 2023. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 72(4): 734-745.
- ARORA, M., BALDI, A. 2015. Regulatory categories of probiotics across the globe: A review representing existing and recommended categorization. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33: S2-S10.
- ARTUSA, V., CALABRONE, L., MORTARA, L., PERI, F., BRUNO, A. 2023. Microbiota-derived natural products targeting cancer stem cells: Inside the gut pharma factory. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5): 4997.
- ATLAS, R. M. 1995. *Principles of Microbiology*. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, USA.
- AXELSSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker*, 139: 1-66.
- BACKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L., PETERSON, D. A., GORDON, J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717): 1915-1920.
- BADGELEY, A., ANWAR, H., MODI, K., MURPHY, P., LAKSHMIKUTTYAMMA, A. 2021. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(1): 188494.
- BAGHBANI-ARANI, F., ASGARY, V., HASHEMI, A. 2020. Cell-free extracts of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* display antiproliferative and antioxidant activities against HT-29 cell line. *Nutrition and Cancer*, 72(8): 1390-1399.
- BAGNARDI, V., ROTA, M., BOTTERI, E., TRAMACERE, I., ISLAMI, F., FEDIRKO, V., ... LA VECCHIA, C. 2015. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 112(3): 580-593.

- BAIDOUN, F., ELSHIWY, K., ELKERAIE, Y., MERJANEH, Z., KHOUDARI, G., SARMINI, M. T., ... SAAD, A. 2021. Colorectal cancer epidemiology: Recent trends and impact on outcomes. *Current Drug Targets*, 22(9): 998-1009.
- BANNA, G. L., TORINO, F., MARLETTA, F., SANTAGATI, M., SALEMI, R., CANNAROZZO, E., ... LIBRA, M. 2017. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An overview to explore the rationale of its use in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 603.
- BÄUERL, C., COLLADO, M. C., DIAZ CUEVAS, A., VIÑA, J., PÉREZ MARTÍNEZ, G. 2018. Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Letters in Applied Microbiology*, 66(6): 464-471.
- BENAVENTE, S., SÁNCHEZ-GARCÍA, A., NACHES, S., LLEONART, M. E., LORENTE, J. 2020. Therapy-induced modulation of the tumor microenvironment: New opportunities for cancer therapies. *Frontiers in Oncology*, 10: 582884.
- BENGOA, A. A., LLAMAS, M. G., IRAPORDA, C., DUEÑAS, M. T., ABRAHAM, A. G., GARROTE, G. L. 2018. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiology*, 69: 212-218.
- BENÍTEZ-SERRANO, J. C., HERNÁNDEZ-CASTRO, R., MARTÍNEZ-PÉREZ, L., PALOMARES-RESENDIZ, G., DÍAZ-APARICIO, E., SUÁREZ-GÜEMES, F., ARELLANO-REYNOSO, B. 2023. Effect of the *Lacticaseibacillus paracasei* JLM strain against *Brucella abortus* strains in ripened cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*, 20(5): 169-176.
- BERNARD, K., BURDZ, T., WIEBE, D., BALCEWICH, B. M., ZIMMERMAN, T., LAGACÉ-WIENS, P., ... BERNIER, A. M. 2017. Characterization of isolates of *Eisenbergiella tayi*, a strictly anaerobic Gram-stain variable bacillus recovered from human clinical materials in Canada. *Anaerobe*, 44: 128-132.
- BERTKOVA, I., HIJOVA, E., CHMELAROVA, A., MOJZISOVA, G., PETRASOVA, D., STROJNY, L., ... ZITNAN, R. 2010. The effect of

probiotic microorganisms and bioactive compounds on chemically induced carcinogenesis in rats. *Neoplasma*, 57(5): 422.

BERTOLACCINI, L., OLIVERO, G. 2001. Cancer immunotherapy. A future therapeutical choice? *Minerva Chirurgica*, 56(2): 183-191.

BEVERIDGE, T. J. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3): 111-118.

BILLOO, A. G., MEMON, M. A., KHASKHELI, S. A., MURTAZA, G., IQBAL, K., SHEKHANI, M. S., SIDDIQI, A. Q. 2006. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 12(28): 4557.

BONCZAR, G., WSZOLEK, M., SIUTA, A. 2002. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chemistry*, 79(1): 85-91.

BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3): 229-263.

BRENNER, H., CHANG-CLAUDE, J., JANSEN, L., KNEBEL, P., STOCK, C., HOFFMEISTER, M. 2014. Reduced risk of colorectal cancer up to 10 years after screening, surveillance, or diagnostic colonoscopy. *Gastroenterology*, 146(3): 709-717.

CAGGIANIELLO, G., KLEEREBEZEM, M., SPANO, G. 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 3877-3886.

CAI, Z., GUO, Y., ZHENG, Q., LIU, Z., ZHONG, G., ZENG, L., ... WU, Z. 2024. Screening of a potential probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* NUC08 and its synergistic effects with yogurt starter. *Journal of Dairy Science*, 107(5): 2760-2773.

- CAN, T. H., TUFEKCI, E. F., ALTUNOGLU, Y. C., BALOGLU, M. C., LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., STEFANUCCI, A., ... ZENGİN, G. 2020. Chemical characterization, computational analysis and biological views on *Daphne gnidioides* Jaub. & Spach extracts: Can a new raw material be provided for biopharmaceutical applications? *Computational Biology and Chemistry*, 87: 107273.
- CANI, P. D., MOENS DE HASE, E., VAN HUL, M. 2021. Gut microbiota and host metabolism: From proof of concept to therapeutic intervention. *Microorganisms*, 9(6): 1302.
- CAO, Y., NISHIHARA, R., QIAN, Z. R., SONG, M., MIMA, K., INAMURA, K., ... OGINO, S. 2016. Regular aspirin use associates with lower risk of colorectal cancers with low numbers of tumor-infiltrating lymphocytes. *Gastroenterology*, 151(5): 879-892.
- CARRERO-PUENTES, S., FUENMAYOR, C., JIMÉNEZ-PÉREZ, C., GUZMÁN-RODRÍGUEZ, F., GÓMEZ-RUIZ, L., RODRÍGUEZ-SERRANO, G., ... CRUZ-GUERRERO, A. 2022. Development and characterization of an exopolysaccharide-functionalized acid whey cheese (requesón) using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6): e16095.
- CEYHAN, N., ALIÇ, H. 2012. Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1): 107-113.
- CHALUVADI, S., HOTCHKISS, A. T., YAM, K. L. 2015. Gut microbiota: Impact of probiotics, prebiotics, synbiotics, pharmabiotics, and postbiotics on human health. In *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion* (pp. 515-523). Elsevier Inc.
- CHAN, H. T. 2019. National Commissions on High Quality Health Systems: Activities, challenges, and future directions. *The Lancet. Global Health*, 7(2): e179.

- CHAVDAROV, G., IVANOV, N., SLAVOV, I., LALEVA, S. 2024. Effects of Zoovit probiotic on faecal microbiota in cattle. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 61(1): 11-18.
- CHEN, Y. Y., FEI, F., DING, L. L., WEN, S. Y., REN, C. F., GONG, A. H. 2024. Integrated gut microbiome and metabolome analysis reveals the inhibition effect of *Lactobacillus plantarum* CBT against colorectal cancer. *Food & Function*, 15(2): 853-865.
- CHEN, Y., MIAO, X., XIANG, Y., KUAI, L., DING, X., MA, T., ... FAN, B. 2023. Qin Zhu Liang Xue inhibits IL-6-induced hyperproliferation and inflammation in HaCaT cells by regulating METTL14/SOCS3/STAT3 axis. *Journal of Ethnopharmacology*, 317: 116809.
- CHEN, Z. F., AI, L. Y., WANG, J. L., REN, L. L., YU, Y. N., XU, J., ... FANG, J. Y. 2015. Probiotics *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis. *Future Microbiology*, 10(9): 1433-1445.
- CHEN, Z., DING, C., GU, Y., HE, Y., CHEN, B., ZHENG, S., LI, Q. 2023. Association between gut microbiota and hepatocellular carcinoma from 2011 to 2022: Bibliometric analysis and global trends. *Frontiers in Oncology*, 13: 1120515.
- CHEN, Z., GUAN, D., WANG, Z., LI, X., DONG, S., HUANG, J., ZHOU, W. 2023. Microbiota in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *MedComm*, 4(6), e417.
- CHIU, Y. H., HSIEH, Y. J., LIAO, K. W., PENG, K. C. 2010. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clinical Nutrition*, 29(1): 131-140.
- CHO, Y. S., HAN, K., XU, J., MOON, J. J. 2024. Novel strategies for modulating the gut microbiome for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 115332.
- CHOI, S. S., KIM, Y., HAN, K. S., YOU, S., OH, S., KIM, S. H. 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5): 452-458.

- CHRYSTOSTOMOU, D., ROBERTS, L. A., MARCHESI, J. R., KINROSS, J. M. 2023. Gut microbiota modulation of efficacy and toxicity of cancer chemotherapy and immunotherapy. *Gastroenterology*, 164(2): 198-213.
- CHUAH, L. O., FOO, H. L., LOH, T. C., MOHAMMED ALITHEEN, N. B., YEAP, S. K., ABDUL MUTALIB, N. E., ... YUSOFF, K. 2019. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19: 1-12.
- COHEN, R., COLLE, R., PUDLARZ, T., HERAN, M., DUVAL, A., SVRCEK, M., ANDRÉ, T. 2021. Immune checkpoint inhibition in metastatic colorectal cancer harboring microsatellite instability or mismatch repair deficiency. *Cancers*, 13(5): 1149.
- CONTEDECA, V., SANSONNO, D., RUSSI, S., DAMMACCO, F. 2013. Precancerous colorectal lesions. *International Journal of Oncology*, 43(4): 973-984.
- CORSETTI, A., SETTANNI, L., LÓPEZ, C. C., FELIS, G. E., MASTRANGELO, M., SUZZI, G. 2007. A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(7): 561-571.
- CUI, Y., QU, X. 2021. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. *Trends in Food Science & Technology*, 115: 486-499.
- ÇÜRÜK, G. N., KAÇMAZ, H. Y. 2017. Kolorektal kanserden korunma ve hemşirenin sorumlulukları. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(4): 224-233.
- DAHM, C. C., KEOGH, R. H., SPENCER, E. A., GREENWOOD, D. C., KEY, T. J., FENTIMAN, I. S., ... RODWELL, S. A. 2010. Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case-control study using food diaries. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9): 614-626.

- DAKOWICZ, D., ZAJKOWSKA, M., MROCZKO, B. 2022. Relationship between VEGF family members, their receptors, and cell death in the neoplastic transformation of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6): 3375.
- DAMESHGHIAN, M., TAFVIZI, F., TAJABADI EBRAHIMI, M., HOSSEINI DOUST, R. 2024. Anticancer potential of postbiotic derived from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*: In vitro analysis of breast cancer cell line. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-14.
- DAVID, L. A., MAURICE, C. F., CARMODY, R. N., GOOTENBERG, D. B., BUTTON, J. E., WOLFE, B. E., ... TURNBAUGH, P. J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484): 559-563.
- DE LUCA, L., PIZZOLOGO, F., CALABRESE, M., BLAIOTTA, G., APONTE, M., ROMANO, R. 2024. Addition of glutamine to milk during fermentation by individual strains of lactic acid bacteria and the effects on pyroglutamic and butyric acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 130: 106175.
- DE MAN, J. D., ROGOSA, D., SHARPE, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1): 130-135.
- DE MARCO, G., CAPPELLO, T., MAISANO, M. 2023. Histomorphological changes in fish gut in response to prebiotics and probiotics treatment to improve their health status: A review. *Animals*, 13(18): 2860.
- 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(1): 1756308.
- DEHGHANI, N., TAFVIZI, F., JAFARI, P. 2021. Cell cycle arrest and anti-cancer potential of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* against HT-29 cancer cells. *BioImpacts: BI*, 11(4): 245.

- DEKKER, E., TANIS, P. J., VLEUGELS, J. L., KASI, P. M., WALLACE, M. B. 2019. Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207): 1467-1480.
- DEMİROK, N. T., ALPASLAN, M., YIKMIŞ, S. 2023. Some lactobacillus, leuconostoc and acetobacter strains in traditional Turkish yoghurt, cheese, kefir samples as a probiotic candidate. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 7(2): 326-334.
- DI CAGNO, R., FILANNINO, P., VINCENTINI, O., CANTATORE, V., CAVOSKI, I., GOBBETTI, M. 2019. Fermented *Portulaca oleracea* L. juice: A novel functional beverage with potential ameliorating effects on the intestinal inflammation and epithelial injury. *Nutrients*, 11(2): 248.
- DIKEOCHA, I. J., AL-KABSI, A. M., EID, E. E., HUSSIN, S., ALSHAWSH, M. A. 2022. Probiotics supplementation in patients with colorectal cancer: A systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition Reviews*, 80(1): 22-49.
- DIMITRELLOU, D., KANDYLIS, P., KOURKOUTAS, Y. 2019. Assessment of freeze-dried immobilized *Lactobacillus casei* as probiotic adjunct culture in yogurts. *Foods*, 8(9): 374.
- DIMITROVSKI, D., CENCIČ, A., WINKELHAUSEN, E., LANGERHOLC, T. 2014. *Lactobacillus plantarum* extracellular metabolites: In vitro assessment of probiotic effects on normal and cancerogenic human cells. *International Dairy Journal*, 39(2): 293-300.
- DUAR, R. M., LIN, X. B., ZHENG, J., MARTINO, M. E., GRENIER, T., PÉREZ-MUÑOZ, M. E., ... WALTER, J. 2017. Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1): S27-S48.
- DUFFY, M. J., VAN DALEN, A., HAGLUND, C., HANSSON, L., HOLINSKI-FEDER, E., KLAPDOR, R., ... TOPOLCAN, O. 2007. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European Journal of Cancer*, 43(9): 1348-1360.

- ENANE, F. O., SAUNTHARARAJAH, Y., KORC, M. 2018. Differentiation therapy and the mechanisms that terminate cancer cell proliferation without harming normal cells. *Cell Death & Disease*, 9(9): 912.
- ERFANIAN, N., NASSERI, S., MIRAKI FERIZ, A., SAFARPOUR, H., NAMAEEI, M. H. 2023. Characterization of Wnt signaling pathway under treatment of *Lactobacillus acidophilus* postbiotic in colorectal cancer using an integrated in silico and in vitro analysis. *Scientific Reports*, 13(1): 22988.
- ERKUS, O., OKUKLU, B., YENIDUNYA, A. F., HARSA, S. 2014. High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2): 348-354.
- ESLAMI, M., YOUSEFI, B., KOKHAEI, P., HEMATI, M., NEJAD, Z. R., ARABKARI, V., NAMDAR, A. 2019. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10): 17127-17143.
- FAGHFOORI, Z., FAGHFOORI, M. H., SABER, A., IZADI, A., YARI KHOSROUSHahi, A. 2021. Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 21(1): 258.
- FARAG, M. A., JOMAA, S. A., ABD EL-WAHED, A., EL-SEEDI, H. R. 2020. The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, 12(2): 346.
- FEDIRKO, V., MANDLE, H. B., ZHU, W., HUGHES, D. J., SIDDIQ, A., FERRARI, P., ... JENAB, M. 2019. Vitamin D-related genes, blood vitamin D levels and colorectal cancer risk in western European populations. *Nutrients*, 11(8): 1954.
- FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., LAVERSANNE, M., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I., BRAY, F. 2020. Global cancer observatory: Cancer today. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., LAVERSANNE, M., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I., BRAY, F. 2021.

Global cancer observatory: Cancer today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; *Cancer Tomorrow*.

FILLON, M. 2022. Colonoscopies for patients aged 45–49 years yield positive results. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(6): 507-509.

FLACH, J., VAN DER WAAL, M. B., KARDINAAL, A. F. M., SCHLOESSER, J., RUIJSCHOP, R. M. A. J., CLAASSEN, E. 2018. Probiotic research priorities for the healthy adult population: A review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies lactis BB-12. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1): 1452839.

FONG, W., LI, Q., YU, J. 2020. Gut microbiota modulation: A novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*, 39(26): 4925-4943.

FONG, W., LI, Q., JI, F., LIANG, W., LAU, H. C. H., KANG, X., ... YU, J. 2023. *Lactobacillus gallinarum*-derived metabolites boost anti-PD1 efficacy in colorectal cancer by inhibiting regulatory T cells through modulating IDO1/Kyn/AHR axis. *Gut*, 72(12): 2272-2285.

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.

FRANKEL, A. E., DESHMUKH, S., REDDY, A., LIGHTCAP, J., HAYES, M., MCCLELLAN, S., ... KOH, A. Y. 2019. Cancer immune checkpoint inhibitor therapy and the gut microbiota. *Integrative Cancer Therapies*, 18: 1534735419846379.

GANAL-VONARBURG, S. C., DUERR, C. U. 2020. The interaction of intestinal microbiota and innate lymphoid cells in health and disease throughout life. *Immunology*, 159(1): 39-51.

GÄNZLE, M. G. 2015. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2: 106-117.

- GARBACZ, K. 2022, November. Anticancer activity of lactic acid bacteria. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 86, pp. 356-366). Academic Press.
- GARCÍA-FONCILLAS, J., SUNAKAWA, Y., ADERKA, D., WAINBERG, Z., RONGA, P., WITZLER, P., STINTZING, S. 2019. Distinguishing features of cetuximab and panitumumab in colorectal cancer and other solid tumors. *Frontiers in Oncology*, 9: 849.
- GARCÍA-SANTOS, J. A., NIETO-RUIZ, A., GARCÍA-RICOBARAZA, M., CERDÓ, T., CAMPOY, C. 2023. Impact of probiotics on the prevention and treatment of gastrointestinal diseases in the pediatric population. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11): 9427.
- GARRETT, W. S. 2015. Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230): 80-86.
- GAVZY, S. J., KENSISKI, A., LEE, Z. L., MONGODIN, E. F., MA, B., BROMBERG, J. S. 2023. *Bifidobacterium* mechanisms of immune modulation and tolerance. *Gut Microbes*, 15(2): 2291164.
- GEMECHU, T. 2015. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*, 9(4): 170-175.
- GERLIER, D., THOMASSET, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1-2): 57-63.
- GHADIRI, N., JAVIDAN, M., SHEIKHI, S., TAŞTAN, Ö., PARODI, A., LIAO, Z., ... GANJALIKHANI-HAKEMI, M. 2024. Bioactive peptides: an alternative therapeutic approach for cancer management. *Frontiers in Immunology*, 15: 1310443.
- GHOLIZADEH, P., FAGHFOURI, A. H., FURNERI, P. M., FAGHFURI, E. 2024. Probiotics and their metabolites in cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 15: 1497524.
- GHORBANI, E., AVAN, A., RYZHIKOV, M., FERNS, G., KHAZAEI, M., SOLEIMANPOUR, S. 2022. Role of *Lactobacillus* strains in the management of colorectal cancer: An overview of recent advances. *Nutrition*, 103: 111828.

- GOGINENI, V. K., MORROW, L. E., MALESKER, M. A. 2013. Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *J Prob Health*, 1(101): 2.
- GOMAA, E. Z. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: A review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12): 2019-2040.
- GONZALES, K. N., TRONCOSO, O. P., TORRES, F. G., LÓPEZ, D. 2020. Molecular α -relaxation process of exopolysaccharides extracted from *Nostoc commune* cyanobacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161: 1516-1525.
- GÖZÜM, S. 2018. Determination of colorectal cancer risk levels, colorectal cancer screening rates, and factors affecting screening participation of individuals working in agriculture in Turkey. *Cancer Nursing*, 41(4): E46-E54.
- GRAFF, R. E., MÖLLER, S., PASSARELLI, M. N., WITTE, J. S., SKYTTE, A., CHRISTENSEN, K., ... HJELMBORG, J. B. 2017. Familial risk and heritability of colorectal cancer in the Nordic twin study of cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(8): 1256-1264.
- GRAM, C. 1884. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2: 185-189.
- HAJI MEHDI NOURI, Z., TAFVIZI, F., AMINI, K., KHANDANDEFZOLI, N., KHEIRKHAH, B. 2023. Antiproliferative potential of *Lactobacillus casei* supernatant against MCF-7 breast cancer and HT-29 colorectal cancer cell lines. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 12(2): 216-225.
- HALKMAN, K. 2005. *Food microbiology practices*. Ankara: Merck.
- HAMMES, W. P., HERTEL, C. 2009. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3: 465-490.
- 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.

- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. 2022. The hallmarks of cancer. *Cell*, 186(2): 276-298.
- HANCOCK, R. E., SAHL, H. G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12): 1551-1557.
- HASANNEJAD BIBALAN, M., ESHAGHI, M., ROHANI, M., ESGHAEI, M., DARBAN-SAROKHALIL, D., POURSHAFIE, M. R., TALEBI, M. 2017. Isolates of *Lactobacillus plantarum* and *L. reuteri* display greater antiproliferative and antipathogenic activity than other *Lactobacillus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 66(10): 1416-1420.
- HASSAN, Z., MUSTAFA, S., RAHIM, R. A., ISA, N. M. 2016. Anti-breast cancer effects of live, heat-killed and cytoplasmic fractions of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus hominis* isolated from human breast milk. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52: 337-348.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., GÓMEZ, J., DELGADO, S., REQUENA-LÓPEZ, S., QUEIRO-SILVA, R., MARGOLLES, A., ... COTO-SEGURA, P. 2019. Gut microbiota dysbiosis in a cohort of patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 181(6): 1287-1295.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., SÁNCHEZ, B., MILANI, C., VENTURA, M., MARGOLLES, A., RUAS-MADIEDO, P. 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1): 9-18.
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., ... SANDERS, M. E. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8): 506-514.
- HILL, D., SUGRUE, I., TOBIN, C., HILL, C., STANTON, C., ROSS, R. P. 2018. The *Lactobacillus casei* group: History and health-related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2107.

- HIRAYAMA, K., RAFTER, J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2(t6): 681-686.
- HIROHASHI, S., BLUM, H. E., ISHAK, K. G., HAMILTON, S. R., AALTONEN, L. A. 2000. World Health Organization classification of tumors pathology and genetics tumors of the digestive system. *Paris*, 157-172.
- HOLZAPFEL, W. H., WOOD, B. J. (Eds.). 2014. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.
- HOSSAIN, M. S., KARUNIAWATI, H., JAIROUN, A. A., URBI, Z., OOI, D. J., JOHN, A., ... HADI, M. A. 2022. Colorectal cancer: A review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, 14(7): 1732.
- HOŞBUL, T., GÜMRAL, R., BEKTÖRE, B., TEKIN, K., ŞAHİNER, F. 2020. *Candida parapsilosis* isolates' resistance to cold storage conditions: Revival after a decade of preservation.
- HOWARD, A. 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 6: 216-273.
- HOXHA, R., TODOROV, D., HINKOV, A., SHISHKOVA, K., EVSTATIEVA, Y., NIKOLOVA, D. 2023. In vitro screening of antiviral activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *Microbiology Research*, 14(1): 333-342.
- HU, P., SONG, W., SHAN, Y., DU, M., HUANG, M., SONG, C., ZHANG, L. 2015. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M5L induces cell cycle arrest and calreticulin translocation via the generation of reactive oxygen species in HT-29 cell apoptosis. *Food & Function*, 6(7): 2257-2265.
- HU, Y. Z., WU, C. S., WANG, J., HAN, X. Q., SI, P. Y., ZHANG, Y. A., ZHANG, X. J. 2024. Antimicrobial protein LECT2-b helps maintain gut microbiota homeostasis via selectively targeting certain pathogenic bacteria. *The Journal of Immunology*, 212(1): 81-95.

- HUANG, L., SHAN, Y. J., HE, C. X., REN, M. H., TIAN, P. J., SONG, W. 2016. Effects of *L. paracasei* subsp. *paracasei* X12 on cell cycle of colon cancer HT-29 cells and regulation of mTOR signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 21: 431-439.
- HUANG, M., LU, J. J., DING, J. 2021. Natural products in cancer therapy: Past, present, and future. *Natural Products and Bioprospecting*, 11(1): 5-13.
- HUSSAIN, F. H. N., RAZA, A. 2024. Immune checkpoint inhibitors in cancer immunotherapy. In *Critical Developments in Cancer Immunotherapy* (pp. 123-156). IGI Global.
- HWANG, S. W., KIM, M. K., KWEON, M. N. 2023. Gut microbiome on immune checkpoint inhibitor therapy and consequent immune-related colitis: A review. *Intestinal Research*, 21(4): 433-442.
- HÝŽD'ALOVÁ, M., HOFMANOVÁ, J., PACHERNÍK, J., VACULOVA, A., KOZUBÍK, A. 2008. The interaction of butyrate with TNF- α during differentiation and apoptosis of colon epithelial cells: Role of NF- κ B activation. *Cytokine*, 44(1): 33-43.
- IMPERIALE, T. F., RANSOHOFF, D. F., ITZKOWITZ, S. H., TURNBULL, B. A., ROSS, M. E. 2004. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *New England Journal of Medicine*, 351(26): 2704-2714.
- ISMAEL, N. E., EL SHEIKH, S. A., TALAAT, S. M., SALEM, E. M. 2017. Mismatch repair proteins and microsatellite instability in colorectal carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2): Histopathological and immunohistochemical study. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(1): 9-13.
- JAIN, S., MAQUE, J., GALOOSIAN, A., OSUNA-GARCIA, A., MAY, F. P. 2022. Optimal strategies for colorectal cancer screening. *Current Treatment Options in Oncology*, 23(4): 474-493.
- JENA, R., CHOUDHURY, P. K. 2023. Bifidobacteria in fermented dairy foods: A health beneficial outlook. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-22.

- JESS, T., SIMONSEN, J., JØRGENSEN, K. T., PEDERSEN, B. V., NIELSEN, N. M., FRISCH, M. 2012. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*, 143(2): 375-381.
- Ji, X., PENG, Q., WANG, M. 2018. Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114: 1127-1133.
- JING, N., WANG, L., ZHUANG, H., JIANG, G., LIU, Z. 2023. Enhancing therapeutic effects of murine cancer vaccine by reshaping gut microbiota with *Lactobacillus rhamnosus* GG and jujube powder. *Frontiers in Immunology*, 14: 1195075.
- JOHNS, L. E., HOULSTON, R. S. 2001. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 96(10): 2992-3003.
- JOHNSON, P. A., MENEGATTI, S., CHAMBERS, A. C., ALIBHAI, D., COLLARD, T. J., WILLIAMS, A. C., ... PERRIMAN, A. W. 2022. A rapid high throughput bioprinted colorectal cancer spheroid platform for in vitro drug-and radiation-response. *Biofabrication*, 15(1): 014103.
- JONES, J. C., CIOMBOR, K. K. 2021. Addressing resistance to targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Oncology*.
- KARIMI ARDESTANI, S., TAFVIZI, F., TAJABADI EBRAHIMI, M. 2019. Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway. *Human & Experimental Toxicology*, 38(9): 1069-1081.
- KASILINGAM, N., MUTHUSAMY, S., SYLVESTER, S. M. S., ALAGARSAMY, P. 2023. Preparation of postbiotics from *Lactococcus* spp. In *Postbiotics* (pp. 55-59). New York, NY: Springer US.
- 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.

- KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA, K., ROVIELLO, G., CATALANO, M., POLOM, K. 2021. Gut microbiota modulation in the context of immune-related aspects of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in gastrointestinal cancers. *Nutrients*, 13(8): 2674.
- KEUM, N., GIOVANNUCCI, E. 2019. Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(12): 713-732.
- KHALEEL, S. M., SHANSHAL, S. A., KHALAF, M. M. 2023. The role of probiotics in colorectal cancer: A review. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 54(4): 1202-1211.
- KIESSLING, R., WASSERMAN, K., HORIGUCHI, S., KONO, K., SJÖBERG, J., PISA, P., PETERSSON, M. 1999. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48: 353-362.
- KIM, J., LEE, H. K. 2022. Potential role of the gut microbiome in colorectal cancer progression. *Frontiers in Immunology*, 12: 807648.
- KIM, W. J., JUNG, G., KIM, T., KIM, J., HURH, B. S., KIM, H., SOUNG, D. Y. 2024. Heat-killed *Lactobacillus paracasei* SMB092 reduces halitosis by stimulating the expression of β -defensins in oral keratinocytes. *Microorganisms*, 12(11): 2147.
- KLAENHAMMER, T. R., KLEEREBEZEM, M., KOPP, M. V., RESCIGNO, M. 2012. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(10): 728-734.
- KLEEREBEZEM, M., HOLS, P., BERNARD, E., ROLAIN, T., ZHOU, M., SIEZEN, R. J., BRON, P. A. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2): 199-230.
- KOBAYASHI, H., KANMANI, P., ISHIZUKA, T., MIYAZAKI, A., SOMA, J., ALBARRACIN, L., ... KITAZAWA, H. 2017. Development of an in vitro immunobiotic evaluation system against rotavirus infection in bovine intestinal epitheliocytes. *Beneficial Microbes*, 8(2): 309-321.

- KOGA, Y., OHTSU, T., KIMURA, K., ASAMI, Y. 2019. Probiotic *L. gasseri* strain (LG21) for the upper gastrointestinal tract acting through improvement of indigenous microbiota. *BMJ Open Gastroenterology*, 6(1): e000314.
- KONISHI, F., MORSON, B. C. 1982. Pathology of colorectal adenomas: A colonoscopic survey. *Journal of Clinical Pathology*, 35(8): 830-841.
- KUIPERS, E. J., ET AL. 2015. Colorectal cancer: A review of the biology, prevention, and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(9): 573-584.
- KUMAR, P., NAGARAJAN, A., UCHIL, P. D. 2018. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6): pdb-prot095505.
- KUMARI, A., ANGMO, K., MONIKA, BHALLA, T. C. 2016. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 2463-2475.
- LATH, A., SANTAL, A. R., KAUR, N., KUMARI, P., SINGH, N. P. 2023. Anti-cancer peptides: Their current trends in the development of peptide-based therapy and anti-tumor drugs. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 39(1): 45-84.
- LAZAR, V., DITU, L. M., PIRCALABIORU, G. G., GHEORGHE, I., CURUTIU, C., HOLBAN, A. M., ... CHIFIRIUC, M. C. 2018. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. *Frontiers in Immunology*, 9: 1830.
- LEAL-ESTEBAN, L. C., FAJAS, L. 2020. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(5): 165715.
- LEE, C. G., CHA, K. H., KIM, G. C., IM, S. H., KWON, H. K. 2023. Exploring probiotic effector molecules and their mode of action in gut-immune interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(4): fuad046.

- LEE, W. J., LUCEY, J. A. 2010. Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9): 1127-1136.
- LEE, Y. K. 2009. Selection and maintenance of probiotic microorganisms. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*; Lee, YK, Salminen, S. (Eds), 177-187.
- LI, L., FU, S., WANG, J., LU, J., TAO, Y., ZHAO, L., ... WANG, Z. 2024. SRT1720 inhibits bladder cancer cell progression by impairing autophagic flux. *Biochemical Pharmacology*, 222: 116111.
- LIEBERMAN, D. 2021. Challenges for colorectal cancer screening decision modeling. *Gastrointestinal Endoscopy*, 94(2): 391-393.
- LIU, C. F., PAN, T. M. 2010. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2): 8.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LLOYD-PRICE, J., ABU-ALI, G., HUTTENHOWER, C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8: 1-11.
- LÓPEZ-GÓMEZ, L., ALCORTA, A., ABALO, R. 2023. Probiotics and probiotic-like agents against chemotherapy-induced intestinal mucositis: a narrative review. *Journal of Personalized Medicine*, 13(10): 1487.
- MACRAE, F. A., GOLDBERG, R. M., SERES, D. 2016. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. *UpToDate*, updated June 9, 2017.
- MAGHSOOD, F., JOHARI, B., ROHANI, M., MADANCHI, H., SALTANATPOUR, Z., KADIVAR, M. 2020. Anti-proliferative and anti-metastatic potential of high molecular weight secretory molecules from probiotic *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatant against human colon cancer stem-like cells (HT29-ShE). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26: 2619-2631.

- MAKAROVA, K., SLEAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B., KOONIN, E., ... MILLS, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42): 15611-15616.
- MALUMBRES, M., BARBACID, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3): 153-166.
- MARKOWIAK, P., ŚLIŻEWSKA, K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9): 1021.
- MARKOWIAK-KOPEĆ, P., ŚLIŻEWSKA, K., LIPIŃSKI, K. 2022. Insight into dominant intestinal microbiota and the fatty acids profile of turkeys following the administration of synbiotic preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(12): 5272-5287.
- 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.
- MATTHEWS, H. K., BERTOLI, C., DE BRUIN, R. A. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1): 74-88.
- MEGO, M., DANIS, R., CHOVANEC, J., JURISOVA, S., BYSTRICKY, B., PORSOK, S., ... DRGONA, L. 2023. Randomized double-blind, placebo-controlled multicenter phase III study of prevention of irinotecan-induced diarrhea by a probiotic mixture containing *Bifidobacterium* BB-12® and *Lactobacillus rhamnosus* LGG® in colorectal cancer patients. *Frontiers in Oncology*, 13: 1168654.
- MELEKOĞLU, A., EKICI, H., ARAT, E., KARAHAN, S. 2020. Evaluation of melamine and cyanuric acid cytotoxicity: an in vitro study on L929 fibroblasts and CHO cell line. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67(4): 399-406.

- MILLER, B. C., MATHAI, M., YADAV, H., JAIN, S. 2024. Geroprotective potential of microbiome modulators in the *Caenorhabditis elegans* model. *GeroScience*, 46(1): 129-151.
- MINJ, J., CHANDRA, P., PAUL, C., SHARMA, R. K. 2021. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(13): 2207-2224.
- MOLSKA, M., REGUŁA, J. 2019. Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal cancer. *Nutrients*, 11(10): 2453.
- MOORE, S. C., LEE, I. M., WEIDERPASS, E., CAMPBELL, P. T., SAMPSON, J. N., KITAHARA, C. M., ... PATEL, A. V. 2016. Association of leisure-time physical activity with risk of 26 types of cancer in 1.44 million adults. *JAMA Internal Medicine*, 176(6): 816-825.
- MORGADO, S., SILVA, M., FONSECA, O., ROQUE, F., MORGADO, M. 2022. Targeted therapy for metastatic colorectal cancer: what do we currently have in clinical practice?. *Drugs & Therapy Perspectives*, 38(5): 222-234.
- MOSKOVA-DOUMANOVA, V., MITEVA, G., DIMITROVA, M., TOPOUZOVA-HRISTOVA, T., KAPCHINA, V. 2012. Methanol and chloroform extracts from *Lamium album* L. affect cell properties of A549 cancer lung cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(sup1): 120-125.
- 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.
- MUNRO, A. J., LAIN, S., LANE, D. P. 2005. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *British Journal of Cancer*, 92(3): 434-444.
- NIAMAH, A. K., AL-SAHLANY, S. T. G., VERMA, D. K., SHUKLA, R. M., PATEL, A. R., TRIPATHY, S., ... AGUILAR, C. N. 2024. Emerging lactic

acid bacteria bacteriocins as anti-cancer and anti-tumor agents for human health. *Heliyon*, 10(17).

NOWAK, A., ZAKŁOS-SZYDA, M., ROSICKA-KACZMAREK, J., MOTYL, I. 2022. Anticancer potential of post-fermentation media and cell extracts of probiotic strains: an in vitro study. *Cancers*, 14(7): 1853.

O'FLAHERTY, S., COBIAN, N., BARRANGOU, R. 2023. Impact of pomegranate on probiotic growth, viability, transcriptome, and metabolism. *Microorganisms*, 11(2): 404.

O'SULLIVAN, J. N., O'CONNOR, P. M. 2021. Nisin variants from *Streptococcus* and *Staphylococcus* successfully express in *Lactococcus lactis* NZ9800. Discovery and molecular characterisation of novel bacteriocins, 126.

O'CONNELL, L. M., KELLEHER, P., VAN RIJSWIJCK, I. M., DE WAAL, P., VAN PEIJ, N. N., MAHONY, J., VAN SINDEREN, D. 2022. Natural transformation in Gram-positive bacteria and its biotechnological relevance to lactic acid bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*, 13(1): 409-431.

O'KEEFE, S. J. 2016. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(12): 691-706.

O'MAHONY, L., O'SHEA, E., O'CONNOR, E. M., TIERNEY, A., HARKIN, M., HARRINGTON, J., ... TIMMONS, S. 2023. A qualitative study of older adults' and healthcare professionals' perspectives on the potential of functional food products to support healthy ageing. *Journal of Functional Foods*, 107: 105689.

OMIDI SARAJAR, B., ALIZADEH, A., MORADI, M., IRANNEJAD, V. S. 2023. Effects of postbiotics from food probiotic and protective cultures on proliferation and apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Applied Food Biotechnology*, 10(2): 85-101.

OOI, L. G., LIONG, M. T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6): 2499-2522.

- OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. 2004. The probiotic potential of propionibacteria. *Food Science and Technology-New York- Marcel Dekker*, 139: 159-174.
- OYENIRAN, A., GYAWALI, R., ALJALOU, S. O., KRASTANOV, A., IBRAHIM, S. A. 2020. Probiotic characteristics and health benefits of the yogurt bacterium *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. In *Current Issues and Challenges in the Dairy Industry*. IntechOpen.
- OZCAN, T., YILMAZ-ERSAN, L., KESER, R. A. 2024. The effect of plant mucilaginous gel polysaccharides on oxidative tolerance and fermentation of dietetic yoghurts. *Mljekarstvo: Časopis za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*, 74(1): 22-32.
- PAHUMUNTO, N., TEANPAISAN, R. 2023. Anti-cancer properties of potential probiotics and their cell-free supernatants for the prevention of colorectal cancer: An in vitro study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(5): 1137-1150.
- PANDA, S. K., RAY, S., NAYAK, S., BEHERA, S., BHANJA, S., ACHARYA, V. 2019. A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. *J. Med. Sci*, 5: 88-95.
- PAPADIMITRIOU, K., ALEGRÍA, Á., BRON, P. A., DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M., KLEEREBEZEM, M., ... KOK, J. 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3): 837-890.
- PATEL, S. G., MAY, F. P., ANDERSON, J. C., BURKE, C. A., DOMINITZ, J. A., GROSS, S. A., ... ROBERTSON, D. J. 2022. Updates on age to start and stop colorectal cancer screening: recommendations from the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 162(1): 285-299.
- PENG, F., HU, M., SU, Z., HU, L., GUO, L., YANG, K. 2024. Intratumoral microbiota as a target for advanced cancer therapeutics. *Advanced Materials*, 36(38): 2405331.

- PEREZ-GARCIA, J. 2009. Advances in targeted therapies for metastatic colorectal cancer. *Clinical Practice*, 6(3): 321.
- PESSIONE, E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 86.
- PLAZA-DIAZ, J., RUIZ-OJEDA, F. J., GIL-CAMPOS, M., GIL, A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10: S49-S66.
- PODDAR, D., DAS, S., JONES, G., PALMER, J., JAMESON, G. B., HAVERKAMP, R. G., SINGH, H. 2014. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *International Dairy Journal*, 39(1): 1-7.
- POURALI, G., KAZEMI, D., POURALI, R., RAHMANI, N., RAZZAGHI, E., MAFTOOH, M., ... AVAN, A. 2023. Bioactive peptides: Potential impact on the treatment of gastrointestinal cancers. *Current Pharmaceutical Design*, 29(31): 2450-2460.
- PRAKASH, S., RODES, L., COUSSA-CHARLEY, M., TOMARO-DUCHESNEAU, C. 2011. Gut microbiota: Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets and Therapy*, 71-86.
- RAFTER, J. 2003. Probiotics and colon cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5): 849-859.
- RAGNHAMMAR, P., MASUCCI, G., FRÖDIN, J. E., HJELM, A. L., MELLESTEDT, H. 1992. Cytotoxic functions of blood mononuclear cells in patients with colorectal carcinoma treated with mAb 17-1A and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 35: 158-164.
- RAJOKA, M. S. R., ZHAO, H., LU, Y., LIAN, Z., LI, N., HUSSAIN, N., ... SHI, J. 2018. Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from human breast milk. *Food & Function*, 9(5): 2705-2715.

- RANJBAR, S., SEYEDNEJAD, S. A., AZIMI, H., REZAEIZADEH, H., RAHIMI, R. 2019. Emerging roles of probiotics in prevention and treatment of breast cancer: A comprehensive review of their therapeutic potential. *Nutrition and Cancer*, 71(1): 1-12.
- RAWLA, P., SUNKARA, T., BARSOUK, A. 2019. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2): 89-103.
- RESCIGNO, M. 2008. The pathogenic role of intestinal flora in IBD and colon cancer. *Current Drug Targets*, 9(5): 395-403.
- RIBAS, A., HAINING, W. N., SCHUMACHER, T. N. 2022. When cancer cells become the enablers of an antitumor immune response. *Cancer Discovery*, 12(10): 2244-2248.
- RINNINELLA, E., RAOUL, P., CINTONI, M., FRANCESCHI, F., MIGGIANO, G. A. D., GASBARRINI, A., MELE, M. C. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1): 14.
- ROSENBERG, E., ZILBER-ROSENBERG, I. 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6: 1-14.
- RUBIO, C. A., JARAMILLO, E., LINDBLOM, A., FOGT, F. 2002. Classification of colorectal polyps: guidelines for the endoscopist. *Endoscopy*, 34(03): 226-236.
- SABRI, S. H., MAHANI, S. E., AL-SHAMMARI, A. M., NEJAD, M. A. 2024. *Lactobacillus plantarum* and its derived bacteriocin exhibits potent antitumor activity against esophageal cancer cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 13(3): 286.
- SADEGHI-ALIABADI, H., MOHAMMADI, F., FAZELI, H., MIRLOHI, M. 2014. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(10): 815.

- SAGAR, S., MORGAN, M. E., CHEN, S., VOS, A. P., GARSSSEN, J., VAN BERGENHENEGOUWEN, J., ... FOLKERTS, G. 2014. *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus rhamnosus* treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma. *Respiratory Research*, 15: 1-17.
- SALEK, S., MOAZAMIAN, E., MOHAMMADI BARDBORI, A., SHAMSDIN, S. A. 2024. The anticancer effect of potential probiotic *L. fermentum* and *L. plantarum* in combination with 5-fluorouracil on colorectal cancer cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(5): 139.
- SALEMI, R., VIVARELLI, S., RICCI, D., SCILLATO, M., SANTAGATI, M., GATTUSO, G., ... LIBRA, M. 2023. *Lactobacillus rhamnosus* GG cell-free supernatant as a novel anti-cancer adjuvant. *Journal of Translational Medicine*, 21(1): 195.
- SANDERS, D. J., INNIS, S., SEBEPOS-ROGERS, G., RAHMAN, F. Z., SMITH, A. M. 2021. The role of the microbiome in gastrointestinal inflammation. *Bioscience Reports*, 41(6): BSR20203850.
- SANDERS, M. E., MERENSTEIN, D. J., REID, G., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A. 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10): 605-616.
- SANDERS, M. E., MERENSTEIN, D., MERRIFIELD, C. A., HUTKINS, R. 2018. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3): 212-225.
- SAUS, E., IRAOLA-GUZMÁN, S., WILLIS, J. R., BRUNET-VEGA, A., GABALDÓN, T. 2019. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Molecular Aspects of Medicine*, 69: 93-106.
- SAXELIN, M., TYNKKYNEN, S., MATTILA-SANDHOLM, T., DE VOS, W. M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2): 204-211.

- SCHLEIFER, K. H. 2009. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(8): 533-542.
- SCHUSTER, S. J., NEELAPU, S. S., GAUSE, B. L., JANIK, J. E., MUGGIA, F. M., GOCKERMAN, J. P., ... KWAK, L. W. 2011. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(20): 2787-2794.
- SCHWABE, R. F., JOBIN, C. 2013. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(11): 800-812.
- SEBER, E. S., SIRIN, D. Y., YETİŞYİĞİT, T., BİLGİN, T. 2020. Piperlongumine increases the apoptotic effect of doxorubicin and paclitaxel in a cervical cancer cell line. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 23(3): 386-391. DOI: 10.4103/njcp.njcp_80_19.
- SEDDIK, H. A., BENDALI, F., GANCEL, F., FLISS, I., SPANO, G., DRIDER, D. 2017. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9: 111-122.
- SHARMA, P., BHARDWAJ, P., SINGH, R. 2016. Administration of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* ameliorated hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in diabetic rats. *International Journal of Preventive Medicine*, 7(1): 102.
- SHAUKAT, A., LEVIN, T. R. 2022. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(8): 521-531
- SHAUKAT, A., LEVIN, T. R., CHURCH, T. R. 2024. Screening for colorectal cancer in asymptomatic average-risk adults. *Annals of Internal Medicine*, 177(3): 542-543.
- SHREINER, A. B., KAO, J. Y., YOUNG, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1): 69-75.
- SHUKLA, R., ILLIEV, I., GOYAL, A. 2014. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 3(1).

- SHUSSMAN, N., WEXNER, S. D. 2014. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology Report*, 2(1): 1-15.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1): 7-30.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., GODING SAUER, A., FEDEWA, S. A., BUTTERLY, L. F., ANDERSON, J. C., ... JEMAL, A. 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(3): 145-164.
- SINGH, B., MAL, G., KALRA, R. S., MAROTTA, F. 2024. Probiotics to prevent lifestyle and metabolic diseases. In *Probiotics as Live Biotherapeutics for Veterinary and Human Health, Volume 2: Functional Foods and Post-Genomics* (pp. 227-254). Cham: Springer Nature Switzerland.
- SIVAMARUTHI, B. S., KESIKA, P., CHAIYASUT, C. 2020. The role of probiotics in colorectal cancer management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1): 3535982.
- ŚLIŻEWSKA, K., MARKOWIAK-KOPEĆ, P., ŚLIŻEWSKA, W. 2020. The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers*, 13(1): 20.
- SMITH, H. G., NILSSON, P. J., SHOGAN, B. D., HARJI, D., GAMBACORTA, M. A., ROMANO, A., ... QVORTRUP, C. 2024. Neoadjuvant treatment of colorectal cancer: Comprehensive review. *BJS Open*, 8(3): zrae038.
- SOMMER, F., BÄCKHED, F. 2013. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4): 227-238.
- SPACOVA, I., BINDA, S., TER HAAR, J. A., HENOUD, S., LE GRAIN-RASPAUD, S., DEKKER, J., ... OUWEHAND, A. C. 2023. Comparing technology and regulatory landscape of probiotics as food, dietary supplements and live biotherapeutics. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1272754.
- SRIKHAM, K., DAENGPROK, W., NIAMSUP, P., THIRABUNYANON, M. 2021. Characterization of *Streptococcus salivarius* as new probiotics derived from human breast milk and their potential on proliferative inhibition of liver and

- breast cancer cells and antioxidant activity. *Frontiers in Microbiology*, 12: 797445.
- STEFANOVIC, E. 2017. *Lactobacillus paracasei*: An evaluation of the flavour diversification potential of the species through genomics, metabolomics and applications.
- STOCKERT, J. C., HOROBIN, R. W., COLOMBO, L. L., BLÁZQUEZ-CASTRO, A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3): 159-167.
- STRATE, L. L., SYNGAL, S. 2005. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes & Control*, 16: 201-213.
- STUDZIŃSKA-SROKA, E., MAJCHRZAK-CELIŃSKA, A., ZALEWSKI, P., SZWAJGIER, D., BARANOWSKA-WÓJCIK, E., KAPRON, B., ... CIELECKA-PIONTEK, J. 2021. Lichen-derived compounds and extracts as biologically active substances with anticancer and neuroprotective properties. *Pharmaceuticals*, 14(12): 1293.
- SUEZ, J., ZMORA, N., ZILBERMAN-SCHAPIRA, G., MOR, U., DORI-BACHASH, M., BASHIARDES, S., ... ELINAV, E. 2018. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*, 174(6): 1406-1423.
- SUGIMURA, N., LI, Q., CHU, E. S. H., LAU, H. C. H., FONG, W., LIU, W., ... YU, J. 2022. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut*, 71(10): 2011-2021.
- SULLIVAN, R. J., WEBER, J. S. 2022. Immune-related toxicities of checkpoint inhibitors: Mechanisms and mitigation strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(7): 495-508.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A., BRAY, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN

estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209-249.

ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., BEGANOVIĆ, J., LEOŠ PAVUNC, A., HABJANIČ, K., MATOŠIĆ, S. 2010. Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3): 296-307.

SUZZI, G., CORSETTI, A. 2020. Food microbiology: the past and the new challenges for the next 10 years. *Frontiers in Microbiology*, 11: 237.

ŞANLIER, N., GÖKCEN, B. B., SEZGIN, A. C. 2019. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3): 506-527.

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI, HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, KANSER DAİRESİ BAŞKANLIĞI. 2018. Türkiye Kanser İstatistikleri 2018. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2018.pdf]. Erişim Tarihi: 13/11/2024.

TAKADA, K., BUTI, S., BERSANELLI, M., SHIMOKAWA, M., TAKAMORI, S., MATSUBARA, T., ... YOSHIZUMI, T. 2022. Antibiotic-dependent effect of probiotics in patients with non-small cell lung cancer treated with PD-1 checkpoint blockade. *European Journal of Cancer*, 172: 199-208.

TARRAH, A., DOS SANTOS CRUZ, B. C., SOUSA DIAS, R., DA SILVA DUARTE, V., PAKROO, S., LICURSI DE OLIVEIRA, L., ... OLIVEIRA DE PAULA, S. 2021. *Lactobacillus paracasei* DTA81, a cholesterol-lowering strain having immunomodulatory activity, reveals gut microbiota regulation capability in BALB/c mice receiving high-fat diet. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4): 1942-1957.

TEMİZ, A. 2010. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi.

TERPOU, A., PAPADAKI, A., BOSNEA, L., KANELAKI, M., KOPSAHELIS, N. 2019. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. *LWT*, 105: 242-249.

- TERRY, M. B., NEUGUT, A. I., BOSTICK, R. M., POTTER, J. D., HAILE, R. W., FENOGLIO-PREISER, C. M. 2002. Reliability in the classification of advanced colorectal adenomas. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 11(7): 660-663.
- THODA, C., TOURAKI, M. 2023. Probiotic-derived bioactive compounds in colorectal cancer treatment. *Microorganisms*, 11(8): 1898.
- THOMAS, C. R., PAUL, G. C. 1996. Applications of image analysis in cell technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(1): 35-45.
- THOMPSON, N., MORLEY-BUNKER, A., MCLAUCHLAN, J., GLYN, T., EGLINTON, T. 2024. Use of artificial intelligence for the prediction of lymph node metastases in early-stage colorectal cancer: systematic review. *BJS Open*, 8(2): zrae033.
- TIAN, X., LIU, X., ZHANG, Y., CHEN, Y., HANG, H., CHU, J., ZHUANG, Y. 2021. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Bioresource Technology*, 323: 124549.
- TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H., ŠTĚPÁNKOVÁ, R., KOZÁKOVÁ, H., HUDCOVIC, T., VANNUCCI, L., TUČKOVÁ, L., ... FUNDA, D. P. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(2): 110-120.
- TOKUR, O., AKSOY, A. 2017. *In vitro* sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1): 112-118.
- TRIPATHY, A., DASH, J., KANCHARLA, S., KOLLI, P., MAHAJAN, D., SENAPATI, S., JENA, M. K. 2021. Probiotics: a promising candidate for management of colorectal cancer. *Cancers*, 13(13): 3178.
- TSILIDIS, K. K., ALLEN, N. E., APPLEBY, P. N., ROHRMANN, S., NÖTHLINGS, U., ARRIOLA, L., ... KEY, T. J. 2015. Diabetes mellitus and risk of prostate

- cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer*, 136(2): 372-381.
- 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): 8268.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R., GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122): 1027-1031.
- TURNBAUGH, P. J., RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., KNIGHT, R., GORDON, J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*, 1(6): 6ra14.
- UYMAZ, B. 2010. Probiyotikler ve kullanım alanları. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 16(1).
- VACHKOVA, E., PETROVA, V., GRIGOROVA, N., IVANOVA, Z., BEEV, G. 2023. Evaluation of the anticancer and probiotic potential of autochthonous (wild) *Lactocaseibacillus paracasei* strains from new ecological niches as a possible additive for functional dairy foods. *Foods*, 12(1): 185.
- VAN CUTSEM, E., CERVANTES, A., ADAM, R., SOBRERO, A., VAN KRIEKEN, J. H., ADERKA, D., ... ARNOLD, D. 2016. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 27(8): 1386-1422.
- VERMA, R., SAXENA, G. 2022. Beneficence of probiotics and prebiotics for human health: a review. *Annals: Food Science & Technology*, 23(2).
- VON WRIGHT, A., AXELSSON, L. 2019. Lactic acid bacteria: an introduction. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 1-16). CRC Press.
- WALDNER, M. J., NEURATH, M. F. 2010. The molecular therapy of colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(2): 171-178.

- WANG, J., JI, H., WANG, S., LIU, H., ZHANG, W., ZHANG, D., WANG, Y. 2018. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota. *Frontiers in microbiology*, 9: 1953.
- WANG, S., ZHANG, L., GU, W. 2012. Effects of lactobacillus strains on colon cancer cell proliferation and cell cycle blockage. In *2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology* (pp. 1015-1018). IEEE.
- WANG, S. M., ZHANG, L. W., FAN, R. B., HAN, X., YI, H. X., ZHANG, L. L., SHIGWEDHA, N. 2014. Induction of HT-29 cells apoptosis by lactobacilli isolated from fermented products. *Research in microbiology*, 165(3): 202-214.
- WANG, T., WEI, G., CHEN, F., MA, Q., HUANG, A. 2023. Integrated metabolomics and peptidomics to delineate characteristic metabolites in milk fermented with novel *Lactiplantibacillus plantarum* L3. *Food Chemistry: X*, 18: 100732.
- WANG, Y., QU, S., CHEN, M., CUI, Y., SHI, C., PU, X., ZHANG, A. 2023. Effects of buckwheat milk Co-fermented with two probiotics and two commercial yoghurt strains on gut microbiota and production of short-chain fatty acids. *Food Bioscience*, 53: 102537.
- WANG, Z., WU, H., CHEN, Y., CHEN, H., WANG, X., YUAN, W. 2021. *Lactobacillus paracasei* S16 alleviates lumbar disc herniation by modulating inflammation response and gut microbiota. *Frontiers in nutrition*, 8: 701644.
- WENZEL, E. S., SINGH, A. T. 2018. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1): 1-5.
- WIN, A. K., JENKINS, M. A., DOWTY, J. G., ANTONIOU, A. C., LEE, A., GILES, G. G., MACINNIS, R. J. 2017. Prevalence and penetrance of major genes and polygenes for colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 26(3): 404-412.
- WITTOUCK, S., WUYTS, S., LEBEER, S. 2019. Towards a genome-based reclassification of the genus *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3): e02155-18.

- WU, Y., ZHUANG, J., QU, Z., YANG, X., HAN, S. 2023. Advances in immunotyping of colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 14: 1259461.
- YANG, M. H., RAMPAL, S., SUNG, J., CHOI, Y. H., SON, H. J., LEE, J. H., CHO, J. 2013. The association of serum lipids with colorectal adenomas. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 108(5): 833-841.
- YEGANEH, R., TAJABADI EBRAHIMI, M., RAMEZANI, M. 2021. The effects of native *Lactobacillus paracasei* supernatant solution on death of pancreatic adenocarcinoma cells (AsPC-1) and Expression of bax, bcl2, and DPC4 Apoptotic Genes. *Journal of Microbial Biology*, 10(40): 1-8.
- YERLIKAYA, O., SAYGILI, D., AKPINAR, A. 2020. Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, 41: 418-425.
- YILMAZ, R., TEMİZ, A. 2003. *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. *Orlab Mikrobiyol. Derg*, 1(3): 19-42.
- YOO, J. Y., GROER, M., DUTRA, S. V. O., SARKAR, A., MCSKIMMING, D. I. 2020. Gut microbiota and immune system interactions. *Microorganisms*, 8(10): 1587.
- YOUSEFI, B., ESLAMI, M., GHASEMIAN, A., KOKHAEI, P., SALEK FARROKHİ, A., DARABI, N. 2019. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of cellular physiology*, 234(6): 8008-8018.
- YUN, J. S., RYU, H. W. 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Process Biochemistry*, 37(3): 235-240.

- ZHANG, J. W., DU, P., YANG, B. R., GAO, J., FANG, W. J., YING, C. M. 2012. Preoperative probiotics decrease postoperative infectious complications of colorectal cancer. *The American journal of the medical sciences*, 343(3): 199-205.
- ZHAO, X., LI, L., STARR, T. K., SUBRAMANIAN, S. 2017. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*, 8(33): 54775.
- ZHAO, Y., LI, M., WANG, Y., GENG, R., FANG, J., LIU, Q., TONG, T. 2023. Understanding the mechanism underlying the anti-diabetic effect of dietary component: a focus on gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(25): 7378-7398.
- ZHAO, Y., ZHU, L., YANG, L., CHEN, M., SUN, P., MA, Y., JIA, H. 2024. In vitro and in vivo anti-eczema effect of *Artemisia annua* aqueous extract and its component profiling. *Journal of ethnopharmacology*, 318: 117065.
- ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C. M., HARRIS, H. M., MATTARELLI, P., LEBEER, S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4): 2782-2858.
- ZHOU, C., LI, L., LI, T., SUN, L., YIN, J., GUAN, H., YANG, H. 2020. SCFAs induce autophagy in intestinal epithelial cells and relieve colitis by stabilizing HIF-1 α . *Journal of Molecular Medicine*, 98: 1189-1202.
- ZHOU, H. C., YAN, X. Y., YU, W. W., LIANG, X. Q., DU, X. Y., LIU, Z. C., LIU, H. B. (2022). Lactic acid in macrophage polarization: The significant role in inflammation and cancer. *International reviews of immunology*, 41(1): 4-18.
- ZHOU, Z., ZHOU, X., ZHANG, Y., YANG, Y., WANG, L., WU, Z. 2023. Butyric acid inhibits oxidative stress and inflammation injury in calcium oxalate nephrolithiasis by targeting CYP2C9. *Food and Chemical Toxicology*, 178: 113925.

- ZHU, Z., HUANG, J., LI, X., XING, J., CHEN, Q., LIU, R., ZHANG, Z. 2020. Gut microbiota regulate tumor metastasis via circRNA/miRNA networks. *Gut microbes*, 12(1): 1788891.
- ZMORA, N., SUEZ, J., ELINAV, E. 2019. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(1): 35-56.
- ZORZI, M., HASSAN, C., SENORE, C., CAPODAGLIO, G., TURRIN, A., NARNE, E., RUGGE, M. 2021. Interval colorectal cancers after negative faecal immunochemical test in a 13-year screening programme. *Journal of medical screening*, 28(2): 131-139.
- ZOTTA, T., RICCIARDI, A., IANNIELLO, R. G., PARENTE, E., REALE, A., ROSSI, F., COPPOLA, R. 2014. Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One*, 9(6): e99189.

EKLER

Etik Kurul Kararı



TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU



BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Açık Adı	Lactobacillus spp.'lerin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanser Etkisi		
	Koordinatör / Sorumlu Araştırmacı	Dr. Öğr. Üyesi Berna Erdal / TNKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji		
	Etik Kurul Toplantı Tarihi	28.12.2021		
	Araştırma Protokol Numarası	2021.289.12.12		
	Araştırmanın Türü	Prospektif ☒	Retrospektif ☐	Diğer: ☐
	Araştırmanın Destekleyicisi	TÜBİTAK ☐	TNKÜ BAP ☒	Araştırmacı ☐ Diğer: ☐
	Araştırmanın Bütçesi	48928,50 ₺		
	Araştırmanın Merkezi	Tek Merkezli ☒	Çok Merkezli ☐	
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oy birliği ile karar verilmiştir.			

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
----------------------------	--

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Araştırma ile İlişkili	Katılım *	İmza
F	Biyofizik	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
F	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
F	Tıbbi Biyokimya	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
P	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
P	Genel Cerrahi	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	İç Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Tıbbi Biyokimya	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Tıbbi Mikrobiyoloji	E ☒ H ☐	E ☒ H ☒	
E	Biyoistatistik	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Ortopedi ve Travmatoloji	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Adli Tıp	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
E	İç Hastalıkları Hemşireliği	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Tıbbi Farmakoloji	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
E	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*

E

C

I

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

EĞİTİM GEÇMİŞİ

- Doktora
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi- Tıp Fakültesi Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı
- Yüksek Lisans
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi- Tıp Fakültesi Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı
- Lisans
Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BAŞARILAR

- TÜBİTAK tarafından kabul edilen “Multipl Myelom Hücrelerinde Onkolitik Myxoma Virüsünün Etkilerinin Araştırılması” başlıklı 1001 projesinde doktora bursiyerliği (Tamamlandı)
- TNKUBAP.02.YL.17.125 “Çeşitli Yörelere Toplanan Bitki Ekstraktlarının Antitümoral Aktivitelerinin Araştırılması” Yüksek Lisans Tezi (Tamamlandı)
- TNKUBAP.02.DR.22.438 “*Lactobacillus* spp.’lerin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanser Etkisi” Doktora Tezi (Tamamlandı)
- TÜBİTAK 2218-Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı tarafından kabul edilen “Antimikrobiyal Bir Peptid Olan Gramisidinin Glioblastoma Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin *In Vitro* ve *In Silico* Değerlendirilmesi” başlıklı proje (Kabul edildi)

KURS-SERTİFİKALAR

- İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü VI. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu (Temel ve İleri Hücre Teknikleri/Hücre kültüründe Proliferasyon, Sitotoksisite ve Apoptoz Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri)
- Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım sertifikası
- “ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi İç Denetçi” Sertifikası
- “ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Temel Bilgilendirme” Sertifikası
- “ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Bilgilendirme” Sertifikası
- İstanbul Üniversitesi Hasan Ali Yücel Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Belgesi

BİLİMSEL YAYINLAR

Ulusal Sözlü Bildiriler

- **Yılmaz B.**, Öncü G. "Kanserde Tamamlayıcı Tedavi: Fitoterapi", Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi, s.168, Edirne 2017 (Ulusal Sözlü Bildiri)
- Öncü G., **Yılmaz B.** "Kanser Tedavisinde DH Aşıları ve DH-CIK Kombine Aşıların Başarı Oranlarının Değerlendirilmesi", Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi, s.167, Edirne 2017 (Ulusal Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.** "Probiyotiklere Genel Bakış" Türkiye 1. Gıda Mikrobiyolojisi Kongresi, 13-16 Eylül 2023, Erzurum (Ulusal Sözlü Bildiri)
- Bulut T., Zorlu Ö., Erdal B., **Yılmaz B.** “Daha Önce Biyolojik Ajan Kullanmamış Psöriazis Tanılı Hastaların Biyolojik Ajan Kullanımı Sürecinde Serum Sitokin (TNF- α , IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, MCP-1) Değerlerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi”, 32. Ulusal Dermatoloji Kongresi, 20-24 Kasım 2024 Antalya (Ulusal Sözlü Bildiri)

Uluslararası Sözlü Bildiriler

- **Yılmaz B.**, Erdal B. "Investigation of The Antitumoral Activities on The Mcf-7 Cells of Propolis and Kurkumin Extracts", 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), Ankara 2019 (Uluslararası Sözlü Bildiri).
- Erdal B., **Yılmaz B.** "*Inula Viscosa* Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antitümoral Etkilerinin İncelenmesi" International Congress Of Medicine And Health Sciences (INCOMES) 26-28 April 2021, Online (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.**, Baylan B. "*Inula Viscosa* Metanol ve Hekzan Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antikanserojenik Aktivitesi", 7 th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences 3-4 September 2021, Online (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., Baylan B., Akalın RB., **Yılmaz B.** "Antibacterial Effects Of Commercial And Traditional Apple Vinegar On *Pseudomonas Aeruginosa* And *Staphylococcus Aureus*" 9th International Gevher Nesibe Health Sciences Conference 10-12 June, 2022, (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.** "Antibacterial and Anticancer Activity of Cell-Free Supernatants of *Lactobacillus* spp. Isolates" 13th International Medicine and Health Sciences Researches Congress (UTSAK), 26-27 August 2023, Ankara-Online (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.** "Investigation of The Cytotoxic Effect of *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* Cell-Free Supernatants on U87 Glioblastoma Cells" 3. International Balkan Congress on Neurology and Neuroscience, 5-8 October 2023, Tekirdağ (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.** "Investigation of The Cytotoxic Effect of *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* Cell-Free Supernatants on U87 Glioblastoma Cells" 3. International Balkan Congress on Neurology and Neuroscience, 5-8 October 2023, Tekirdağ (Uluslararası Sözlü Bildiri)
- Erdal B., **Yılmaz B.** "*In Vitro* Investigation Of The Use Of *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* Cell-Free Supernatants In The Treatment Of

Infectious Diseases And Breast Cancer" Union of Thrace Universities 7. International Health Science Congress, 21-22 January 2025, Tekirdağ (Uluslararası Sözlü Bildiri)

Uluslararası Makale

SCIE veya SSCI kapsamındaki dergide yayımlanmış makale

- Erdal B., Akalın RB., **Yılmaz B.**, Bozgeyik E., Yıkmış S. Application of ultrasound to the organic cornelian cherry (*Cornus mas L.*) vinegar: Changes in antibacterial, antidiabetic, antihypertensive, and anticancer activities. J Food Process Preserv. 2022;46: e16952.
- Yeşilaltay A, Muz D, Erdal B, Bilgen T, Batar B, Turgut B, Topçu B, **Yılmaz B**, Avcı BA,. “*Myxoma Virus Combination Therapy Enhances Lenalidomide and Bortezomib Treatments for Multiple Myeloma*”, Pathogens 2024, 13, 72.

ESCI veya Scopus kapsamındaki dergide yayımlanmış makale

- Erdal B, **Yılmaz B**, Baylan B. *Inula viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 133 – 144

Diğer uluslararası indekslerde taranan dergide yayımlanmış makale

- **Yılmaz B.**, Erdal B. "Anti-cancer activities of curcumin and propolis extracts on MCF-7 breast cancer cell line model", Medicine Science, 2020;9(4):877-84.

Ulusal Makale

TR Dizin kapsamındaki dergide yayımlanmış makale

- Erdal B., **Yılmaz B.** "Regulatory B Cells and Role In Cancer", Sakarya Tıp Dergisi, 2020;10(2):326-333.