

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİKLERİN ANTİKANSER
MEKANİZMALARININ OMİKS YAKLAŞIMLARLA DEĞERLENDİRİLMESİ

Ozan HALİŞÇELİK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİKLERİN ANTİKANSER MEKANİZMALARININ OMİKS YAKLAŞIMLARLA DEĞERLENDİRİLMESİ

Ozan HALİSÇELİK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fadime KIRAN

Bu tez çalışmasının amacı, deneysel olarak indüklenen karsinogeneze direnci ile önemli bir model organizma olarak kabul edilen ve eşsiz biyolojik karakteristikleri ile dikkat çeken kör köstebek faresi *Nannospalax xanthodon* bağırsak mikrobiyotasından izole edilen ve *Ligilactobacillus animalis* olarak tanımlanan bakteri tarafından üretilen postbiyotiklerin hepatoselüler kansere karşı anti-kanser etkisini küresel OMİKS yaklaşımlarının entegrasyonu neticesinde analiz etmektir. Bu amaçla, postbiyotikler ve postbiyotiklerle 48 saat muamele edilen ve edilmeyen Hep-40 hepatoselüler kanser hücreleri ile kontrol amacıyla kullanılan Lx-2 hücrelerine ait sekretomlar proteomiks, metabolomiks ve lipidomiks analizlere tabi tutulmuştur. Shot-gun proteomiks çalışmaları neticesinde postbiyotiklerin 123 adet protein içerdiği belirlenmiştir. LC-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilen hedeflenmemiş metabolit ve lipid analizleri neticesinde ise postbiyotikler içerisinde 74 adet metabolit ve 59 adet lipid tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler neticesinde, postbiyotiklerle kültüre edilen Hep-40 hücrelerinin sekretomunda tespit edilen 172 özgül proteinden 9'unun (Gen isimleri: *YWHAG*, *OGN*, *TPM4*, *Robo4*, *PTPRK*, *GSR*, *ApoA-I*, *ALB*, *BRCA-2*), 25 metabolitten 9'unun (agmatin, sistein, histamin, L-sitruilin, L-ornitin, spermedin, vitamin B6, D3, ve E-alfa tokoferol formu) ve 15 adet lipidin ise tamamının (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, 1-fosfatidil-D-miyo-inositol, 1-açıl-sn-glisero-3-fosfoetanolamin, fosfatidik asit, 1-açıl-sn-glisero-3-fosfat, sfingomiyelin, sfingozin, GM2, glikozilfosfatidilinositol fosfolipaz D, araşidonik asit, eikosapentaenoik asit, linoleik asit, miristoleik asit, prostaglandin D2) anti-kanser ilişkili yolaklarla bağlantısı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, postbiyotiklerin kanser hücrelerini farklı yolaklar üzerinden uyararak anti-kanser özellikli terapötik bir ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceğine işaret etmektedir.

Mart 2024, 181 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, hepatoselüler kanser, metabolomiks, proteomiks, lipidomiks

ABSTRACT

PhD Thesis

EVALUATION OF ANTICANCER MECHANISMS OF MICROBIOTA-DERIVED POSTBIOTICS WITH OMICS APPROACHES

Ozan HALISCELIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fadime KIRAN

This thesis aims to determine the anti-cancer effect of postbiotics produced by *Ligilactobacillus animalis* isolated from the intestinal microbiota of the blind mole rat *Nannospalax xanthodon*, which is considered an important model organism with its resistance to experimentally induced carcinogenesis and attracts attention with its unique biological characteristics, against hepatocellular cancer by the integration of global OMICS approaches. For this purpose, postbiotics and the secretomes of Hep-40 hepatocellular cancer cells and Lx-2 cells as control cells treated and untreated with postbiotics for 48 hours were evaluated with proteomics, metabolomics, and lipidomics analyses. As a result of shot-gun proteomic studies, it was determined that postbiotics contain 123 proteins. According to the results of non-targeted metabolite and lipid analyses using LC-MS/MS, 74 metabolites and 59 lipids were detected in postbiotics. With the results of bioinformatic analyses, 9 of 172 specific proteins (Gene names: *YWHAG*, *OGN*, *TPM4*, *Robo4*, *PTPRK*, *GSR*, *ApoA-I*, *ALB*, *BRCA-2*), 9 of 25 metabolites (agmatine, cysteine, histamine, L-citrulline, L-ornithine, spermidine, vitamin B6, D3, and E-alpha tocopherol form), and all 15 lipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, 1-phosphatidyl-D-myo-inositol, 1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, phosphatidic acid, 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate, sphingomyelin, sphingosine, GM2, glycosylphosphatidyl-inositol phospholipase D, arachdonic acid, eicosapentaenoic acid, linoleic acid, myristoleic acid, prostaglandin D2) detected in the secretome of Hep-40 cells cultured with postbiotics is linked to anti-cancer-related pathways. Obtained data indicate that postbiotics may have the potential to be used as a therapeutic agent with anti-cancer properties by stimulating cancer cells through different pathways.

March 2024, 181 pages

Key Words: Microbiota, hepatocellular cancer, metabolomics, proteomics, lipidomics

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın ve araştırmalarımın her aşamasında engin tecrübesi, sevgisi ve alçak gönüllülüğüyle bilgi, öneri ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Fadime KIRAN'a,

Tez izleme komite üyesi ve tez savunma jüri üyesi olarak tezime değerli katkılar sunan sayın hocalarım Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji ABD) ve Prof. Dr. K. Can AKÇALI'ya (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD),

Tez savunma jürimde yer alarak değerli katkılar sunan sayın hocalarım Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a (Gazi Üniversitesi, Biyoloji ABD) ve Prof. Dr. Teoman KANKILIÇ'a (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD),

Tez çalışmalarım süresince güleryüzleri, bilgi ve deneyimleri ile sağladıkları tüm desteklerinden dolayı Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Farmabiyotik Teknoloji Araştırma grubu üyeleri Hazal KİBAR DEMİRHAN, Emine OMEROĞLOU, Buket ÇELİK, Seval TALİBOĞLU, Buse SAFRANCI ve diğer tüm KIRANLab ekibine,

Öğretim görevlisi olarak görev yaptığım Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden sayın hocalarım Prof. Dr. Aziz TEKİN, Prof. Dr. R. Ertan ANLI ile diğer öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve tüm idari personeline,

Berlin Institution of Health – Charité, Metabolomiks Laboratuvar sorumlusu Sayın Prof. Dr. Jennifer KIRWAN'a ve diğer çalışma arkadaşlarım ile Proteomiks Laboratuvar sorumlusu Sayın Prof. Dr. Philipp MERTINS'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca ve tez çalışmalarım süresince emeklerini, sevgilerini ve güvenlerini daima hissettiğim canım eşim Beril HALİŞÇELİK'e, canım kızım Defne Yaz HALİŞÇELİK'e ve diğer aile büyüklerime ve üyelerine,

Can dostum Emrah ÇORAK'a,

gösterdikleri inanılmaz anlayış ve destekleri için en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Desteğini hissettiğim herkese minnet, sevgi ve saygılarımla

Bu çalışma, “Kanser ve küresel omiks teknolojilerinin entegrasyonu: Kansere dirençli kör köstebek faresi bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşunun anti-kanser mekanizmasının belirlenmesi” başlıklı Uluslararası İşbirliği Araştırma projesi (Proje No: TUİ-2023-2906) kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Ozan HALİŞÇELİK

Ankara, Mart 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Karaciğer Fizyolojisi ve Fonksiyonu	3
2.2 Karaciğer Kanseri.....	6
2.2.1 Epidemiyolojisi	6
2.2.2 Risk faktörleri	11
2.2.3 Moleküler mekanizması.....	14
2.2.4 Sınıflandırılması ve evreleri	17
2.2.5 Tanı yöntemleri ve belirteçleri.....	19
2.2.6 Tedavi yöntemleri ve sınırlılıkları	20
2.3 Mikrobiyotanın Karaciğer Kanserindeki Rolü	27
2.4 Postbiyotikler	30
2.5 Postbiyotiklerin Anti-kanser Etkileri.....	31
2.6 <i>Spalax</i> sp. ve Kanser	37
2.7 OMİKS Teknolojileri.....	42
2.7.1 OMİKS teknolojilerinin kanser alanında kullanımı.....	44
2.7.2 Proteomiks ve kanser alanında kullanımı.....	46
2.7.3 Metabolomiks ve kanser alanında kullanımı.....	50
2.7.4 Lipidomiks ve kanser alanında kullanımı	54
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	59
3.1 Materyal	59
3.2 Yöntem	60
3.2.1 Postbiyotiklerin hazırlanması	60
3.2.2 Hücre kültürü	61
3.2.3 Sitotoksosite analizleri	63
3.2.4 Apoptoz analizleri	63
3.2.5 Canlı hücre sayımı	64
3.2.6 Sekretomların eldesi.....	65
3.2.7 Proteomiks analizler	66
3.2.7.1 Protein ekstraksiyonu	66
3.2.7.2 Kromatografik analizler ve kütle spektrometre çalışmaları.....	66
3.2.7.3 Veri analizi.....	69
3.2.8 Metabolomiks ve lipidomiks analizler.....	70
3.2.8.1 Metabolit/lipid ekstraksiyonu	70
3.2.8.2 Kromatografik analizler ve kütle spektrometre çalışmaları.....	71
3.2.8.3 Veri analizi.....	73
3.2.9 İstatistiksel analizler	75

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	76
4.1 Postbiyotiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	76
4.2 Proteomiks Analizi Neticesinde Elde Edilen Genel Sonuçlar	79
4.2.1 Postbiyotiklere ait protein profili	84
4.2.2 Hücre sekretomlarına ait protein profili	88
4.3 Metabolomiks Analizi Neticesinde Elde Edilen Genel Sonuçlar	103
4.3.1 Postbiyotiklere ait metabolit profili	112
4.3.2 Hücre sekretomlarına ait metabolit profili	113
4.4 Lipidomiks Analizi Neticesinde Elde Edilen Genel Sonuçlar	127
4.4.1 Postbiyotiklere ait lipid profili	130
4.4.2 Hücre sekretomlarına ait lipid profili	131
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	151
KAYNAKLAR	159
ÖZGEÇMİŞ	180

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
≤	Küçük veya eşit
≥	Büyük veya eşit
°C	Santigrat (Celcius) derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ω	Omega
\$	Amerikan Doları
Abs	Absorbans
m/z	Kütle/yük oranı

Kısaltmalar

2D-PAGE	İki boyutlu jel elektroforezi
ACN	Asetonitril
AGC	Otomatik kazanç kontrolü
CE	Kapiler elektroforez
CO ₂	Karbondioksit
ddMS2	İki boyutlu kütle spektroskopisi
DESI	Desorpsiyon elektron sprej iyonlaştırma
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Hücre dışı matriks
ELife	Avrupa lipidomik girişimi
ESI	Elektron sprej iyonlaştırma
ESTASI	Elektrostatik sprej iyonizasyon
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
FDR	Yanlış keşif oranı
GC/FID	Gaz kromatografi alev iyonizasyon dedektörü
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
GCxGC	Çift boyutlu gaz kromatografi

H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HBV	Hepatit B virüsü
HCl	Hidroklorik asit
HCV	Hepatit C virüsü
HILIC	Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HSK	Hepatosellüler karsinoma
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LC	Likit kromatografi
LC-MS/MS	Likit kromatografi üçlü kütle spektroskopisi
LFQ	İşaretlenmemiş serbest proteinler
LIPID MAPS	Lipid metabolitler ve yolaklar stratejisi
LSI	Lasersprey iyonizasyonu
MALDI	Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu
MeOH	Metanol
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle spektroskopisi
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NAFLD	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
NaOH	Sodyum hidroksit
NASH	Alkolik olmayan steatohepatit
NGS	Yeni nesil dizileme
NIST	Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü
nLC	Nano-sıvı kromatografi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NP	Normal faz
O ₂	Oksijen
OPA	Ortafitalaldehit
PCA	Temel bileşen analizi
PIP	Fosfatidilinositol fosfat
PLS	Gizli yapılara projeksiyon regresyonu
PLS-DA	Gizli yapılara projeksiyon sınıflandırma regresyonu
QC	Kalite kontrol
RNA	Ribonükleik asit
RP	Ters faz
RT	Alıkonma zamanı
SAII	Solvent destekli giriş iyonizasyonu
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TOF	Uçuş zamanlama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Karaciğerin ve komşu organların göğüs kafesi içerisindeki konumu ve anatomik pozisyonu	3
Şekil 2.2 Karaciğerin fonksiyonel birimi veya lobülü	4
Şekil 2.3 Hepatik lobülün mikroanatomi	5
Şekil 2.4 Dünya genelinde 2022 yılına ait kanser insidans ve mortalite oranları	7
Şekil 2.5 2022 yılına ait HSK insidans ve mortalite oranlarının demografik dağılımı.....	8
Şekil 2.6 Kadın ve erkekler için 2022 yılına ait kanser insidans oranları.....	9
Şekil 2.7 Kadın ve erkekler için 2022 yılına ait kanser mortalite oranları	10
Şekil 2.8 Karaciğer kanseri temel risk faktörleri	11
Şekil 2.9 Hepatoselüler karsinomun histopatolojik ve moleküler özellikleri	14
Şekil 2.10 Tümör mikroçevresinin bileşenleri	16
Şekil 2.11 Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sınıflandırması	18
Şekil 2.12 Tedavi seçenekleri (a) ve farklı uygulamaları (b).....	21
Şekil 2.13 HSK tedavisinde tümör hücrelerini öldürmek için kullanılan farklı kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları.....	23
Şekil 2.14 HSK tedavisinde farklı immünoterapi yöntemleri.....	25
Şekil 2.15 Karaciğer kanseri gelişimi ve bağırsak mikrobiyotası aracılı tedavi yaklaşımları.....	29
Şekil 2.16 Bağırsak mikrobiyotasını modüle eden biyotikler, postbiyotik olarak bilinen metabolitler ve etkileri	31
Şekil 2.17 Kanser olmayan hücrede (a) ve kanser hücresinde (b) bütiratın üretimi ve metabolizması	34
Şekil 2.18 Kanser hücresinde H ₂ S sentezi ve metabolizması.....	35
Şekil 2.19 β-glukanların etki mekanizması.....	37
Şekil 2.20 Temel OMIKS teknolojilerinin genel sınıflandırılması.....	44
Şekil 2.21 Proteomiks iş akış şeması	47
Şekil 2.22 Metabolomiks iş akış şeması	51
Şekil 2.23 Lipidomiks iş akış şeması	51
Şekil 3.1 Postbiyotik eldesinin şematik özeti.....	61
Şekil 3.2 Hücrelerin (Lx-2 ve Hep-40) genel mikroskop görüntüleri.....	61
Şekil 3.3 MTT analizine ait iş akış şeması.....	64
Şekil 3.4 Canlı hücre sayımına ait teknik aşamaların iş akış şeması	65
Şekil 3.5 Proteomiks çalışmalarında kullanılan otomatik protein ekstraksiyon hazırlama ünitesi genel görüntüsü (a), otomatize pipetleme ünitesine ait görüntü (b)	67
Şekil 3.6 Proteomiks çalışmaları kapsamında kullanılan Q-Exactive Plus High-Resolution Quadrupole-Orbitrap cihazı genel görüntüsü	69
Şekil 3.7 Proteom discoverer yazılım programının ara yüzüne ait genel bir görüntü	70
Şekil 3.8 Metabolomiks ve lipidomiks çalışmaları için kullanılan Q-Exactive Orbitrap cihazının genel görüntüsü.....	72
Şekil 3.9 XCMS Online metabolomiks yazılımının ara yüzüne ait genel bir görüntü ...	74
Şekil 3.10 Metabolomiks ve lipidomiks çalışmalarında takip edilen veri analizinin özet iş akış şeması.....	75
Şekil 4.1 48 saat inkübasyonu takiben farklı zaman aralıklarında hücre canlılığı MTT analiz sonuçları	77

Şekil 4.2 48 saat inkübasyonu takiben postbiyotiklerle muamele edilmeyen ve edilen Lx-2 hücrelerine ait canlı (sol alt quadran) ve apototik (sağ alt ve sağ üst quadran) hücre yüzdeleri gösteren akış sitometre diyagramları	78
Şekil 4.3 48 saat inkübasyonu takiben postbiyotiklerle muamele edilmeyen ve edilen Hep-40 hücrelerine ait canlı (sol alt quadran) ve apototik (sağ alt ve sağ üst quadran) hücre yüzdeleri gösteren akış sitometre diyagramları ...	79
Şekil 4.4 Proteomiks analizi öncesi cihaz kalibrasyonuna (a) sprey kararlılığı ve ölçüm doğruluğuna (b) yönelik sonuçların ekran görüntüsü	80
Şekil 4.5 LFQ (Label Free Quantitation of Proteins) yoğunluk ısı haritası	83
Şekil 4.6 Protein dağılımının kümelenmesini gösteren genel PCA grafiği	84
Şekil 4.7 Postbiyotik ile MRS-B besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği	85
Şekil 4.8 Postbiyotik ile muamele edilmeyen Hep-40 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği	88
Şekil 4.9 Postbiyotik ile muamele edilen Hep-40 hücre sekretomu ile besiyeri protein dağılımına ait volkan grafiği	89
Şekil 4.10 Postbiyotik ile muamele edilen Hep-40 hücre sekretomu ile edilmeyen Hep-40 hücre sekretomuna ait protein dağılımına ait volkan grafiği	89
Şekil 4.11 Postbiyotik ile muamele edilmeyen Lx-2 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği	90
Şekil 4.12 Postbiyotik ile muamele edilen Lx-2 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği	90
Şekil 4.13 Postbiyotik ile muamele edilen Lx-2 hücre sekretomu ile edilmeyen Lx-2 hücre sekretomunda bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği	91
Şekil 4.14 Postbiyotiklerle muamele edilmiş ve edilmemiş Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen protein içerikleri ve farklılıklarına ait yoğunluk ısı grafiği	92
Şekil 4.15 Postbiyotiklerle muamele edilmiş ve edilmemiş Lx-2 hücre sekretomlarında tespit edilen protein içerikleri ve farklılıklarına ait yoğunluk ısı grafiği	93
Şekil 4.16 Tespit edilen protein sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı	94
Şekil 4.17 ALB proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	99
Şekil 4.18 ALDOA proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	100
Şekil 4.19 APOA-1 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	100
Şekil 4.20 BRCA-2 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	101
Şekil 4.21 OGN proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	101
Şekil 4.22 PTPRK proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	102
Şekil 4.23 ROBO-4 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	102
Şekil 4.24 TPM-4 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	103
Şekil 4.25 YWHAG proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı	103
Şekil 4.26 Numunelerin pozitif moddaki toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı	104
Şekil 4.27 Pozitif moddaki numunelerin moleküler yoğunluk anlamında toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı	105
Şekil 4.28 Pozitif moddaki numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği	105
Şekil 4.29 Pozitif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılım grafiği	106

Şekil 4.30 Pozitif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılımının tüm metabolit bileşenleri yönünden nokta diyagramı.....	107
Şekil 4.31 Numunelerin negatif moddaki toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı.....	108
Şekil 4.32 Negatif moddaki numunelerin moleküler yoğunluk anlamında toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı.....	108
Şekil 4.33 Negatif moddaki numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği .	108
Şekil 4.34 Negatif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılım grafiği	109
Şekil 4.35 Negatif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılımının tüm metabolit bileşenleri yönünden noktalamaları.....	110
Şekil 4.36 Tespit edilen metabolit sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı.....	113
Şekil 4.37 Gliserin, serin ve treonin metabolizması ilişkili biyoyolak	119
Şekil 4.38 Sistein ve metiyonin metabolizması ilişkili biyoyolak	120
Şekil 4.39 Valin, lösin ve izölösün metabolizması ilişkili biyoyolak.....	121
Şekil 4.40 Karbon düzenleme ilişkili biyoyolak	122
Şekil 4.41 mTOR sinyal ilişkili biyoyolak.....	123
Şekil 4.42 AMPK sinyal ilişkili biyoyolak	124
Şekil 4.43 Vitamin B6 metabolizması ilişkili biyoyolak	125
Şekil 4.44 D-amino asit metabolizması ilişkili biyoyolak	126
Şekil 4.45 Lipid içeriği belirlenen numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği	127
Şekil 4.46 Lidip özellikli metabolitlerin toplam iyon kromatogramı karşılaştırması ...	128
Şekil 4.47 Lipid metabolit dağılımları	131
Şekil 4.48 Tespit edilen lipid sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı ...	132
Şekil 4.49 Fosfotidilkolin ilişkili biyoyolak	134
Şekil 4.50 Fosfotidiletanolamin ilişkili biyoyolak	135
Şekil 4.51 1-fosfotidil-D-myo-inozitol ilişkili biyoyolak	136
Şekil 4.52 1-Açıl-sn-glysero-3-fosfotidiletanolamin ilişkili biyoyolak.....	137
Şekil 4.53 Fosfatidik asit ilişkili biyoyolak	138
Şekil 4.54 Fosfatidik asit ilişkili 2. biyoyolak	139
Şekil 4.55 Sphingomyelin ilişkili biyoyolak.....	140
Şekil 4.56 Sfingozin ilişkili biyoyolak.....	141
Şekil 4.57 Miristoleik asit ilişkili biyoyolak	142
Şekil 4.58 GM2 ilişkili biyoyolak.....	143
Şekil 4.59 Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) ilişkili biyoyolak	144
Şekil 4.60 Araşidonik asit ilişkili biyoyolak	145
Şekil 4.61 Eikosapentaenoik asit ilişkili biyoyolak	146
Şekil 4.62 Linoleik asit ilişkili biyoyolak	147
Şekil 4.63 Stearik asit ilişkili biyoyolak	148
Şekil 4.64 L-2-Lizofosfatidiletanolamin ilişkili biyoyolak.....	149
Şekil 4.65 Prostaglandin D2 ilişkili biyoyolak	150

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kıyasal ve kit bilgileri.....	59
Çizelge 3.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan cihaz bilgileri	60
Çizelge 4.1 Omiks çalışmalarına dahil edilen numunelerin isimleri ve kodları	81
Çizelge 4.2 Numunelerde tespit edilen protein sayıları	82
Çizelge 4.3 Postbiyotiklerde tespit edilen proteinlere ait bilgiler	85
Çizelge 4.4 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen proteinleri kodlayan gen listesi.....	94
Çizelge 4.5 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında fazla ifade edilen proteinleri kodlayan gen isimleri ve ilişkili biyolojik yolları.....	95
Çizelge 4.6 Numunelerde tespit edilen metabolit sayıları	111
Çizelge 4.7 Postbiyotiklerde tespit edilen metabolitler.....	112
Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları.....	114
Çizelge 4.9 Numunelerde tespit edilen lipid sayıları	129
Çizelge 4.10 Postbiyotiklerde tespit edilen lipidler	130
Çizelge 4.11 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında bulunan lipidlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları	133

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü, 2025 yılına kadar karaciğer kanseri küresel insidansının yılda bir milyon kişinin üzerinde olacağını ve 2030 yılında bir milyondan fazla insanın primer karaciğer kanserinden hayatını kaybedeceğini tahmin etmektedir. Primer karaciğer kanseri tanılarının % 90'ını oluşturan hepatoselüler kanser (HSK) ise tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedeni olarak rapor edilmektedir. Güncel rakamlar ve tahminler dikkate alındığında karaciğer kanserinin dünya genelinde önemli ve zorlu bir sağlık yükü oluşturduğu önemli bir gerçektir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi rezeksiyon, ablasyon, transarteriyel kemoembolizasyon ve karaciğer nakli gibi uygulamalar sıklıkla yer almaktadır. Ancak HSK vakalarının çoğu, hastalığın asemptomatik doğası nedeniyle ileri evrelerde ortaya çıkmakta ve erken tanı mümkün olamamaktadır. Bu aşamada gelişmiş sistemik tedaviler uygulansa da hastalar tedaviye hızla direnç geliştirebilmektedir. Bu nedenle, yüksek nüks oranlarının önüne henüz geçilememektedir. Uygulanan kombine tedaviler ise hasta üzerindeki maddi ve manevi tedavi yükünü oldukça artırmaktadır. Tüm bu zorluklara rağmen güncel araştırmalar, mevcut tedavi yöntemlerini iyileştirmek ve bu engellerin üstesinden gelmek amacıyla etkili ve yeni tedavi rejimleri geliştirmeye odaklanmaktadır. Günümüzde kemoterapi ve immünoterapi uygulamaları HSK ilerlemesini yavaşlatmak adına umut vaat etse de kanseri tedavi etmek veya önlemek amacıyla daha güvenilir ve doğal biyolojik yaklaşımlara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda mikrobiyota-konak ilişkisini keşfetmeye yönelik gerçekleştirilen araştırmalar hız kazanmaktadır. Mikrobiyota-kanser araştırmalarından elde edilen veriler ise tanı ve tedaviye yönelik farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Mikrobiyota üyeleri tarafından üretilen postbiyotikler ise kanser hücre çoğalmasını inhibe etme, apoptozu düzenleme ve otofajik hücre ölümünün aktivasyonunu teşvik etme gibi özellikler sergilemeleri nedeniyle potansiyel anti-kanser ajan olarak umut vaat etmektedir. Ancak etkin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılabilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, OMİKS teknolojileri kullanılarak, postbiyotiklerin anti-kanser mekanizmalarının protein-lipid ve metabolit esaslı biyolojik yollar açısından detaylı araştırılması amaçlanmaktadır. OMİKS teknolojileri, belirli bir biyolojik numunedeki biyomolekülleri

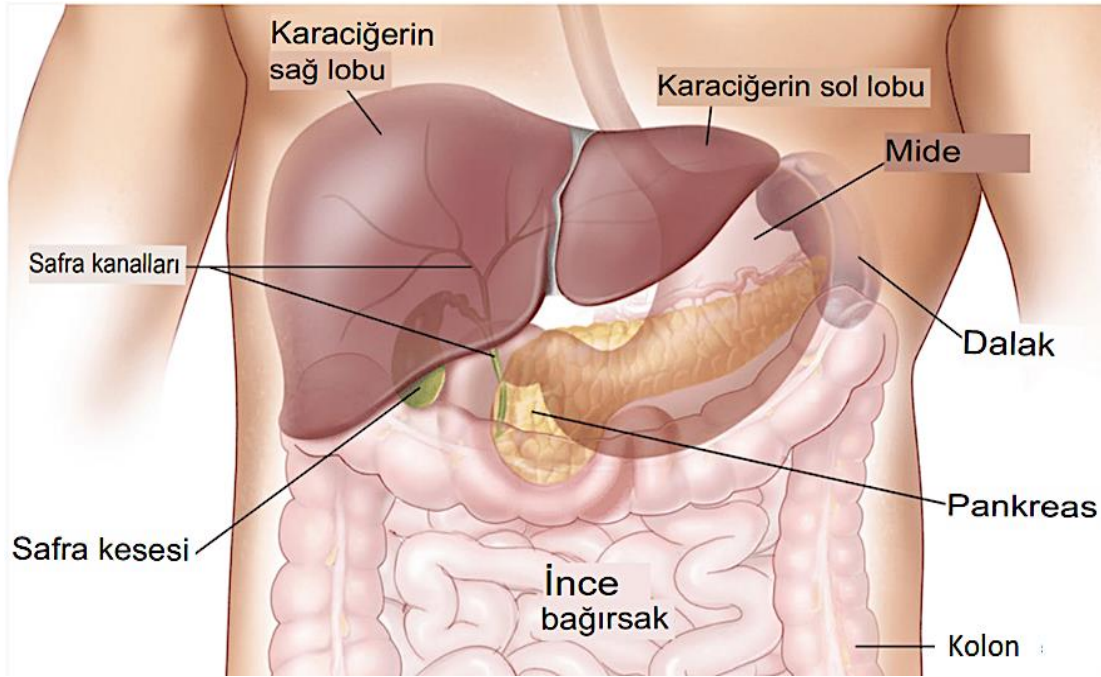
(DNA, RNA, protein ve metabolit) tanımlamak ve ölçmek için tasarlanmış yüksek verimli yöntemleri temsil eden güncel bir yaklaşım olarak son yıllarda dikkat çekmektedir. Kanser fenotipleri, genomdan proteoma doğru farklı bilgi akışı seviyelerinde değişiklikler sergilemektedir. Farklı bilgi işleme seviyelerindeki moleküler değişiklikler, kanser fenotipinin ortaya çıkması için temel oluşturmaktadır. Kansere özgü özellikleri yansıtan temel mekanizmaları anlamak için, genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi farklı omikslerle temsil edilen çoklu bilgi entegrasyonlarını sağlamak ve kanser hücrelerini detaylıca analiz etmek önem kazanmaktadır. OMİKS teknolojileri, özellikle karaciğer kanseri hakkında kritik bilgiler sağlayabilecek detaylı bir platform olarak önemli kabul edilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, bugüne kadar gerçekleştirilen analizler neticesinde tek bir spontan tümör gelişimi vakası kaydedilmemiş olan, deneysel olarak indüklenen karsinogeneze direnci ile önemli bir model organizma olarak kabul edilen ve eşsiz biyolojik karakteristikleri ile dikkat çeken kör köstebek faresi *Spalax spp.*'nin bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* bakterisi tarafından üretilen postbiyotiklerin HSK üzerindeki anti-kanser etkisini küresel OMİKS yaklaşımlarını kullanarak detaylı olarak analiz etmek ve ilişkili biyolojik yolları açığa çıkarmaktır. Bu çalışma kapsamında, postbiyotiklerin anti-kanser mekanizmasının protein, lipid ve metabolit temelinde anlaşılması ve yolak keşfini takiben ortaya çıkabilecek aday proteinler, lipidler ya da metabolitlerin karaciğer kanserinde biyobelirteç ya da biyoterapötik ajan adayı olarak tasarlanması hedeflenmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Karaciğer Fizyolojisi ve Fonksiyonu

Karın boşluğunun sağ üst kısmında, diyaframın altında, midenin, sağ böbreğin ve bağırsakların üstünde bulunan karaciğer (Şekil 2.1) metabolizmayı, bağışıklığı, sindirimi, detoksifikasyonu ve vitamin depolamayı desteklemek gibi bir dizi fonksiyondan sorumlu kritik bir organ olarak kabul edilmektedir. Bir yetişkinin vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturan karaciğer, portal ven (yaklaşık % 75) ve hepatik arterden (yaklaşık % 25) ikili kan desteği sağlaması nedeniyle eşsiz özellikler sergilemektedir (Kalra vd. 2023).

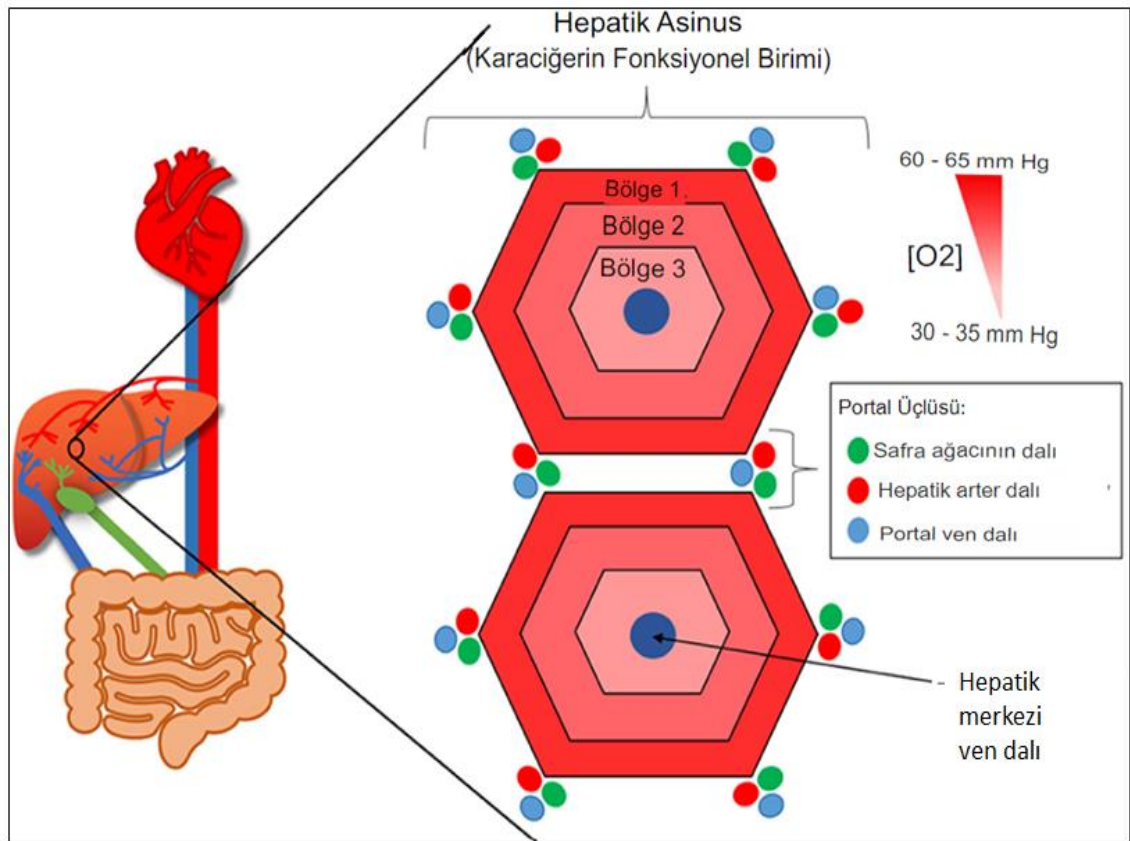


Şekil 2.1 Karaciğerin ve komşu organların göğüs kafesi içerisindeki konumu ve anatomik pozisyonu

Vücuttaki hemen hemen her organ sisteminde rol oynayan karaciğer, sindirime ve metabolizmaya yardımcı olarak endokrin ve gastrointestinal sistemlerle etkileşime girmektedir. Yağda çözünen vitaminlerin depolandığı yer olup kolesterol homeostazisini yönetmektedir. Demir ve bakır depolamakta, pıhtılaşma faktörü ve protein sentezi aracılığıyla hematolojide rol oynamaktadır. Hormon metabolizmasında görev alarak üreme ve gelişmede önemli olan taşıyıcı proteinleri üretmektedir. Sahip olduğu Kupffer

ve Pit hücreleri ile de vücudun immünolojik sistemine önemli katkılar sağlamaktadır (Kalra vd. 2023).

Karaciğerin fonksiyonel birimi olarak tanımlanan lobül altıgen olup her köşesinde bir portal üçlüsü (portal damar, hepatik arter, safra kanalı) bulundurmaktadır. Lobülün temeli, fizyolojik olarak farklı apikal ve bazolateral membranlara sahip olan hepatositlerden meydana gelmektedir. Hepatositler karaciğerin parankimal hücreleri olup tüm karaciğer hücrelerinin % 60'ını oluşturmaktadır. Fonksiyonlarına ve perfüzyona bağlı olarak hepatositler üç temel bölge içermektedir (Şekil 2.2).

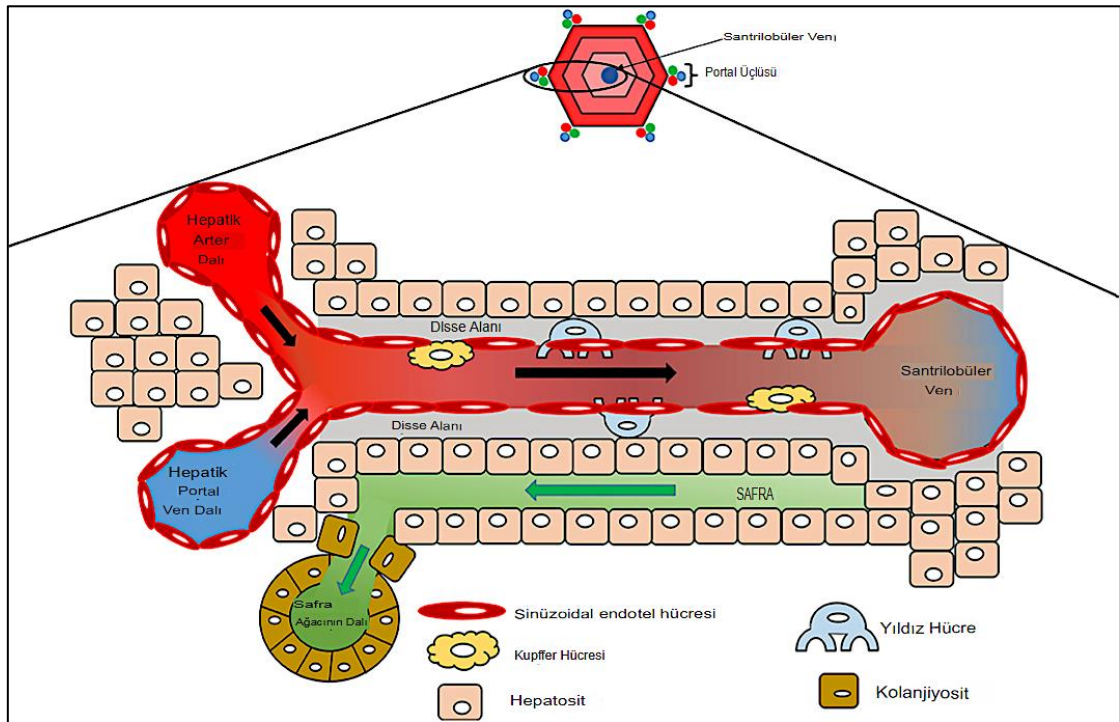


Şekil 2.2 Karaciğerin fonksiyonel birimi veya lobülü (Hepatik asinus) (Cox vd. 2020)

Birinci bölge; hepatositlerin periportal bölgesi olarak kabul edilmekte ve kan ile besinlere yakınlığı nedeniyle en iyi perfüze edilen ve ilk yenilenen bölge olarak belirtilmektedir. Yüksek perfüzyonu nedeniyle bölge I, beta-oksidasyon, glukoneogenez, safra oluşumu, kolesterol oluşumu ve amino asit katabolizması gibi oksidatif metabolizmalarda büyük

bir rol oynamaktadır. Bölge II, hepatositlerin perisantral bölgesi olarak tanımlanmakta ve bölge I ve III arasında yer almaktadır. Bölge III, portal triadına olan uzaklığı nedeniyle en düşük perfüzyona sahip olup detoksifikasyonda, ilaçların biyotransformasyonunda, ketogenezde, glikolizde, lipogenezde, glikojen sentezinde ve glutamin oluşumunda önemli roller oynamaktadır (Cox vd. 2020).

Sinüzoidal lümen ile etrafını saran hepatositlerin bazolateral membranı arasındaki boşluk Disse aralığı olarak isimlendirilmektedir. Bu boşluk, hepatositlerin bazolateral membranından uzanan ve kılcacal damarlarla iletişim kurarak hepatositin kan desteğine ulaşmasını sağlayan mikrovilluslar tarafından işgal edilmektedir. Disse alanı, çeşitli kolajenlerden, proteoglikanlardan ve hepatositlere ve buna bağlı olarak bir bütün olarak lobül için iskele sağlamaya yardımcı olan diğer proteinlerden oluşan hücre dışı bir matrisi barındırmaktadır. Disse alanı ayrıca Kupffer ile Ito hücrelerini de içermektedir (Şekil 2.3).



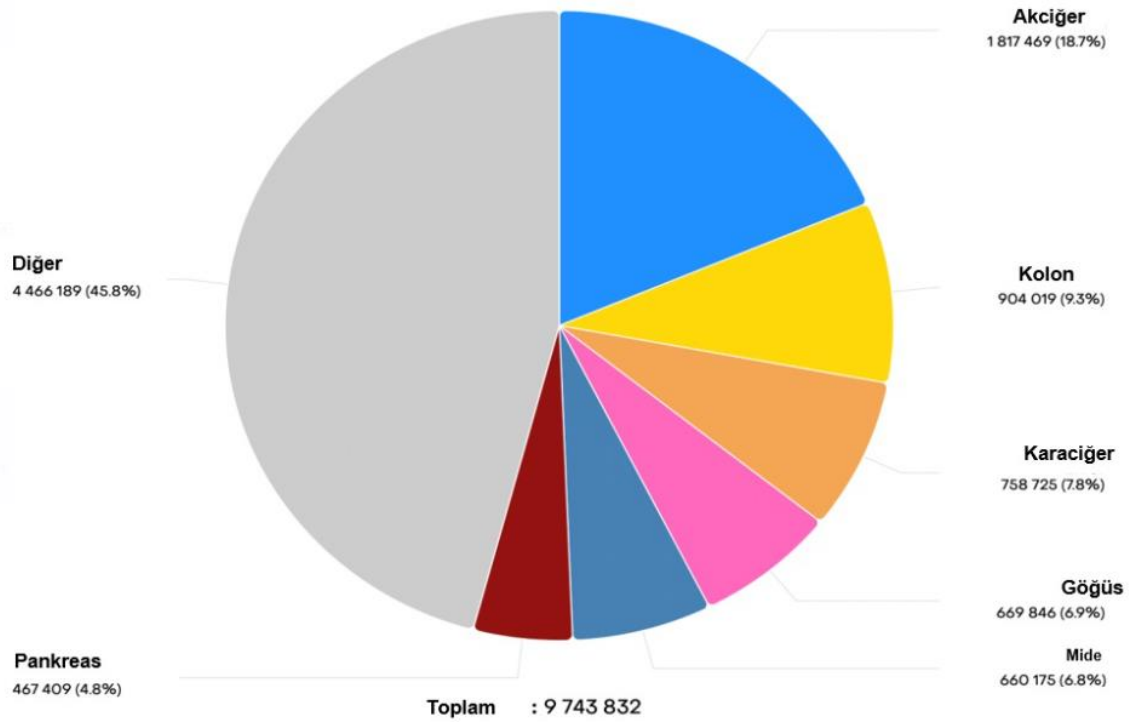
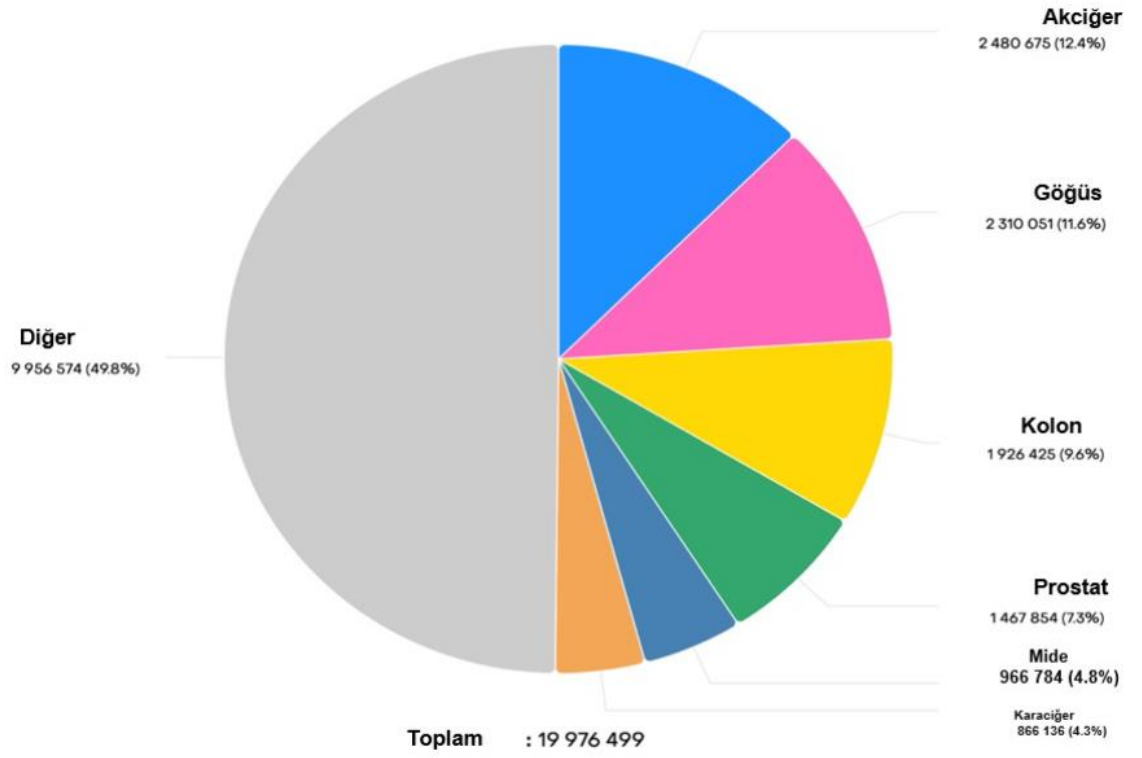
Şekil 2.3 Hepatik lobülün mikroanatomi (Cox vd. 2020)

Kupffer hücreleri, gereksiz veya patolojik materyali dolaşımdan filtrelemek için bu boşlukta bulunmaktadır. Ito hücreleri ise A vitamini gibi metabolitler için depolama görevi görmektedir. Aynı zamanda miyofibroblast olarak da görev yaparak karaciğerin yenilenmesine de yardımcı olabilmektedir (Si-Tayeb vd. 2010).

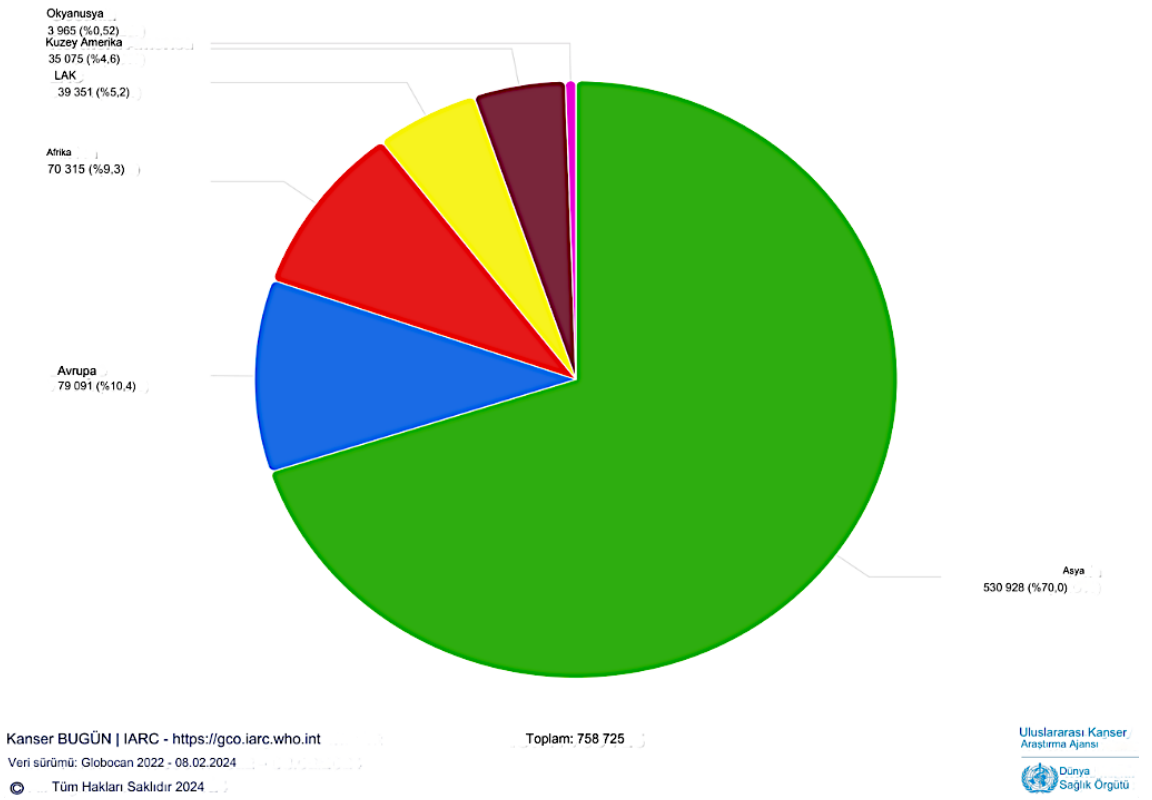
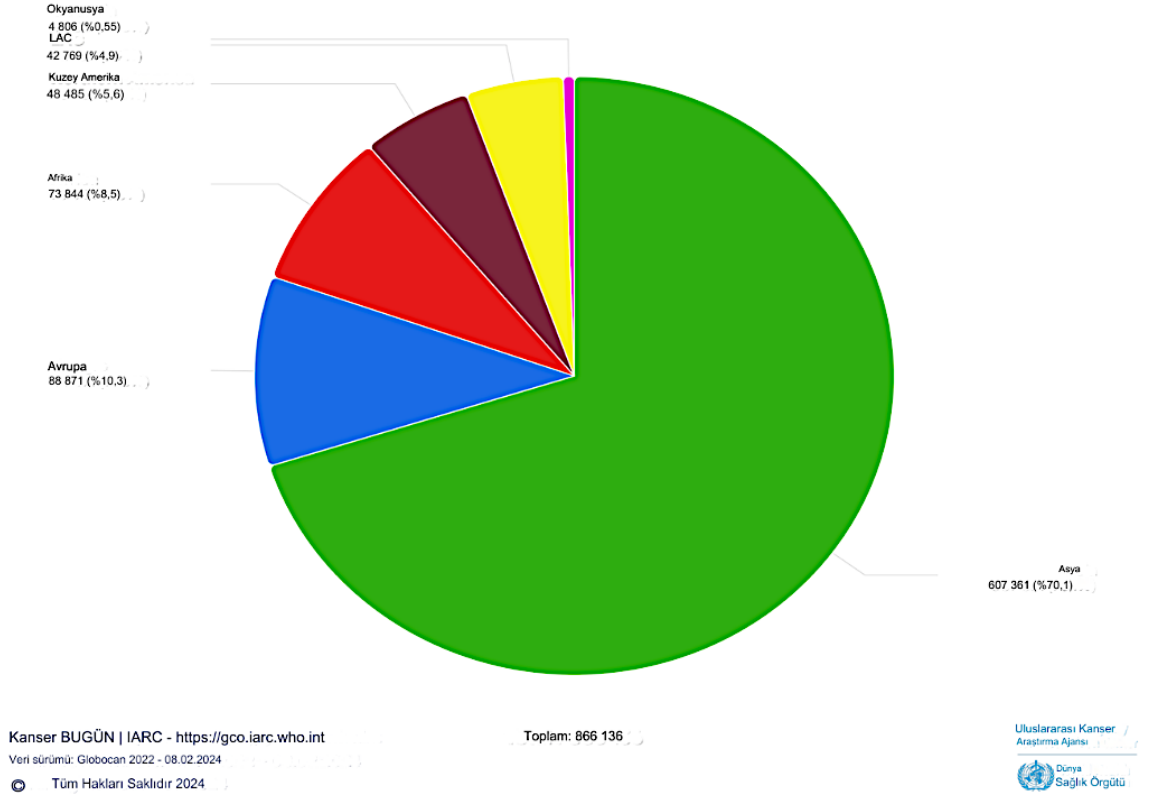
2.2 Karaciğer Kanseri

2.2.1 Epidemiyolojisi

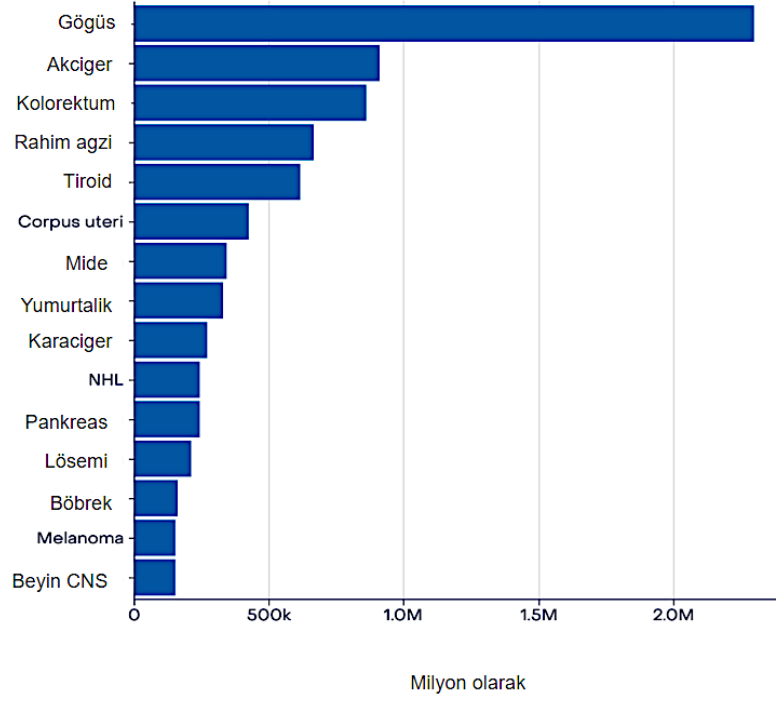
Karaciğer kanseri, 2022 yılında 866.136 yeni vaka ile dünya genelinde en sık görülen altıncı kanser türü, kansere bağlı ölümlerin ise üçüncü önde gelen nedeni olarak rapor edilmektedir (Şekil 2.4). Karaciğer kanseri insidansı dünya çapında hızla artış sergilemekte olup HSK insidans oranı ülkeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık; her ülkenin yaş, cinsiyet, ırk/etnik köken gibi kendine özgü demografik özelliklerine ve HSK ilişkili çeşitli risk faktörlerine bağlanmaktadır. Her iki cinsiyet için 2022 yılına ait HSK insidans ve mortalite oranlarının dünya çapındaki demografik dağılımları Şekil 2.5’de sunulmaktadır. Karaciğer kanserinin en yaygın şekli olan HSK’nın Doğu Asya ülkelerinde insidansının ve mortalitesinin diğer ülkelere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak, Avrupa’nın farklı bölgelerinde ve ABD’de son yıllarda önemli bir artış kaydedilmektedir. Meydana gelen ölümlerin % 70’inin Asya’da % 10.4’ünün ise Avrupa’da gerçekleştiği rapor edilmektedir. Sürveyans epidemiyoloji araştırmalarının son sonuçları, HSK’nın 2000’li yılların başından bu yana ABD’de kansere bağlı ölümlerin en hızlı artan nedeni olduğunu vurgulamaktadır. Bu eğilimlerin devam etmesi halinde HSK’nın 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedeni olacağı öngörülmektedir (Globocan 2022). Her iki cinsiyet için gözlemlenen kanser çeşitlerine ait 2022 yılı insidans verileri incelendiğinde HSK’nın kadınlarda en sık görülen dokuzuncu, erkeklerde ise beşinci sırada yer aldığı görülmektedir (Şekil 2.6). Veriler mortalite açısından değerlendirildiğinde ise HSK’nın diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında kadınlarda beşinci, erkeklerde ise ikinci ölüm nedeni olduğu rapor edilmektedir (Şekil 2.7) (Globocan 2022).



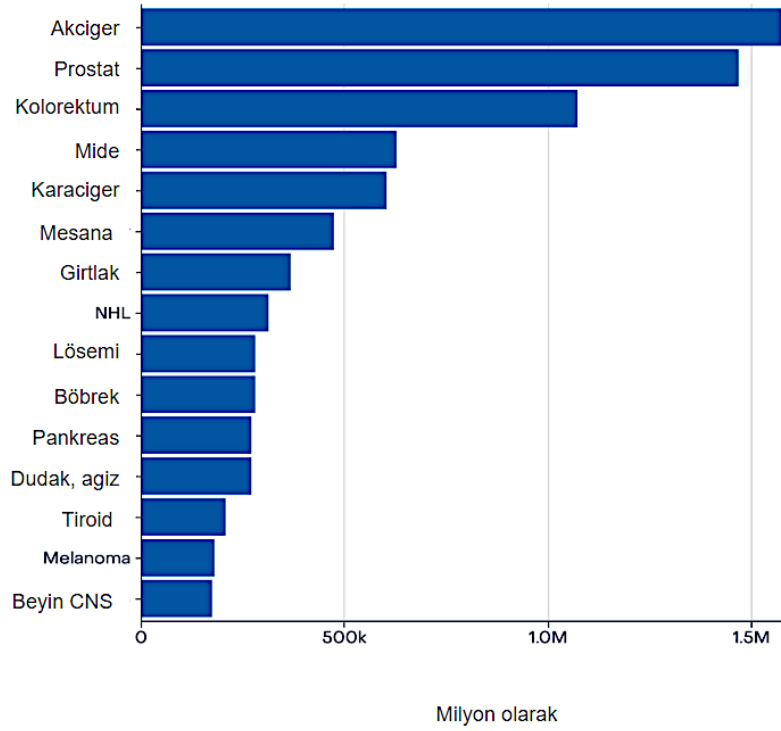
Şekil 2.4 Dünya genelinde 2022 yılına ait kanser insidans ve mortalite oranları



Şekil 2.5 2022 yılına ait HSK insidans ve mortalite oranlarının demografik dağılımı



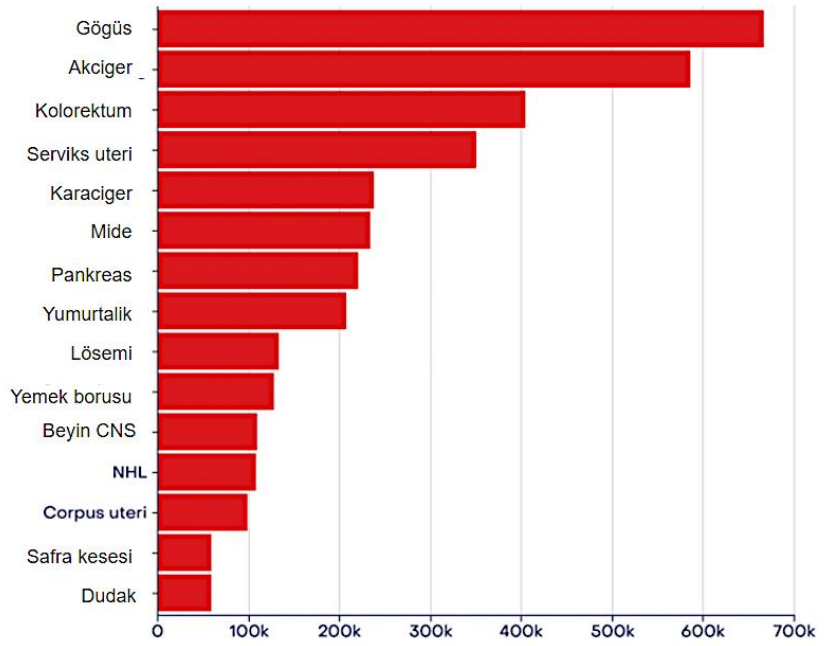
Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int>
 Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int>
 Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024

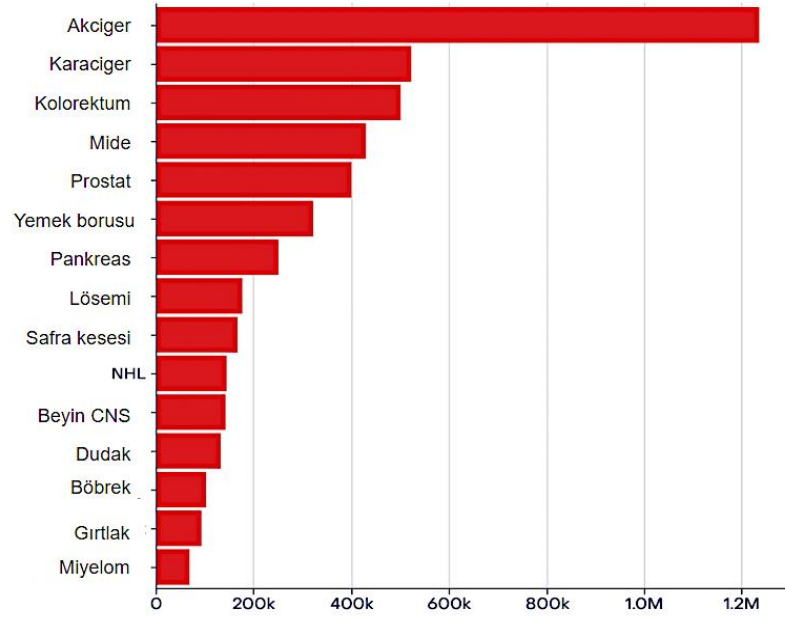


Şekil 2.6 Kadın ve erkekler için 2022 yılına ait kanser insidans oranları



Bin olarak

Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int>
 Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024



Milyon olarak

Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int>
 Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024

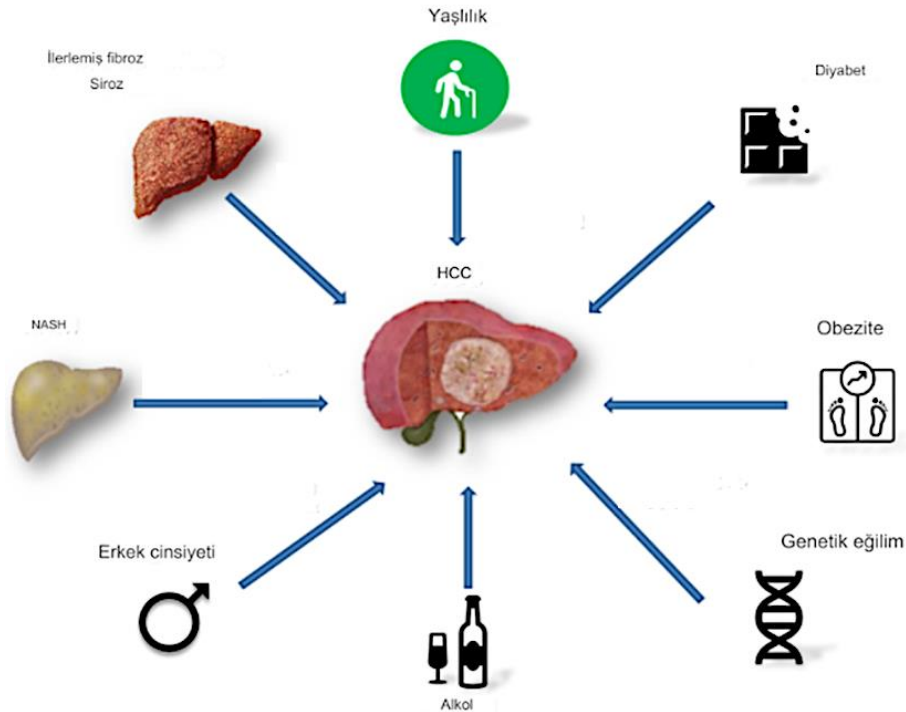


Şekil 2.7 Kadın ve erkekler için 2022 yılına ait kanser mortalite oranları

HSK hastalığının teşhis ve tedavisi ekonomik anlamda ülkeler arasında değişkenlik göstermesine rağmen oldukça maliyetli bir süreçtir. Kanada’da, HSK’lı bir hastanın 5 yıllık net bakım maliyeti ortalama 77.509 \$ (Paik vd. 2020) iken Birleşik Devletler’de hasta başına yıllık doğrudan maliyet ortalaması 176.456 \$ olarak rapor edilmektedir (Kohn vd. 2019).

2.2.2 Risk faktörleri

HSK vakalarının % 90’ından fazlası kronik karaciğer hastalığı ortamında ortaya çıkmaktadır. Herhangi bir etiolojiden kaynaklanan siroz, HSK için en güçlü risk faktörü olarak rapor edilmektedir. Bununla birlikte, kronik alkol tüketimi, diyabet veya obezite ile ilişkili alkolik olmayan steatohepatit (NASH) ve hepatit B ile C (HBV ve HCV) enfeksiyonu başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır (Şekil 2.8). HSK için daha az yaygın olan diğer risk faktörleri arasında primer biliyer kolanjit, hemokromatozis ve α 1-antitripsin eksikliğinden kaynaklanan siroz yer almaktadır (Marrero vd. 2018).



Şekil 2.8 Karaciğer kanseri temel risk faktörleri (Plaz Torres vd. 2020)

Küresel olarak, hepatit B virüsü (HBV), çoğu düşük gelirli ve düşük-orta gelirli ülkelerde evrensel aşılamanın olmaması nedeniyle siroz ve HSK'nın önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. HBV enfeksiyonu Asya ve Afrika'daki HSK vakalarının yaklaşık % 60'ını, Batı'daki vakaların ise % 20'sini oluşturmaktadır. HBV; konak genomuna entegre olabilen, insersiyonel mutajenezi indükleyerek onkogen aktivasyonuna yol açan önemli bir DNA virüsüdür. Siroz olmayan olgularda dahi HSK riskini artırmaktadır. HBV aşılama programları HSK insidansında azalmaya yol açmış olmasına rağmen henüz birçok ülkede evrensel aşılama programlarına dahil edilmemektedir. Kronik hepatit B virüsü (HCV) enfeksiyonu ise, Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da HSK hastaları arasında en yaygın risk faktörü olarak kabul edilmektedir. HBV'nin aksine HCV; konak genomuna entegre olmayan bir RNA virüsüdür. Bu nedenle, HSK riski öncelikle siroz veya fibroz ile kronik karaciğer hasarı gelişenler arasında sınırlı olmaktadır. Doğrudan etkili antiviral ajanların kullanılmasıyla, giderek artan HCV enfeksiyonu olan hasta oranı başarılı bir şekilde tedavi edilebilmekte ve bu da HSK riskinde % 50-80'lik bir azalmaya neden olmaktadır (Kanwal vd. 2017). Hepatit D virüsü (HDV) ise replikasyonu ve dolayısıyla enfektivitesi için HBV yüzey antijenlerinin varlığına ihtiyaç duyan bir RNA virüsüdür. HDV'nin küresel olarak 20-40 milyon insanı etkilediği tahmin edilmektedir. Kohort çalışmaları HBV/HDV ko-enfeksiyonunun, tek başına HBV enfeksiyonuna kıyasla artmış HSK riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Puigvehi vd. 2019).

Aşırı alkol alımı alkolik karaciğer hastalığı, siroz ve HSK'ya neden olan bir diğer önemli risk faktörüdür. Günümüzde giderek artan kronik alkol tüketimine bağlı olarak çok sayıda siroz veya NASH olgusu rapor edilmektedir. Alkole bağlı siroz, % 2-3'e kadar değişen yıllık insidansa sahip olup coğrafi bölgeye bağlı olarak HSK vakalarının yaklaşık % 15-30'una sebebiyet vermektedir (Jepsen vd. 2012). Kronik alkol alımı diğer etiyolojilerden kaynaklanan HSK riskini de artırabilmektedir. Örneğin, çeşitli çalışmalar alkol tüketen HBV taşıyıcılarında alkol tüketmeyenlere kıyasla HSK riskinin arttığını ortaya koymaktadır (Lin vd. 2013).

Güncel araştırmalar, alkolik karaciğer hastalığı (ALD) ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ile bunun şiddetli formu olarak nitelendirilen NASH'nin Asya ülkelerinde sirozun önemli nedenleri haline geldiğine ve potansiyel olarak gelecek

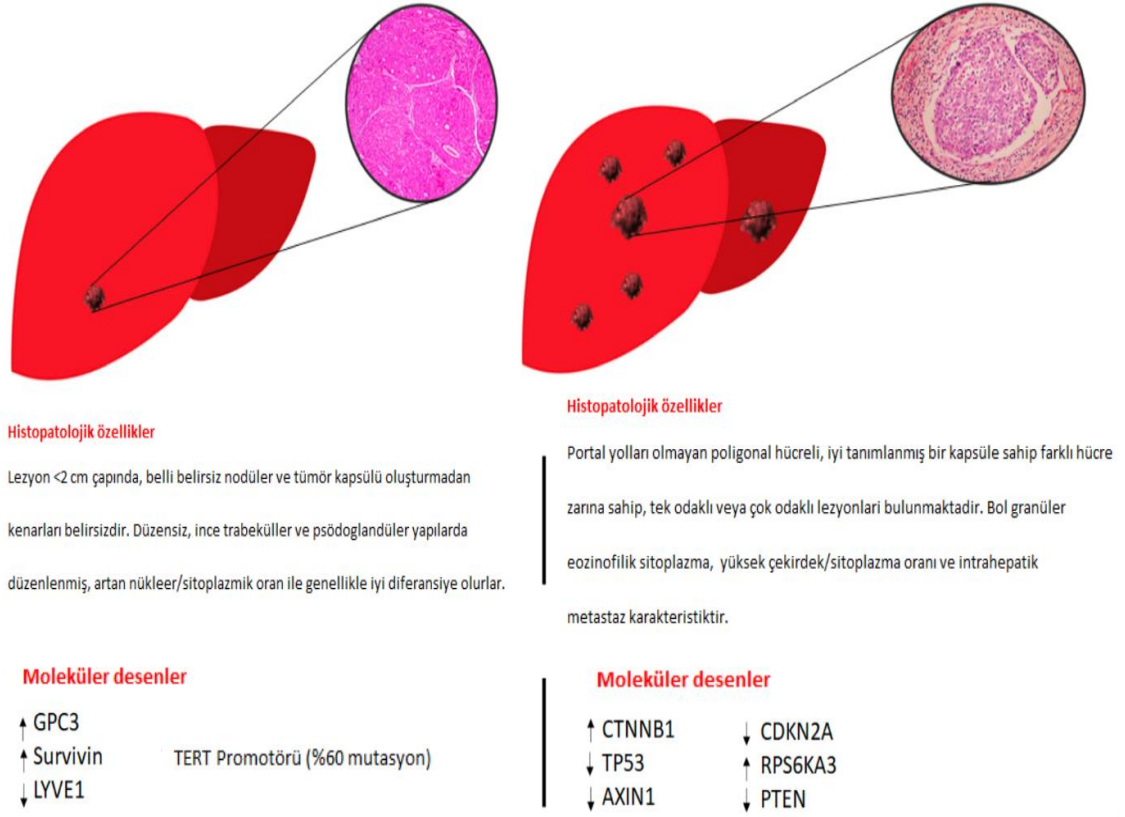
yıllarda HBV'yi geçeceğine işaret etmektedir. NASH, özellikle diyabet ve obezite hastalarında HSK gelişiminde öncül bir faktör olarak dikkat çekmektedir. Obezitenin artan prevalansı nedeniyle NASH, dünyanın birçok bölgesinde sirozun en yaygın nedenleri arasında yer almaktadır. NASH'ye atfedilen HSK oranı ise 2010 yılından bu yana hızla artmış olup, günümüzde Batı'daki vakaların % 15-20'sini temsil etmektedir. Çeşitli çalışmalar NASH ile ilişkili HSK vakalarının % 25-30'unun siroz olmaksızın da ortaya çıktığını göstermektedir (Kanwal vd. 2018).

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen toksinler olarak nitelendirilmektedir. Sahra altı Afrika, Doğu Asya ve Güney Amerika'daki tropikal ve subtropikal iklimlerde toprakta, çürüyen bitkilerde, saman ve tahıllarda bulunan zehirli kanserojen ve mutajen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Aflatoksin B1 maruziyeti, HBV ile sinerjik olarak hareket eden artmış HSK riski ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle HSK'da TP53 ve ADGRB1 genindeki spesifik mutasyonlar aflatoksin maruziyeti ile açıklanmaktadır (Kew 2013, Zhang vd. 2017).

Çeşitli sosyodemografik özellikler HSK gelişimi açısından önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. Yaşlanma, güçlü bir etken olarak değerlendirilmekte olup en yüksek yaşa bağlı HSK insidansı 70 yaş üstü bireylerde bildirilmektedir (Rich vd. 2020). Ayrıca, HSK'nın erkeklerde daha baskın bir hastalık olduğu rapor edilmektedir (erkek/kadın oranı=3:1). Bu farklılığın, muhtemelen risk faktörlerinin erkekler arasında kümelenmesi ve cinsiyet hormonlarındaki farklılıklarla ilgili olabileceği belirtilmektedir (Bray vd. 2018). Çalışmalar, başta Hispanikler olmak üzere ırksal veya etnik azınlıklar arasında HSK insidansının beyaz bireylerde daha yüksek olduğunu bildirmektedir (Rich vd. 2019). Epidemiyolojik çalışmalar ayrıca HSK riskinin sigara kullanımı ile arttığını da vurgulamaktadır (Lee vd. 2009). Bununla birlikte, kahve ve aspirinin önleyici etkisini gösteren çalışmalar haricinde, diyetin HSK riskini azaltmadaki rolü belirsizliğini halen korumaktadır (Bravi vd. 2013).

2.2.3 Moleküler Mekanizması

HSK'da moleküler patogenezi, karaciğer hücrelerine önemli ölçüde hasar veren ve hücrelerin çoğalma mekanizmalarını tamamen düzensizleştiren, kronik bir karaciğer hasarından kaynaklanan hücresel ve moleküler düzeyde bir dizi bozukluğun sonucu olarak tanımlanmaktadır (Motola-Kuba vd. 2006). Meydana gelen moleküler düzensizlikler farklı histolojik ve moleküler paternlere sahip belli belirsiz nodüller bir lezyonun oluşumunu tetiklemeye başlamakta ve bu lezyon, karaciğer hasarı ilerledikçe klinik olarak ilerlemiş bir kanser gelişene kadar karaciğer mimarisinin tüm segmentlerine yayılmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Hepatoselüler karsinomun histopatolojik ve moleküler özellikleri GPC3, glipikan 3; LYVE1, lenfatik damar endotelial hyaluronan reseptörü-1; TERT, telomeraz ters transkriptaz; CTNNB1, katenin beta-1; TP53, tümöral protein-53; CDKN2A, sikline bağımlı kinaz inhibitörü-2A; RPS6KA3, ribozomal protein S6 kinaz-A3; PTEN, fosfatase ve tensin homoloğu (Mendez-Sanchez vd. 2021)

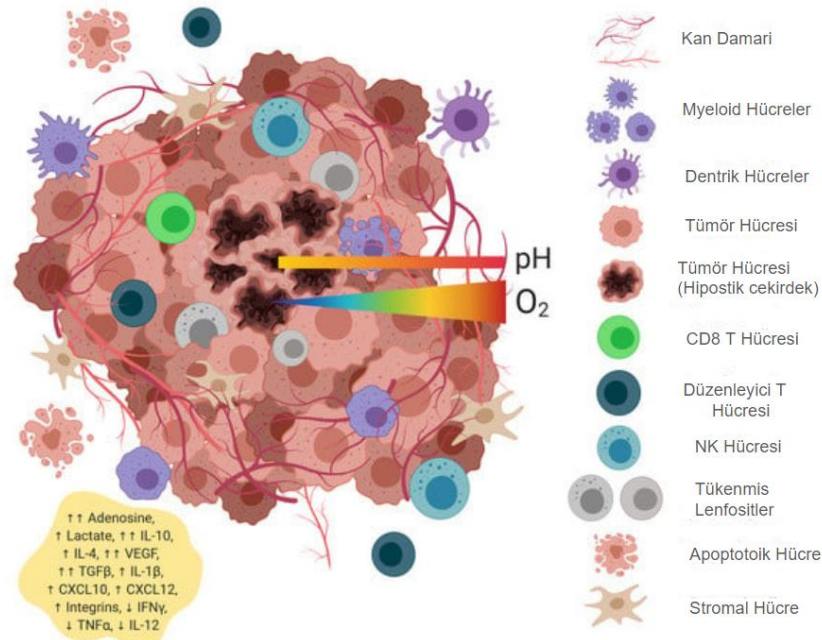
HSK gelişiminde oldukça heterojen bir tümör çevresi rol oynamaktadır. Güncel bulgular, HSK gelişiminde karaciğer progenitör hücrelerinin de önemli bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Chen vd. 2012, Tarlow vd. 2014). Progenitör hücreler kendi başlarına neoplastik hücrelerin gelişimine yol açabilmekteyken benzer şekilde olgun hepatositler de progenitör hücrelere dediferansiyasyon geçirebilmekte ve aynı zamanda neoplastik hücrelerin oluşumuna yol açabilmektedir. Bu yolaklar hala net olarak anlaşılammış olmakla birlikte, kök hücre paternine sahip karaciğer kanserlerinin daha agresif olduğu ve bu özelliklere sahip olmayanlara göre daha kötü prognoz sergilediği öne sürülmektedir. Progenitör hücrelerin dahil olup olmadığına bakılmaksızın, karaciğer hücreleri ve mikroçevreleri arasındaki düzensizliklerin neoplastik lezyonların gelişimi için çok önemli bir adım olduğu belirtilmektedir. Karaciğer tümörlerinin yaklaşık % 90'ı kronik inflamasyon koşulları altında gelişmektedir. Bu durum, bağışıklık ile ilişkili tedavilerin HSK için terapötik bir strateji olarak önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Sia vd. 2017).

HSK'nın erken evrelerinden itibaren hastaların % 60'ında tespit edilen en önemli mutasyon TERT promotor bölgesinde meydana gelmektedir (Nault ve Villanueva 2015). Karaciğer tümörlerinin % 40'ından fazlasında ise *CTNNB1* gen mutasyonları tespit edilmiştir (Takai vd. 2014). TP53 sinyalizasyonundaki mutasyonların ise daha çok HBV enfeksiyonu ve HCV yokluğu ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Kawai-Kitahata vd. 2016). Bununla birlikte, çeşitli gıdalarda bulunan ve *Aspergillus* sp. tarafından üretilen aflatoksinlerin de DNA üzerindeki TP53 geninin 249. kodonunda AGG'nin AGT'ye dönüşümü yani argininin serine eklenmesi (R249S mutasyonu) yoluyla mutasyonunu indükleyebildiği belirtilmektedir. Karaciğer tümörlerinde TP53 gen mutasyonu, immün yanıtın aşağı regülasyonu nedeniyle kötü prognoz ve klinik sonuçlarla ilişkilendirilmektedir (McCullough vd. 2019, Ferreira vd. 2019). Ayrıca, TP53 sinyali, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF-A) düzenlediği düşünülen anjiyogenezin önemli bir modülatörüdür (Kawai-Kitahata vd. 2016).

Mikro-RNA'lar, RNA susturma ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynayan küçük kodlamayan RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır (Mendez-Sanchez vd. 2020). HSK'da en çok çalışılan moleküller

arasında mikroRNA-122 molekülü yer almaktadır. Mikro-RNA-122, Wnt/ β -katenin yolunda kilit bir işlevi olan karaciğere özgü bir mikro-RNA olup deregülasyonunun HSK hastalarında farmakolojik tedaviye direnç sağladığına inanılmaktadır (Fu ve Callin 2018). Bununla birlikte, uzun kodlamayan RNA'ların ise Wnt-Beta Catenin ve STAT3 gibi önemli moleküler yolları düzenleyerek karaciğer karsinogenezini indüklediği belirtilmektedir. Benzer çalışmalar, kodlanmayan RNA moleküllerinin HSK prognozunda noninvaziv biyobelirteçler olarak umut verdiğine dikkat çekmektedir (Qui vd. 2019).

Son yıllarda tümör mikroçevresi (TME) olarak dikkat çeken bir kavram, kanserin ilerlemesini açıklayan en önemli modellerden biri olarak belirtilmektedir. HSK'nın karmaşık ekosistemi yalnızca tümör hücrelerini değil aynı zamanda tümör içinde bulunan malign olmayan hücreleri, damarları, lenfoid organları veya lenf düğümlerini, sınırları, hücreler arası bileşenleri ve metabolitleri de içermektedir (Şekil 2.10). Tüm bu hücreler arasındaki etkileşim; tümör büyümesi, hayatta kalması ve hatta metastazında rol oynayan yolların aktif hale gelmesini sağlamaktadır (Jin ve Jin 2020, Villanueva 2019).



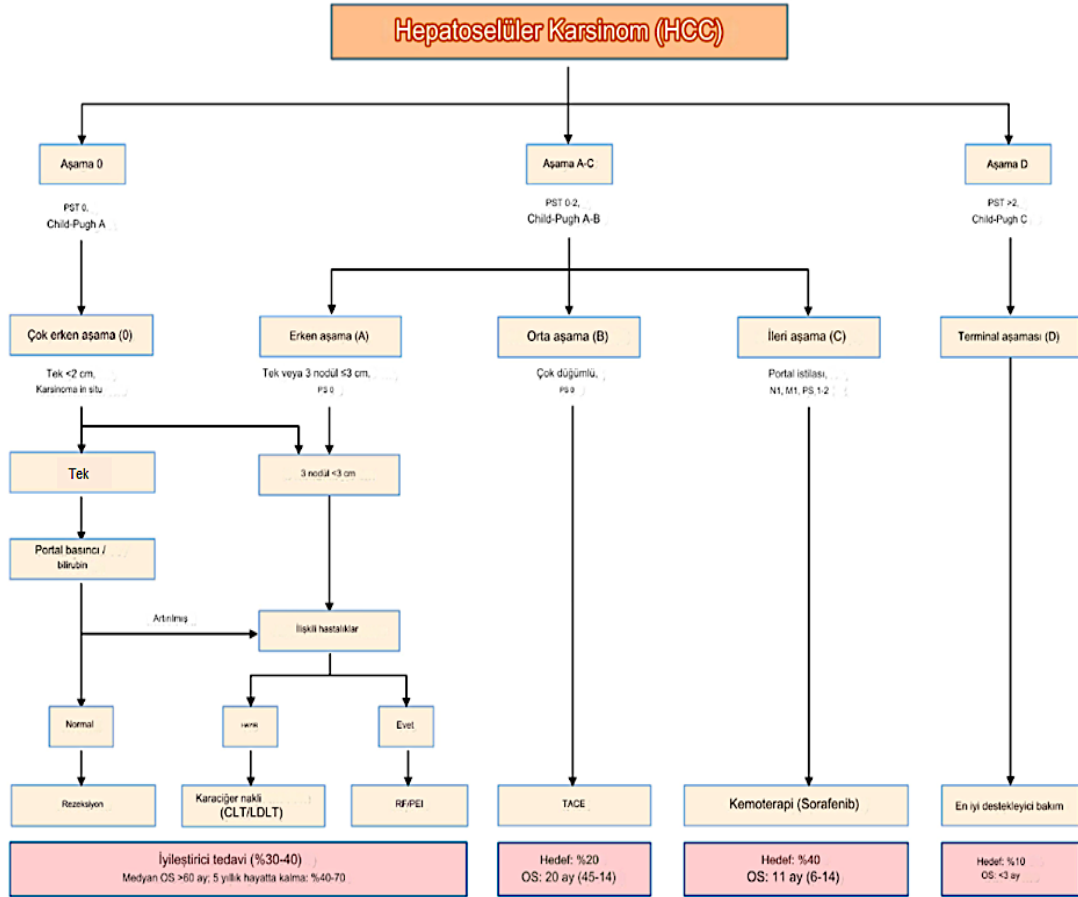
Şekil 2.10 Tümör mikroçevresinin bileşenleri (Fernandez vd. 2019)

Esas olarak tümöral karaciğer dokularında biriken Treg, CD8 T hücrelerinin perforin ve granzim aktivitesini inhibe ederek tümöre karşı immün aktiviteyi baskılamaktadır. Buna ilaveten, CD8 T hücreleri, KC'ler gibi diğer immün hücreler tarafından fagositik ve sitokin salgılama aktiviteleriyle (özellikle IL-10 ve TGF β salgılayarak) inhibisyon sağlayabilmektedir. İkinci mekanizmaya ek olarak, KC'ler programlanmış ölüm-ligand 1 (PDL-1) üreterek CD8 T hücrelerinin aktivitesini baskılamakta ve aynı zamanda sitotoksik T lenfosit antijen 4'ü inhibe ederek HSK malign progresyonunu desteklemektedir. Son olarak, KC'ler IL-1 ve TNF- α tarafından aktive edildiğinde, anjiyogenez, fibrogenez ve karsinogenezde rol oynayan bir protein olan osteoponin üretmektedirler. KC'lerin yanı sıra diğer makrofaj popülasyonları da HSK'da önemli bir rol oynamaktadır. Tümör hücreleri çeşitli büyüme faktörleri ve interlökinler aracılığıyla makrofajları aktive edebilmekte ve böylece aktive M2 makrofajlara dönüşebilmektedir. Bu makrofajların artan içeriği anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir. Anormal bir yapı ve düzensiz büyüme, immünosupresyon fenotipine sahip M2 makrofajlarının aktivasyonuna yol açan hipoksiyi teşvik etmektedir (Novikova vd. 2017, Wen vd. 2016). Bu nedenle, HSK TME'sindeki immün hücreler arasındaki dengesizlik sadece tümöral büyümeye neden olmakla kalmamakla, aynı zamanda immün yanıtın engellenmesi ve TGF- β ve anjiyojenik faktörlerdeki seviyelerin artması nedeniyle kontrolsüz büyümeyi de teşvik etmektedir.

2.2.4 Sınıflandırılması ve evreleri

1985'te önerilen Okuda skorundan bu yana, Karaciğer Kanseri İtalyan Programı (CLIP), Tokyo skoru, bilirubin-albuminAFPL3-AFP-DCP (BALAD), Geliştirilmiş Karaciğer Kanseri Prognostik Sistem, Hong Kong Karaciğer Kanseri Çalışması (HKLC), İtalyan Karaciğer Kanseri Çalışması gibi farklı evreleme sistemleri geliştirilmeye devam etmektedir (Karademir 2018). Ancak bu sınıflandırmaların çoğu, yalnızca kendi bölgelerinde ve belirli HSK etiyojileri için doğrulanmış olma dezavantajı sergilemektedir. Evrensel olarak tam kabul görmüş bir sınıflandırma olmamasına rağmen, 1999 yılında oluşturulan Barselona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC), her evre için kanıta dayalı klinik ve cerrahi tedavi öneren ilk sistem olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.11). Günümüzde BCLC sınıflandırması, çok sayıda klinik çalışmada harici olarak

doğrulanması nedeniyle Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği ve Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışmaları Derneği tarafından önerilen evreleme sistemi olarak kabul görmektedir (Marrero vd. 2018, Llovet vd. 1999).



Şekil 2.11 Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sınıflandırması (PST: performans durumu testi; Not: performans durumu; CLT: kadavradan karaciğer nakli; LDLT: canlı donörden karaciğer nakli; RF: radyo frekansı ablasyonu; PEI: perkütanöz etanol enjeksiyonu; TACE: transarteriyel kemoembolizasyon; OS: genel hayatta kalma (Far vd. 2023)

Evreleme sistemleri, her hasta için hangi tedavi seçeneklerin en uygun olduğunun değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Bu bağlamda BCLC evreleme kriterleri ve Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu (ECOG) Performans Durumu Ölçeği tedavi modalitesi kararında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Derecelendirme beş puanlık bir ölçek üzerinden gerçekleştirilmektedir. Buna göre T tümör, N lenf tutulumu ve M uzak organ yayılımını tanımlayacak şekilde skorlanmaktadır (Tanaka vd. 2011, Balogh vd. 2016).

Evre I (T1, N0, M0); kan damarı invazyonu olmayan tek bir tümör (herhangi bir boyutta) varlığını, Evre II (T2, N0, M0); kan damarı invazyonu olan tek bir tümör (herhangi bir boyutta) veya tümü <5cm olan birden çok tümör varlığını, Evre IIIA (T3, N0, M0); en az biri 5 cm'den büyük olan birçok tümör veya portal veya hepatik ven invazyonu gösteren tümör varlığını, Evre IIIB (T4, N0, M0); komşu organ (safra kesesi dışında) invazyonu gösteren tümör veya karaciğerin dış duvarına yerleşen tümör varlığını, Evre IIIC (herhangi T, N1, M0); bölgesel lenf düğümü invazyonu gösteren her boyuttan tümör/tümörler varlığını, Evre IV (herhangi T, herhangi N, M1) ise; vücudun diğer bölümlerine yayılmış lenf düğümü olarak değerlendirilmektedir.

2.2.5 Tanı yöntemleri ve belirteçleri

HSK vakalarının çoğunun tanımlanabilir bir hasta popülasyonu olan kronik hepatit B veya sirozu olan kişilerde meydana geldiği göz önüne alındığında, birçok hastaya sürveyans yoluyla tanı konulabilmektedir. Bazı hastalar ise karın ağrısı, kilo kaybı veya karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi durumlarla kliniklere başvurmakta ve ileri testler neticesinde tanı alabilmektedir (Marrero vd. 2018).

Kanda bulunan ve proteinler, sitokinler, enzimler ve bağımlı genlerin transkriptleri olarak sınıflandırılabilen bazı biyobelirteçler HSK'nın erken tespiti için önemli kabul edilmektedir. AFP (alfa-fetoprotein), glikoprotein temelli bir biyobelirteç olup HSK tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Des γ karboksiprotrombin (DCP), HSK hücreleri tarafından üretilen yeni bir serolojik biyobelirteç olarak belirtilmektedir. Özellikle Doğu Asya ülkelerinde intrahepatik metastazı ve HSK prognozunu ayırt etmede etkili bir biyobelirteç olarak sunulmaktadır. Golgi proteini 73 (GP73) farklı insan dokularının epitelyal hücrelerinde, tip II Golgi transmembran glikoproteini olarak ifade edilmekte ve HSK hastalarında yüksek oranda bulunmaktadır. Duyarlılığı SFP'den daha yüksek olarak rapor edilmektedir. α L-fukozidaz fuko-glikokonjugatları parçalama yeteneğine sahip bir enzim olup HSK hastalarında benign hepatik bozukluğu olan diğer hastalara göre daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bu nedenle HSK'yi erken tespit eden bir biyobelirteç olarak tanımlanmaktadır. Karbonhidrat antijeni 199 (CA19-9) farklı tipteki adenokarsinomların tanısına yönelik genel bir biyobelirteç olmasına rağmen lenf

nodu metastazı için tanı amaçlı bakılması önerilmektedir. Osteopontin (OPN) integrine bağlanan fosforile edilmiş hücre dışı bir protein olup HSK ilişkili hepatit C viral tanısı alan ve kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek oranda tespit edilmektedir. Bu nedenle, HSK'nın erken bir biyolojik belirteci olarak rapor edilmektedir (Mansouri vd. 2020).

HSK tanısına yönelik histopatolojik yöntemler, immünohistokimya teknikleriyle tamamlanan önemli bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, kanser dokularındaki biyobelirteçler, tümör hücrelerinin durumunu ve morfolojisini gösterebilmekte ve HSK tanı ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Isı şoku proteini 70, hepatositparafin 1, arginaz 1, sitokeratin ve glutamin sentaz HSK tanısı için bazı önemli doku biyobelirteçleri arasında yer almaktadır (Mansouri vd. 2020).

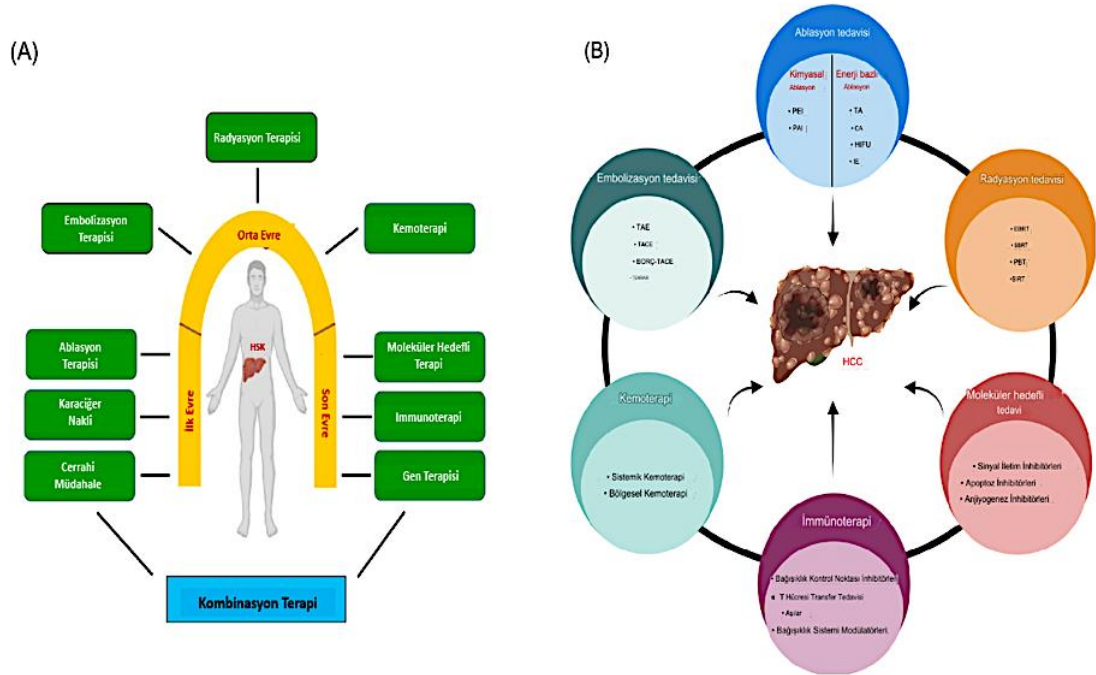
Tanı yöntemleri arasında yer alan görüntüleme teknolojileri HSK tanısında oldukça önemli kabul edilmektedir. Abdominal ultrasonografide karaciğer nodülü saptanması yüksek serum α -fetoprotein düzeyleri (> 20 ng/mL) ile birlikte risk içermektedir. Çapı ≥ 1 cm olan lezyonlarda tanısal doğrulama için faz kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yapılmaktadır. Lezyon < 1 cm ise 1-2 yıl boyunca her 3-6 ayda bir yakından izlenmesi önerilmektedir. Bununla birlikte, uygulama kılavuzları HSK'nın moleküler olarak da karakterize edilmesi için biyopsi önermektedir. Hepatoselüler neoplazi için Uluslararası Konsensüs Grubu, HSK tümörlerinin stromal invazyon, artmış hücre yoğunluğu, intratümöral portal traktlar, eşleşmemiş arterler, yalancı glandüler patern ve yaygın yağlı değişiklikleri içeren başlıca histolojik özellikler içerdiğini rapor etmektedir. Biyopsinin duyarlılığının yaklaşık % 70 oranında olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle biyopsisi negatif olan hastaların seri kontrastlı görüntüleme ile takip edilmeye devam edilmesi önerilmektedir (Kojiro vd. 2009).

2.2.6 Tedavi yöntemleri ve sınırlılıkları

HSK'nın terapötik yönetimi karmaşık bir konu olarak değerlendirilmektedir. İdeal tedavi, her vaka için bireyselleştirilmeli ve tümör tipinde deneyimi olan hepatologlar, onkologlar, cerrahlar ve radyologları içeren multidisipliner bir grup tarafından oluşturulmalıdır.

Bununla birlikte, her kurumun elindeki kaynaklar, hastane merkezinin deneyimi ve hastanın kararı tüm vakalarda göz önünde bulundurulmalıdır.

HSK vakalarının yaklaşık % 80-90'ının sirozlu hastalarda gelişmesi nedeniyle mevcut olgu benzersiz bir neoplazm olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle, hastanın genel sağlık durumu dikkate alınarak farklı tedavi seçeneklerinin uygulanması sınırlı olabilmektedir. Ancak, son yıllarda elde edilen güncel gelişmeler ışığında, HSK'nın tedavi yönetimi önemli ölçüde iyileşme sergilemektedir (Şekil 2.12). Tedavi, BCLC evreleme sistemini takiben tümör evrelerine ve majör müdahalelerin beklenen faydalarına göre belirlenmektedir. Prensip olarak, erken evre HSK tümürlü hastalar rezeksiyon, transplantasyon ve lokal ablasyon uygulanan hastalar olurken, orta evre hastalar ilk olarak transarteriyel kemoembolizasyon uygulamasına dahil edilmektedir. İleri evre hastalığı olanlara ise sistemik tedaviler uygulanmaktadır (EASL 2018).



Şekil 2.12 Tedavi seçenekleri (a) ve farklı uygulamaları (b) (Suresh vd. 2023)

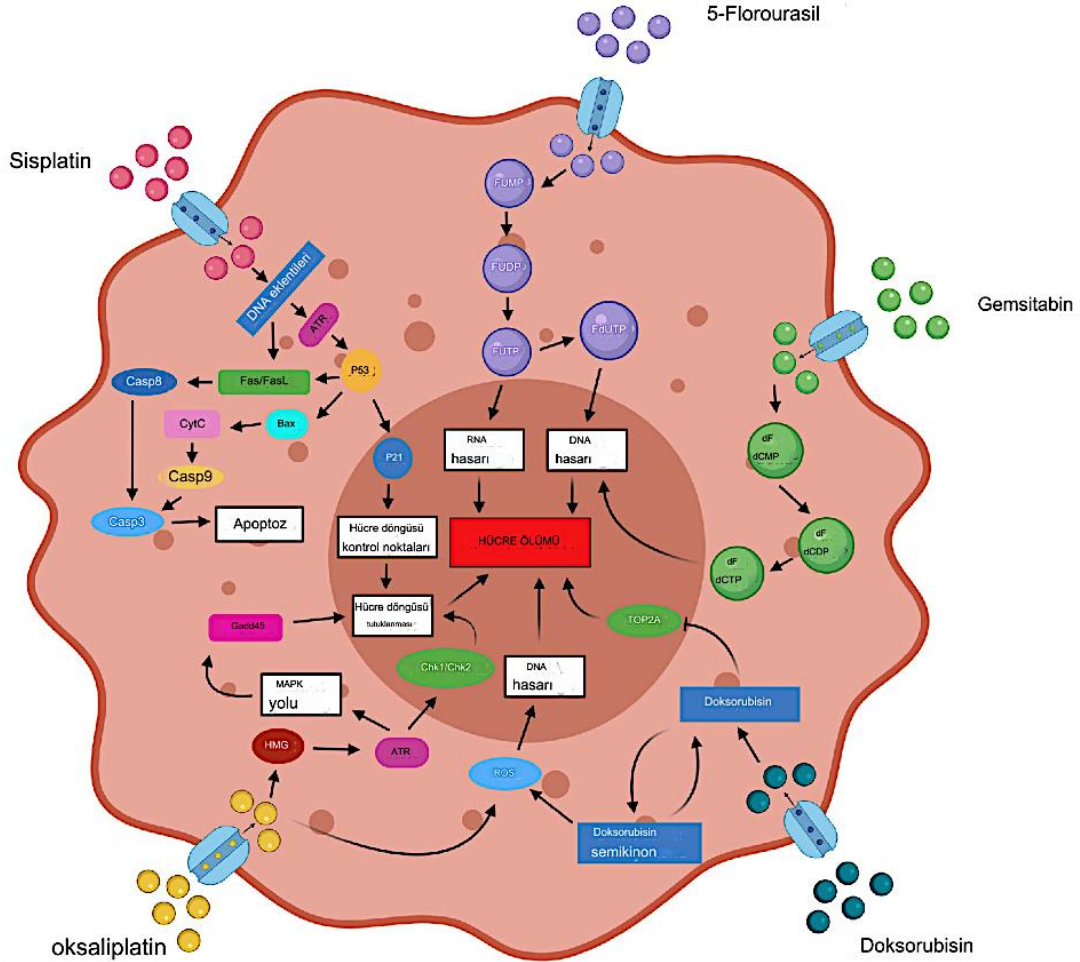
Hem hepatik rezeksiyon hem de karaciğer transplantasyonunu içeren cerrahi tedavi, uzun süredir HSK hastaları için küratif tedavilerin bel kemiğini oluşturmakta ve yaklaşık % 70-80 oranında 5 yıllık sağkalım ile en iyi sonuçları vermektedir (Mazzaferro vd. 1996).

Rezeksiyon ve transplantasyon arasındaki karar hastanın karaciğer fonksiyonları, portal hipertansiyonun varlığı ve kapsamı, performans durumu ve hepatik ve portal venlerin boyutu, sayısı ve tutulumu gibi tümör özelliklerinin dikkate alınmasını gerektirmektedir. Sirozu ve sınırlı tümör yükü olan hastalar için (Milan Kriterleri-tek tümör ≤ 5 cm veya vasküler invazyon olmaksızın 2-3 tümör ≤ 3 cm) karaciğer nakli önerilmektedir. Bu tedavinin 5 yıllık ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla % 70 ve % 50 olup nüks oranları 5 yıl için %10-15 arasında değişkenlik göstermektedir (Tabrizian vd. 2019). Ancak, organ temini sıkıntısı ve uzun bekleme süreleri tümör ilerlemesine ve buna bağlı olarak hastaların bekleme listesinden çıkarılmasına neden olabilmektedir.

HSK tedavi yaklaşımları arasında yer alan görüntü kılavuzluğunda ablasyon küçük ve erken evre tümörler için potansiyel bir tedavi olarak kabul edilmektedir (EASL 2018). 2 cm çapından küçük, tek ve çok erken tümörler için ilk seçenek tedavi olarak değerlendirilen ablasyon; kimyasal, termal veya elektriksel yöntemlerle tümöre doğrudan zarar vermek için kullanılan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde mikrodalga ablasyon ile birlikte sıklıkla kullanılan radyofrekans ablasyon; kriyoablasyon ve lazer interstisyel termoterapi gibi diğer ablatif tekniklere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Geri dönüşümsüz elektroporasyon ise önemli bir termal bileşen olmaksızın tümör hücrelerine elektriksel hasar vererek tümör yıkımına neden olmaktadır (Llovet vd. 2020). Ancak; hasta profili, tümör özellikleri ve teknik uzmanlık dahil olmak üzere çok sayıda faktörün tedavi dağılımını etkilediği belirtilmektedir. Güvenlik profili ve iyi etkinliğe sahip olmasına rağmen, rezeksiyon sonrası ve radyofrekans ablasyon sonrası 5 yıllık tümör nüks oranının sırasıyla % 50 ve % 80 oranında olduğu rapor edilmektedir. Bu sonuç, HSK tedavisi için alternatif terapötik seçeneklere duyulan ihtiyaca dikkat çekmektedir (Guglielmi vd. 2008).

Harici ışın radyasyon tedavisi, karaciğer içindeki çeşitli boyut ve evrelerdeki HSK tümörlerinde radyolojik yanıtların yanı sıra ekstrahepatik metastazların palyasyonunu da sağlamak adına yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bujold vd. 2013). Kemoterapi ise esas olarak rezeksiyon, transplantasyon veya ablasyon gibi küratif tedavilere uygun olmayan hastalara uygulanan ve bu nedenle esas olarak palyatif bir önlem olarak hizmet eden diğer bir tedavi yaklaşımıdır (Serper vd. 2022). HSK tedavisinde çok sayıda

kemoterapötik ilaç kullanılmakta olup bunların her biri özgül mekanizmalar sergilemektedir (Şekil 2.13).



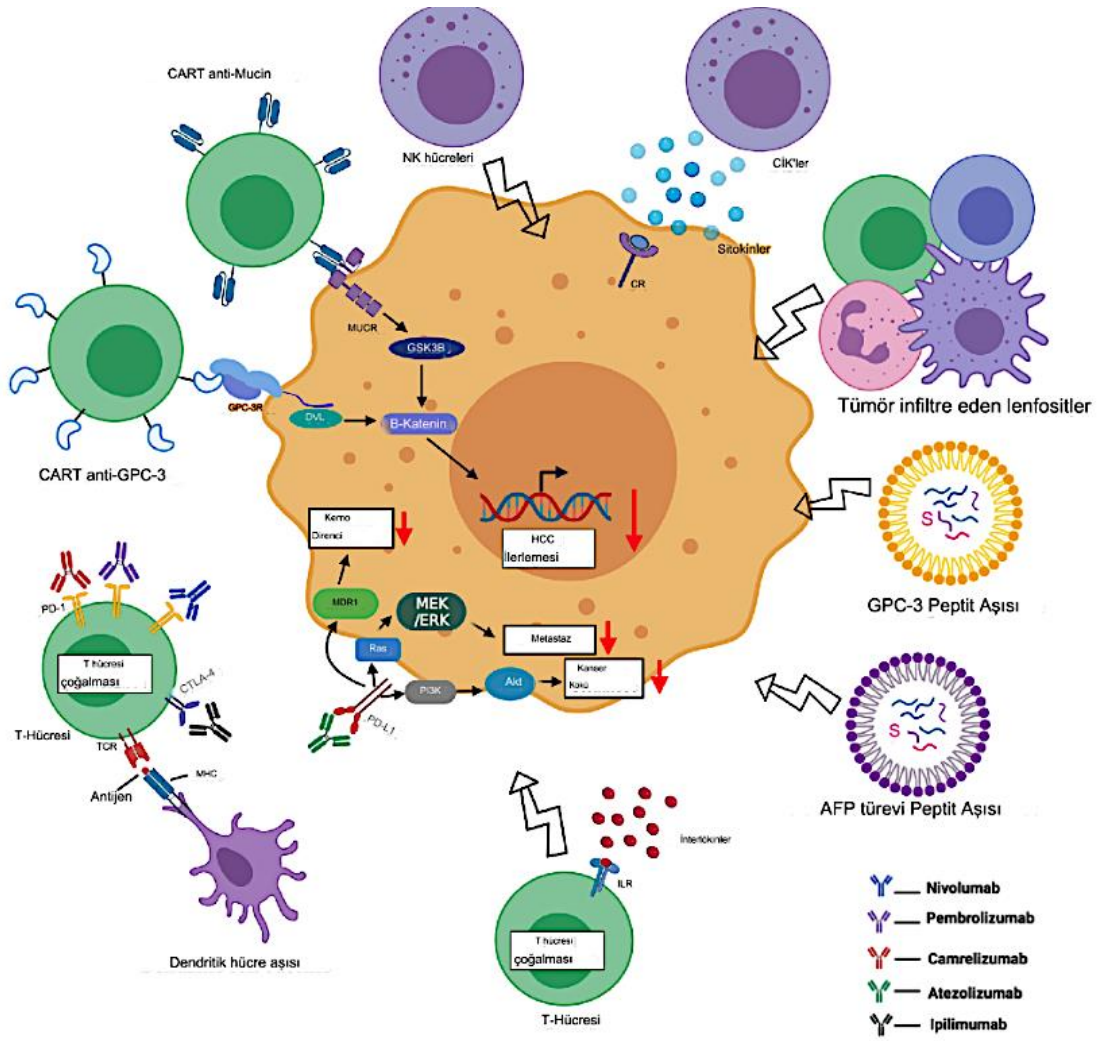
Şekil 2.13 HSK tedavisinde tümör hücrelerini öldürmek için kullanılan farklı kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları (Suresh vd. 2023)

HSK'nın genellikle kemoterapiye dirençli bir malignite olarak kabul edilmesinden dolayı, seçilen ilaçlar ve dozları genellikle yanıt oranını sınırlayan siroz ile bağlantılı olmaktadır. Ağızdan uygulanan bir multikinaz inhibitörü olan sorafenib, ilerlemiş HSK'da sağkalımı uzattığı gösterilen ilk sistemik ilaç olarak rapor edilmektedir. Raf, MEK ve ERK sinyal yollarının moleküler bileşenlerini inhibe ederek tümör büyümesinin azalmasına neden olmakta ve VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ve PDGFR- β 'yı baskılayarak neovaskülarizasyonu durdurmaktadır. Ancak hastalarda meydana gelen ilaç direnci

sorafenibin terapötik etkisini sınırlamaktadır. Sorafenib'in sınırlı terapötik etkisi ve HSK'nın karmaşık moleküler patofizyolojisi, sorafenibin diğer moleküler hedefleme ilaçlarıyla kombinasyonlarını gerekli kılmaktadır (Llovet vd. 2008, Cheng vd. 2009, Huang vd. 2020). Bu amaçla Sorafenib, antianjiyojenik ilaçlar, MEK/ERK yolağı inhibitörleri, EGF/EGFR yolağı inhibitörleri ve HGF/c-Met yolağı inhibitörleri ile birleştirilerek formüle edilmektedir. Brivanib'in hem VEGFR hem de FGFR tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden sentetik bir ilaç olarak birinci basamak tedavi amacıyla sorafenib ile birleştirildiği, ancak genel sağkalım için amaçlanan kriterleri karşılamadığı belirtilmektedir (Meyer vd. 2017). Dünyada en sık reçete edilen ilaçlardan biri olan lenvatinib, VEGFR 1-3, FGFR 1,2-4, PDGFR α ve KIT dahil olmak üzere tirozin kinazın çoklu reseptörlerinin oral olarak aktif bir inhibitörü olarak tanımlanmaktadır. Lenvatinib'in 2018 yılının ağustos ayında eksize edilemeyen HSK hastaları için ilk seçenek tedavi olarak onaylandığı belirtilmektedir. Sorafenib'in bir türevi olan donafenib ise VEGFR, PDGFR ve Raf kinazlar dahil olmak üzere çoklu reseptör kinazların yeni bir multikinaz inhibitörü olup tümöral büyümenin ve anjiyogenezin baskılanmasına yol açmakta olan diğer bir ilaç olarak rapor edilmektedir. Genel olarak, iyi bir güvenlik ve tolere edilebilirlik profili ile sorafenib'e kıyasla ilerlemiş HSK hastaları için etkili bir birinci basamak tedavi olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir. Ancak, etkinliğini ve güvenilirliğini doğru bir şekilde değerlendirmek için daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Marzin vd. 2018, Maucort-Boulch vd. 2018). Regorafenib, sorafenib'den türetilmiş çok hedefli bir ilaç olup moleküler yapısı, sorafenib'in merkezi fenil halkasına eklenen bir flor atomu ile değiştirilmiş yeni bir ilaç formülü olarak açıklanmaktadır. Bu büyük değişiklik Regorafenib'i inhibitör profili ve farmakolojik aktivitesi açısından daha güçlü hale getirmektedir. Regorafenib, anjiyogenez ve tümör büyümesinde rol oynayan çeşitli tirozin kinazları etkileyerek ilerleme gösteren HSK hastalarında sağkalım faydası sağladığı gösterilen tek sistemik tedavi olarak rapor edilmektedir (de la Fouchardiere 2018, Feraro ve Zakcberg 2014, Mei vd. 2018).

Sorafenib ile tedavi edilen ve henüz karaciğer nakli yapılmamış vakalarda ikinci basamak ilaç tedavisi için tercih edilen seçenek immünoterapidir. Antikanser tedavinin bir diğer yaklaşımı, hastanın bağışıklık sistemini değiştirerek kanser hücreleri üzerindeki spesifik antijenleri tanımasını sağlamaktır (Liu vd. 2022). Buna karşılık, diğer teknikler

immüno-supresif sinyalizasyon kontrol noktalarını kısıtlayarak immün aktiviteyi güçlendirmeyi amaçlamakta ve enfeksiyon veya inflamasyonu önleyen kanser aşılıarını ve immün sistemi güçlendiren spesifik olmayan kanser immünoterapötik ilaçlarını içermektedir. Günümüzde, immünoterapötik stratejilerin ileri evre HSK tedavisinde güvenli ve etkili olarak kullanılabilceği rapor edilmektedir. Bu strateji, temel olarak immün kontrol noktası inhibitörleri, adoptif hücre transferi, aşılılar ve immün sistem modülatörleri olmak üzere dört farklı yaklaşım içermektedir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 HSK tedavisinde farklı immünoterapi yöntemleri (Suresh vd. 2023)

Nivolumab, programlanmış hücre ölümü proteini-1 immünolojik kontrol noktasını baskılayarak T-hücreleri yanıtlarını artıran ve antitümöral bağışıklığı geliştiren bir IgG4 monoklonal antikoru olarak belirtilmektedir. FDA, CheckMate-040 faz I/II dozaj

eskalasyonu ve genişletme kohortunun sonuçlarına göre sorafenib ile tedavi edilen HSK hastaları için Eylül 2017’de nivolumab ilacına hızlandırılmış onay verildiğini bildirmektedir. Ancak bu onay, ilaç seçimi olarak nivolumab ile sorafenibi doğrudan karşılaştıran faz III çalışmasının olumsuz bulguları nedeniyle 2021 yılında kaldırılmıştır (Mahn vd. 2020, Stein vd. 2018). İmmünoterapideki ilerlemeler HSK tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olmasına rağmen, immünoterapi direnci halen önemli bir engel teşkil etmektedir.

Kemoterapötik uygulamaların yanı sıra son yıllarda, HSK önlenmesi ve tedavisi amacıyla bitkisel uygulamaların potansiyel rolüne olan ilgi de giderek artmaktadır. Karaciğer hastalıklarının tedavisi için bitkisel içerik kullanımı uzun bir geçmişe sahip olsa da son çalışmalar, anti-tümör etkilere sahip olabilecek ve HSK’nın ilerlemesini yavaşlatmada etkili olabilecek birkaç bitkisel bileşiğe dikkat çekmektedir (Abdel-Hamid vd. 2018). Örneğin, zerdeçal bitkisinden elde edilen kurkumin bileşiğinin anti-inflamatuvar ve anti-tümör özelliklere sahip olduğu ve HSK hücrelerinde apoptozu (hücre ölümü) indüklemeye yardımcı olabileceği rapor edilmektedir. Bu amaçla kullanılan bir başka bitki olan deve dikenini, karaciğeri korumaya ve HSK’nın büyümesini yavaşlatmaya yardımcı olabilecek silimarin adı verilen bir bileşik içermektedir. Hindistan’da yayılım gösteren çeşitli Ayurveda bitkilerinin HSK yönetimindeki potansiyel etkilerinin incelendiği bir çalışmada “taş kıran” olarak da bilinen *Phyllanthus niruri* bitkisinin anti-tümör özelliklere sahip olduğu ve HSK hücrelerinin büyümesini engellemeye yardımcı olabileceği gösterilmektedir. Ayurveda tıbbında yaygın olarak kullanılan bir başka bitki olan *Andrographis paniculata*’nın HSK hücrelerinde apoptozu indükleyen bileşikler içerdiği ve inflamasyonu azaltmaya yardımcı olduğu da belirtilmektedir. Bunlara ilaveten, ginseng bitkisinin anti-tümör etkilerinin olduğu ve HSK hastalarında karaciğer fonksiyonunu iyileştirmeye yardımcı olabileceği rapor edilmektedir (Mohamed vd. 2022, Liang vd. 2021). *Astragalus membranaceus* bitkisinin HSK yönetimindeki potansiyelini inceleyen başka bir çalışmada ise, bitkinin HSK hücre inflamasyonunu azaltmaya ve apoptozu teşvik etmeye yardımcı olabileceği belirtilmektedir. Tüm bu bitkisel yaklaşımlar HSK yönetiminde umut vaat etse de güvenlik ve etkinliklerini belirlemek amacıyla daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğuna dikkat çekilmektedir. Ayrıca, diğer ilaçlarla etkileşime girebilme veya potansiyel yan etkiler sergileme riskleri nedeniyle

hastaların herhangi bir bitkisel yaklaşım kullanmadan önce bir sağlık uzmanına danışmaları önerilmektedir (Liang vd. 2021).

HSK tedavisi; gelişmiş tedavi yöntemlerine rağmen yüksek bir nüks oranına sahip olması ve tedaviye karşı hızla direnç geliştirmesi nedeniyle oldukça zor ilerleyen bir süreç olarak değerlendirilmekte ve kombine tedavi gerektirmektedir. Bu kapsamda yer alan kombine yaklaşımlar ise hem hastalığın patofizyolojik karmaşıklığı hem de karaciğer fonksiyonlarına olan olumsuz yan etkileri nedeniyle HSK'nın tıbbi tedavisini zorlaştırmaktadır. Yeterli tümör tedavisi sağlanırken hastanın genel sağlığını korumak zorlayıcı olmaktadır. Bu durum ise hasta üzerindeki maddi ve manevi tedavi yükünü artırmaktadır. Son yıllarda, mevcut tedavi yöntemlerini iyileştirmek ve bu engellerin üstesinden gelebilmek için yeni tedavi seçenekleri sunmak üzere kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Özellikle kemoterapi ve immünoterapi uygulamaları HSK ilerlemesini yavaşlatmada umut vaat etse de günümüzde kanseri tedavi etmek veya önlemek için daha güvenilir ve doğal biyolojik yaklaşımlara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3 Mikrobiyotanın Karaciğer Kanserindeki Rolü

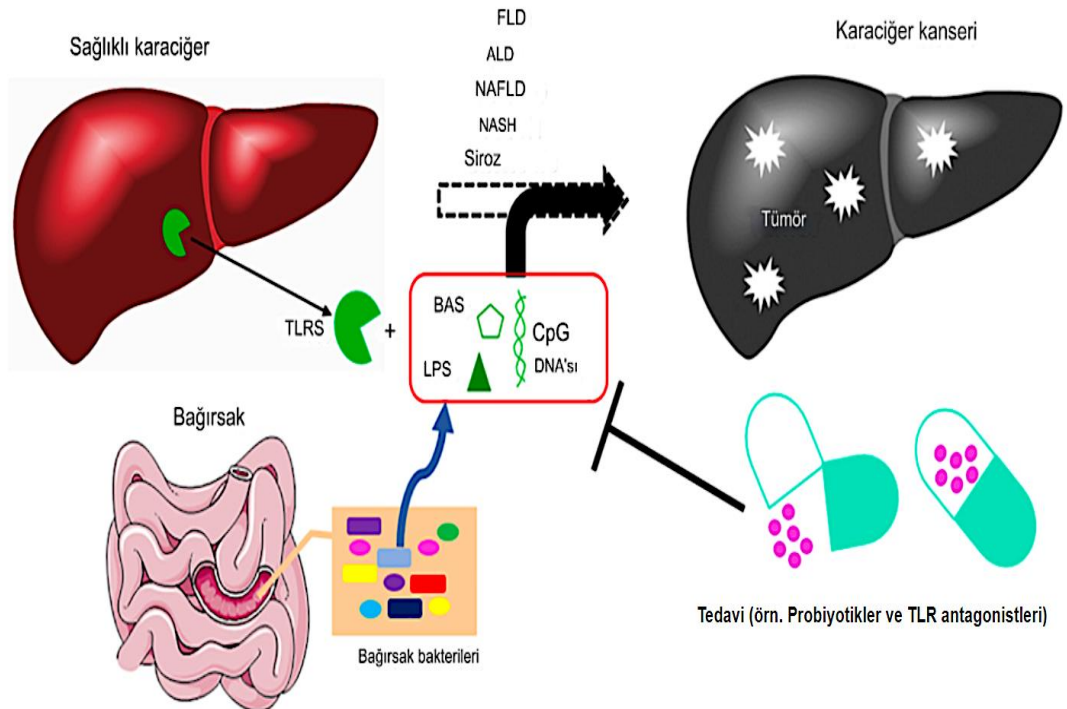
Karaciğerin portal ven aracılığıyla bağırsak mikrobiyal bileşenlerine ve metabolitlerine doğrudan maruz kalması karaciğer fonksiyonları ile bağırsak mikrobiyotası arasında kuvvetli bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir (Tripathi vd. 2018). Giderek artan çalışmalar, bağırsak-karaciğer ekseninin karaciğer iltihabı, fibroz, siroz ve HSK gibi çeşitli karaciğer hastalıklarının ilerlemesini etkileyebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte bazı mikrobiyota üyelerinin HSK için biyobelirteç olarak kullanılabilenine ya da bu mikrobiyota üyeleri ya da bunlar tarafından üretilen çeşitli metabolitlerin tedavi ajanı olarak tasarlanabileceğine yönelik çalışmalar ise hız kazanmaktadır (Ohtani vd. 2019, Wang vd. 2019).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, bağırsak mikrobiyota üyelerinin HSK için invaziv olmayan bir biyobelirteç olarak ekten teşhis için kullanılabilenine işaret etmektedir. Özellikle bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin fibroz/sirozdan kansere kadar çeşitli karaciğer hastalıklarının ilerlemesiyle ilişkilendirilmesi, mikrobiyota üyelerini

ya da onlar tarafından üretilen metabolitleri çeşitli hastalıkların biyobelirteçleri olarak da hizmet edebilecek önemli bir aday haline getirmektedir (Meng vd. 2018, Ponziani vd. 2019). Örneğin, sirozlu hastalarda fekal Enterobacteriaceae ve *Streptococcus* spp. miktarının arttığı, *Akkermansia* spp. miktarının ise azaldığı rapor edilmektedir. HSK hastalarında ise Bacteroides ve Ruminococcaceae gruplarının arttığı, *Bifidobacterium* spp. türlerinin ise azaldığı belirtilmektedir. Daha ileri bir çalışma, *Akkermansia* spp. ve *Bifidobacterium* spp. türlerinin inflamatuvar bir biyobelirteç olan kalprotektin ile ters orantılı olarak değiştiğini göstermektedir (Ponziani vd. 2019). Bu sonuçlar, HSK gelişimi sırasında bir grup bakterinin hastalığın farklı aşamaları ve tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Güncel çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının safra asitleri ile immün kontrol noktası inhibitörleri ve Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi farklı faktörleri modüle ederek HSK üzerinde etki sergileyebileceğini göstermektedir. Glikoz metabolizması ile vitamin ve lipid emiliminde önemli rol oynayan safra asitleri aşırı miktarda üretildiğinde tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin hasarına neden olmakta ve karsinogenezi teşvik edebilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası tarafından modüle edilen safra asidi biyotransformasyonu ise anti-tümör bağışıklığı iyileştirmektedir (Wang vd. 2013). Kanser hücreleri anti-tümör tedaviyi inhibe etmek için immün kontrol nokta yolaklarını aktive ettiğinden kanser gelişimi immün baskılama ile yakından ilişkili kabul edilmektedir. Klinik çalışmalar, *Bacteroides caccae* ve *Akkermansia muciniphila* gibi bakterilerin immün kontrol noktası tedavilerinin etkinliğini artırdığını göstermektedir (Rauty vd. 2018). Bu nedenle, immün kontrol noktası inhibitörlerinin anti-tümör etkisini artırmak amacıyla bağırsak mikrobiyal bileşenlerinin modüle edilmesi HSK tedavisi için potansiyel bir strateji olarak dikkat çekmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini etkinleştirmek için patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler) ve tümör kaynaklı antijenler gibi endojen hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP'ler) tanıyabilen TLR'lerin modülasyonu da kanser tedavisi için önemli kabul edilmektedir (Nie vd. 2018, Kawai vd. 2010). Bağırsak mikrobiyotasının dengesinin bozulması olarak tanımlanan disbiyoz TLR sinyal yolaklarını aktive eden deoksikolik asit, lipopolisakkarit (LPS) ve metillenmemiş CpG DNA gibi bağırsak kaynaklı mikrobiyal ürünlerinin sızmasına ve hepatik immün cevabın artmasına neden olmaktadır (Konturek vd. 2018). Mevcut süreç

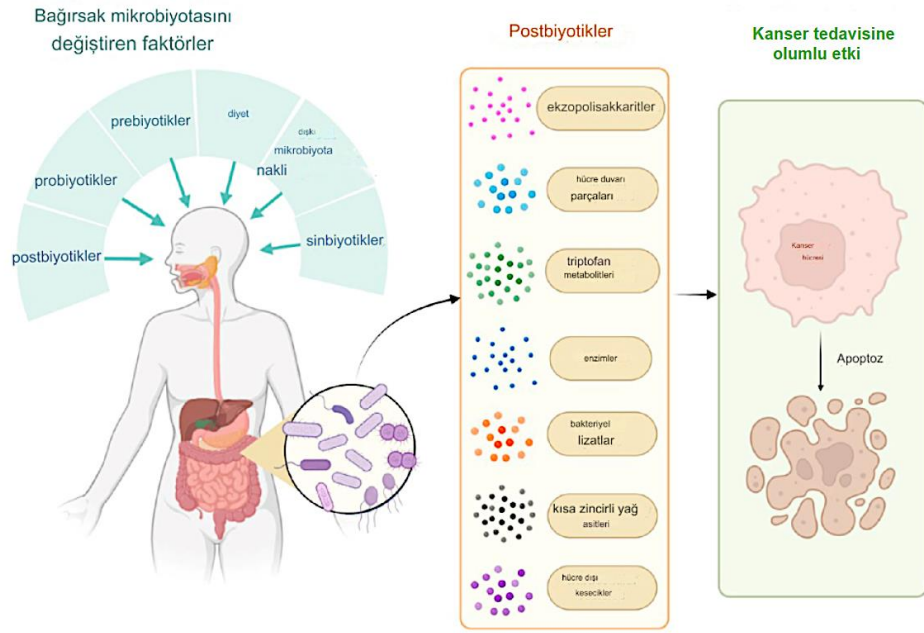
ise kanser sürecinin ilerlemesini teşvik etmektedir. Bu nedenle, probiyotikler, prebiyotikler ve antibiyotikler uygulayarak veya bakteriyel ürünlerin antagonistlerini kullanarak bağırsak mikrobiyotasını modüle etmek bağırsak bariyerini iyileştirebilmekte ve karaciğer iltihabı-fibroz-siroz-kanser ekseninin ilerlemesini azaltabilmektedir (Şekil 2.15). Prebiyotikler, kolondaki sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen ve böylece konakçının sağlığını iyileştiren sindirilemeyen gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Sinbiyotikler ise bağırsak mikrobiyomu üzerinde faydalı etkileri olan prebiyotik ve probiyotik kombinasyonlar olarak açıklanmaktadır. Son yıllarda sinyal yollarını üzerinde potansiyel uyarıcı etkileri nedeniyle dikkat çeken postbiyotikler ise mikroorganizmalar tarafından salınan veya mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri yoluyla üretilen ve konakçı üzerinde doğrudan yararlı etkiler gösteren maddeler olarak tanımlanmaktadır (Zolkiewicz vd. 2020).



Şekil 2.15 Karaciğer kanseri gelişimi ve bağırsak mikrobiyotası aracılı tedavi yaklaşımları (Zhang vd. 2020)

2.4 Postbiyotikler

Bilim camiası, cansız mikroorganizmaları ve/veya bunların sağlık açısından fayda sağlayan bileşenlerini ifade etmek için canlı olmayan probiyotikler, paraprobiyotikler, hayalet-biyotikler, ısıyla etkisiz hale getirilmiş probiyotikler veya en yaygın olarak postbiyotikler gibi terimleri önermektedir. Postbiyotik kelimesi, Yunanca'da sonra anlamına gelen "post" ve yaşam anlamına gelen "bios" kelimelerinden türetilmiş bir terim olup "biyotik" terimler ailesinin (probiyotikler, prebiyotikler, sinbiyotikler) en yeni üyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Uluslararası Bilimsel Probiyotik ve Prebiyotik Birliği (ISAPP) postbiyotik terimini, "konakçı sağlığı üzerinde faydalı etkiler sağlayan cansız mikroorganizmalar ve/veya bileşenlerinden oluşan bir preparat" olarak tanımlamaktadır (Vinderola vd. 2022). Genel olarak postbiyotik ifadesi, genel olarak mikroorganizmalar tarafından fermentasyon sürecinde üretilen veya salgılanan maddelere atıfta bulunan şemsiye bir terim olarak nitelendirilmektedir. Metabiyotikler, biyojenikler veya basitçe metabolitler olarak konakçıya fizyolojik faydalar sağlayan postbiyotikler arasında bakteriyosinler, enzimler, vitaminler, amino asitler, nörotransmitterler, kısa zincirli yağ asitleri, nitrik oksit, organik asitler, ekzopolisakkaritler, hücre lizatları, teikoik ve lipoteikoik asitler ve peptidoglikan türevli muropeptidler gibi maddeler yer almaktadır (Nataraj vd. 2020). Son yıllarda cansız mikroorganizmaların ve/veya bileşenlerinin bir konağa yeterli miktarda uygulandığında sağlık açısından fayda sağlayabileceğine dair kanıtlar giderek artmaktadır. Ayrıca, konağa uygulanan mikroorganizma türevli metabolitlerin bazı yararlı fizyolojik etkileri de yönlendirebileceği kavramını destekleyen araştırmalar hız kazanmaktadır. Güncel bilimsel çalışmalar, postbiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını önemli ölçüde etkileyip güçlendirebileceği ve kanser hastaları için yeni bir terapötik seçenek olabileceğini rapor etmektedir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Bağırsak mikrobiyotasını modüle eden biyotikler, postbiyotik olarak bilinen metabolitler ve etkileri (Kudra vd. 2023)

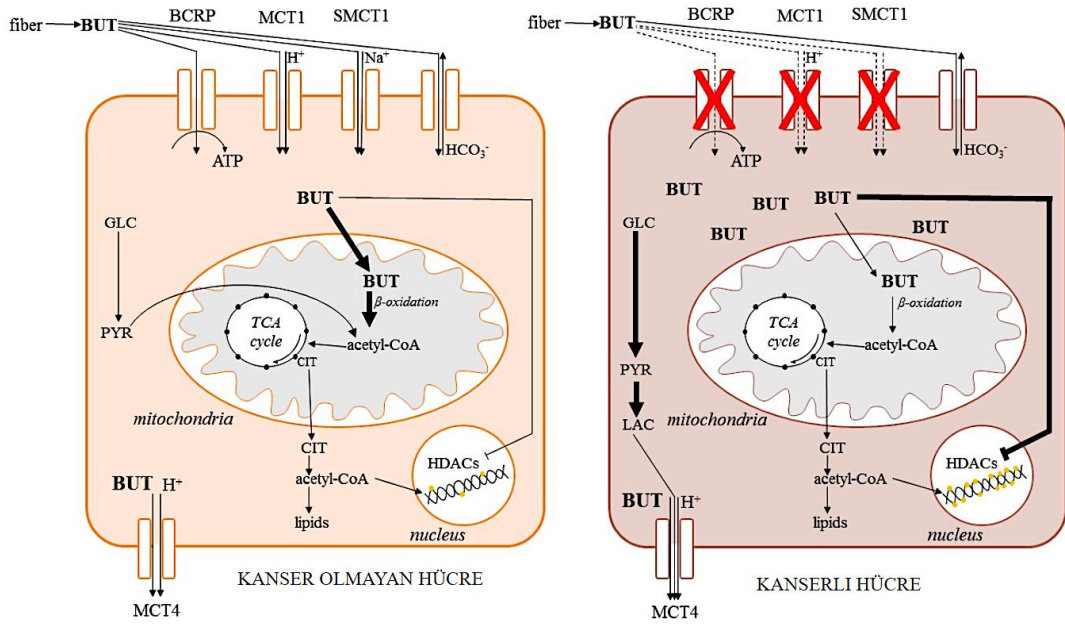
2.5 Postbiyotiklerin Anti-kanser Etkileri

Özellikle komşu hürelere zarar vermeden kanser hücrelerini seçici apoptoza yönlendirdikleri için bilim insanlarının büyük ilgisini çeken postbiyotikler, bu etkilerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla sergileyebilmektedir. Bu mekanizmaların başında sinyal yollarını düzenleme özellikleri yer almaktadır (Kim vd. 2021). *Lactobacillus rhamnosus* suşuna ait postbiyotiklerin insan rahim ağzı kanseri HeLa hücrelerinde *Bad*, *Bax*, *kaspaz-3*, *kaspaz-8* ve *kaspaz-9* gen ifadesini artırarak, *Bcl-2* gen ifadesini ise azaltarak etki gösterdikleri rapor edilmektedir (Riaz Rajoka vd. 2019). *L. paracasei* IMPC2.1 ve *L. rhamnosus* GG'den elde edilen postbiyotiklerin proapoptotik yolun aktivasyonu yoluyla insan kolon kanseri DLD-1 hücresi ve insan mide kanseri HGC-27 hücre hatlarının büyümesini ve ilerlemesini engellediği belirtilmektedir (Orlando vd. 2012). *L. casei*'den elde edilen ferrikromun ise PARP ve bölünmüş kaspaz 3 ifadesinde bir artış yoluyla tümör hücreleri üzerinde apoptotik etki sergilediği gösterilmektedir (Konishi vd. 2016). *Brevibacillus* spp. kaynaklı bir bakteriyosinin MCF-7, HEK293T, HT1080, HeLa ve H1299 kanser hücre hatlarının apoptozunu indüklediği belirtilmektedir (Baindara vd. 2017). Gerçekleştirilen bu çalışmalar, postbiyotiklerin mitokondriyal

transmembran potansiyeli kaybı, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, kaspaz-3 tedavisi, onkoprotein Bcl-2 düzenlemesi ve nükleer kromatin yoğunlaşması dahil olmak üzere apoptozu indüklediklerini göstermektedir. Bu etkilerine ilaveten, postbiyotiklerin hücre döngüsünü modüle ederek hücre çoğalmasını baskıladıkları da bilinmektedir (Kim vd. 2021). *P. freudenreichii*'den elde edilen kısa zincirli yağ asitleri insan kolorektal kanser hücrelerinin G1 fazında birikmesine, S ve G2/M fazların da ise azalmalarına neden olmaktadır (Casanova vd. 2018). Probiyotik türevli p8 proteininin hücre döngüsünün G2 fazında büyümenin durmasıyla sonuçlanan p53-p21-Siklin B1/Cdk1 sinyal yolunun inhibisyonuna aracılık ettiği rapor edilmektedir. *Lactobacillus* spp.'nin hücre içermeyen pentasakkaritinin apoptozu teşvik ederek insan kolorektal kanseri HT-29 hücresinde S-faz hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ettiği rapor edilmektedir (Elfahri vd. 2016). Hosseini ve arkadaşları (2020), *Lactococcus lactis* kaynaklı nisin insan kolorektal SW480 kanser hücrelerinde *in vitro* siklin D1 ifadesini azalttığını ve anti-proliferatif etki sergilediğini belirtmektedir. Özellikle kolon kanserinde; asetat, bütirat ve propiyonat gibi artan kısa zincirli yağ asitleri seviyelerinin tedavi ile bağlantılı olabileceğine dair ön veriler bulunmaktadır (Kostantinov vd. 2020). Mikrobiyal kaynaklı bütiratın ise onkojenik sinyal yollarını düzenlediği, proinflamatuvar genlerin regülasyonu ve histon deasetilaz inhibisyonu yoluyla tümör büyümesini baskıladığı belirtilmektedir (Chriett vd. 2019).

Mikrobiyal metabolik ürünler olarak tanımlanan postbiyotiklerin kanser hücrelerinin metabolik homeostazını bozarak metabolik ve oksidatif strese neden olmaları da bir diğer etki mekanizmaları olarak rapor edilmektedir. Postbiyotikler içerisinde sıklıkla bulunan laktatın, NADH/NAD⁺ oranını artırarak ve laktat oksidazın bir substratı olarak hizmet ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondriyal üretimini uyardığı rapor edilmektedir (Fong vd. 2020). Kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, bütiratın da ROS seviyelerini uyardığı belirtilmektedir (Zelenka vd. 2018). H₂S, proteinlerin sülfhidril kısımlarını kovalent olarak modifiye etmekte ve mitokondriyal sitokrom c oksidazı inhibe ederek ROS salınımını artırmaktadır (Cao vd. 2019). β -glukanların ise kanser hücrelerinde oksidatif strese neden olduğu belirtilmektedir (Fay vd. 2009). Sonuç olarak postbiyotikler, metabolik ve oksidatif stresi abartarak programlanmış hücre ölümüne neden olmakta ve yerleşik tümörlerin ilerlemesini baskılamaktadır.

Asetat, propiyonat ve bütirat postbiyotikler içerisinde önemli bir yere sahip olan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) olarak tanımlanmaktadır. Bu moleküller, başta *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Eubacterium rectale* olmak üzere bağırsak mikroorganizmaları tarafından diyet lifi fermantasyonu sonucu oluşan son ürünler olarak tanımlanmaktadır (Kim vd. 2008). Son yıllarda çeşitli çalışmalara konu olan bütirat farklılaşmayı desteklemekte, proliferasyonu baskılamakta ve oksidatif stresi tetikleyerek hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açmaktadır (Gonçalves ve Martel 2013). Kanser olmayan bir hücrede bütirat, Krebs döngüsünde asetil-CoA kullanımının eşlik ettiği β -oksidasyon ile metabolize edilmektedir. Kanser hücrelerinde ana enerji kaynağı olan glikozun glikoliz yoluyla laktata metabolize edilmesi, Warburg etkisi olarak adlandırılan ve β -oksidasyonun baskılanmasıyla ilişkili olan önemli bir olgu olarak değerlendirilmektedir. Böylece, bütirat molekülleri kanser hücresi sitoplazmasında birikmekte, çekirdeğe göç etmekte ve burada histon deasetilazların inhibitörleri olarak hareket etmektedir. Bu koşullar altında, histonlar asetillenmekte ve DNA'nın yapısı açılarak transkripsiyon faktörleri için erişilebilir hale gelmekte ve farklı proteinlerin ifadesine yol açarak oksidatif stresi ve nihayetinde apoptozu tetiklemektedir (Donohoe vd. 2011, Donohoe vd. 2012) (Şekil 2.17). Bütiratın endoplazmik retikulum stresinin şiddetlenmesi yoluyla kolorektal karsinom hücre hatlarında otofajinin indükleyicisi olduğu da belirtilmektedir. Mekanistik olarak bütirat, karaciğer kinaz B1/AMP-aktif protein kinaz (LKB1/AMPK) sinyal yolunu uyarmaktadır (Liu vd. 2012, Luo vd. 2019).

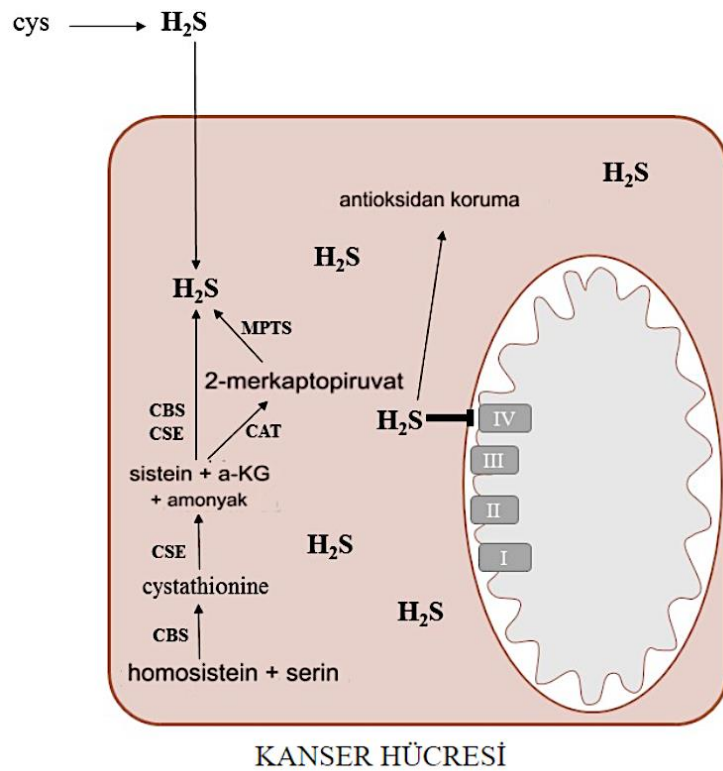


Şekil 2.17 Kanser olmayan hücrede (a) ve kanser hücresinde (b) bütiratın üretimi ve metabolizması (BCRP-meme kanseri direnç proteini, BUT-bütirat, CIT-sitrat, HDACs-histon deasetilazlar, MCT-monokarboksilat taşıyıcı, GLC-glukoz, LAC-laktat, PYR-piruvat, TCA-trikarboksilik asit döngüsü) (Vrzackova vd. 2021)

Laktik asit postbiyotikler içerisinde yer alan en yüksek organik asitlerden biridir. Laktik asit anyonu olan laktat GPR81 adı verilen G proteinine bağlı yüzey reseptörü için doğal, yüksek afiniteli bir substrat olarak tanımlanmaktadır (Brooks 2020). GPR81'in tümör dokusunda fazla ifadesi hastalığın ilerlemesinde ve bağışıklıktan kaçışta önemli role sahiptir. Laktata maruz kalındığında mitokondride ROS üretimi artmaktadır (Hashimoto vd. 2007). Yerleşik tümörlerde endojen olarak üretilen laktat, anjiyogenez, bağışıklıktan kaçınma, metastaz ve tedaviye direncin itici gücü olarak tanımlanmaktadır. Öte yandan, postbiyotik takviyesi ile sağlanan laktat, epitelyal bütünlüğün korunması ve doku iltihabının aşağı regülasyonu yoluyla karsinogenezin bir inhibitörü olarak da hizmet edebilmektedir (Hoque vd. 2014, Lee vd. 2018).

Bağırsakta üretilen ve aday bir postbiyotik olarak son yıllarda dikkat çeken H₂S, konsantrasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak sitoprotektif ya da sitotoksik etkiye sahip olabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda, çeşitli reaktif oksijen türlerini nötralize eden ve N-asetilsistein, süperoksit dismutaz veya glutatyon gibi bilinen antioksidanlara ek

olarak etki eden bir antioksidan görevi görmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda H_2S , sitokrom c oksidaza bağlanarak elektron taşıma zincirini bloke etmekte ve ATP sentezini azaltmaktadır. H_2S esas olarak potasyum kanallarının aktivasyonu, sinyal kinazların uyarılması ve fosfodiesterazların inhibisyonu dahil olmak üzere mitokondriyal biyoenerjetiklerin düzenlenmesi yoluyla da kanser hücreleri üzerinde etki sergileyebilmektedir (Şekil 2.18). Ayrıca farklı proapoptotik genlerin ifadesini indükleyebilmekte ve apoptozu tetikleyebilmektedir (Szabo 2007).



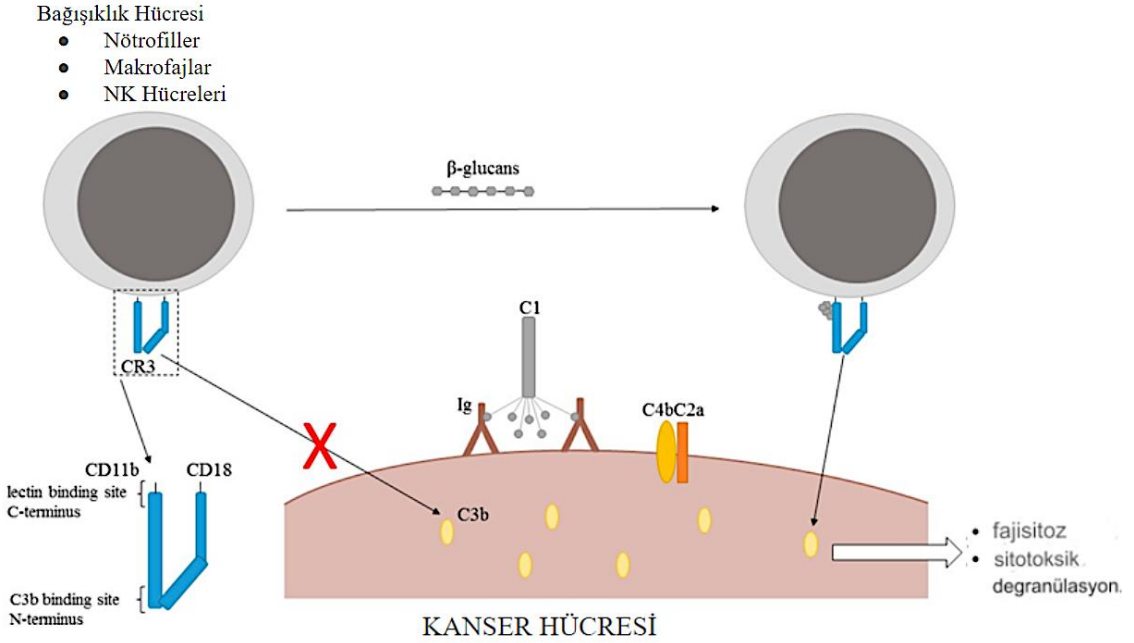
Şekil 2.18 Kanser hücresinde H_2S sentezi ve metabolizması (α -KG-alfa-ketoglutarat, H_2S - hidrojen sülfür, CAT-sistein: 2-oksoglutarat aminotransferaz, CBS-sistatyonin beta-sentaz, CSE-sistatyonin gama-liyaz, cys-sistein, MPTS-3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz) (Vrzackova vd. 2021)

Yüksek konsantrasyonlarda H_2S , proliferasyonda azalmaya ve hücre döngüsünün G /G01 blokajının indüklenmesine neden olarak genel bir antimitotik etkiye yol açmaktadır. Ayrıca otofajiyi indükleyebilmekte ve kanser hücrelerinin istilasını ve göçünü engelleyebilmektedir. Bu nedenle etkileri KZYA'lara benzemektedir (Florin vd. 1991, Wu vd. 2012).

Bakteriler tarafından hücre duvarının dışına salınabilen biyopolimerler olarak tanımlanan ekzopolisakkaritler (EPS) ise çeşitli kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiler sağlamakta, apoptozun teşvik edilmesine ilişkin çoklu mekanizmalar yoluyla tümörlerin gelişimini modüle edebilmektedir (Zólkiewicz vd. 2020). *Lactobacillus acidophilus*'tan izole edilen EPS'lerin metaloproteinaz doku inhibitörü-3, hipoksi ile indüklenebilir faktör-2 α ve hemeoksijenaz-1 ifadesini artırarak, vasküler endotelial büyüme faktörü ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α ifadesini azaltarak ve antioksidatif bir etki sergileyerek tümör anjiyogenezinde önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir (Deepak vd. 2016).

β -glukanlar, (1 6)- β bağı ile bağlanmış rastgele dağılmış β -D-glukopiranosil birimlerine sahip olan ve (1 3)- β -D-glukopiranosil zincirinden oluşan bir grup glukoz polimeri olarak tanımlanmaktadır (Cheung vd. 2002). Diyet lifinin bir bileşeni olarak β -glukanlar; yulaf, arpa, tıbbi mantarlar, deniz yosunu, bazı bakteriler ve ayrıca hücre duvarlarının önemli bir bileşenini temsil ettikleri mayalar dahil olmak üzere çeşitli bitki ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunmaktadır. β -glukanlar 60 yıl önce kanserle savaşmak için bağışıklık sistemini uyaran biyolojik yanıt değiştiriciler olarak tanımlanmıştır (Yan vd. 1999). Antikor tedavisi, kanser hücresi yüzeyinde spesifik hedef antijenlerin yüksek ifadesi olan hastalar için etkili olmaktadır. C3b ve iC3b, tümörün gerilemesine önemli ölçüde katkıda bulunan kompleman bağımlı sitotoksik sistemin bileşenleridir. Doğal veya intra venöz olarak enjekte edilen anti-tümör antikorlarının varlığında kompleman aktivasyonu ile bağlantılı olan bu iki bileşen, nötrofiller, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler üzerindeki kompleman reseptörü CR3'e bağlanarak fagositozu ve sitotoksik degranülasyonu tetikleyebilmektedir. Ne yazık ki bu reaksiyon, normalde antibakteriyel yanıt sırasında mevcut olan mikrobiyal biyopolimerler ile spesifik olmayan bir ko-stimülasyonun yokluğu nedeniyle engellenmektedir. Bununla birlikte, β -glukanların varlığı, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin tümörisidal aktivitesini tetikleyen ortak uyarıcı olarak hizmet edebilmektedir. CR3 reseptörü, N-terminalindeki CD11b I-domain bağlanma bölgesi aracılığıyla iC3'ü ve C-terminalinde bulunan bir lektin bölgesi aracılığıyla spesifik mikrobiyal polisakkaritleri tanıyabilmektedir. β -glukanlar lektin bölgesine bağlanmakta, ve

bağışıklık hücrelerini iC3b kaplı tümör hücrelerini öldürmeye hazırlamaktadırlar (Şekil 2.19) (Hong vd. 2003, Liu vd. 2006, Liu vd. 2009).



Şekil 2.19 β-glukanların etki mekanizması (CD-kompleman alanı, CR-kompleman reseptörü, Ig-immünoglobulin) (Vrzackova vd. 2021)

ostbiyotik içeriği üretici türe göre çeşitlilik göstermektedir. İçeriğe bağlı olarak da postbiyotik etki mekanizması değişkenlik sergileyebilmektedir Ancak literatür çalışmalarından elde edilen ön veriler, postbiyotiklerin kanser hücreleri üzerinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceğine ve tedaviye yönelik doğal yaklaşımlar olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.

2.6 *Spalax* sp. ve Kanser

Literatürde yer alan çalışmalar farklı kaynaklardan izole edilen birçok laktik asit bakterisine ait postbiyotiklerin kanser hücreleri üzerinde apoptozu, proliferasyonu veya otofajiyi uyararak anti-kanser etkiler sergilediklerini göstermektedir. Bu bilgileri temel alan araştırma grubumuz kanser-mikrobiyota ilişkili çalışmalarına devam etmekte olup bu alanda ilk kez farklı bir kaynaktan izole edilen yeni bir bakterinin hepatosellüler kanser hücreleri üzerindeki seçici anti-kanser etkisini ortaya koymuştur. Bu çalışma kapsamında,

bugüne kadar gerçekleştirilen analizler neticesinde tek bir spontan tümör gelişimi vakası kaydedilmemiş olan, deneysel olarak indüklenen karsinogeneze direnci ile önemli bir model organizma olarak kabul edilen ve eşsiz biyolojik karakteristikleri ile dikkat çeken *Nannospalax xanthodon* türü kör köstebek faresi bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* bakterisine ait postbiyotiklerin kullanılması hedeflenmektedir.

Spalacidae ailesi içerisinde yer alan *Spalax* sp. cinsine ait kör fare türleri olağanüstü uzun yaşam sürelerine (>20 yıl) rağmen yaşa bağlı açık fenotipik değişiklikler göstermemesi ve spontan tümörler geliştirmemesi nedeniyle yaşlanma ve ayrıca kanser araştırmaları için mükemmel bir model olarak kabul edilmektedir. Doğu Akdeniz bölgelerindeki kapalı toprakaltı galerilerinin yalnız bir sakini olarak tanımlanan ve yaşlanmayı takiben oldukça az dejeneratif değişiklik gösteren *Spalax* sp. türleri, toprakaltı yaşam tarzları neticesinde çoğu avcıdan ve iklimsel dalgalanmalardan korunsa da, karanlık, hipoksi (en az ~% 7 O₂), hiperkapni (~% 6 CO₂ kadar yüksek), kazma sırasında karşılaşılan enerjik zorlukları ve patojenlere karşı artan maruziyet gibi yaşamsal zorluklarla da karşı karşıya kalmaktadır (Altwasser vd. 2019, Shams vd. 2005). Kör fareler, 40 milyon yıllık evrim süreci boyunca toprak altında açmış olduğu galerilerdeki hipoksik koşullarda yaşayarak olağanüstü bir kanser direnci geliştirmiştir. Son 50 yıl boyunca yapılan çalışmalar, oldukça uzun ömrüne (>20 yıl) rağmen, hayvanların hiçbirinde spontan tümör gelişmediği gibi, yaşlanmaya bağlı herhangi bir fenotipik değişiklik de göstermediğini rapor etmektedir (Altwasser vd. 2019). Ancak bu direncin altında yatan mekanizmalar henüz açıklığa kavuşmuş değildir.

Coğrafi koşulların *Spalax* sp. metabolik aktiviteleri üzerinde etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Solak ve arkadaşları (2023) tarafından, coğrafi koşullar gözetilerek gerçekleştirilen bir çalışmada Türk kör köstebek sıçanı (TBMR) *Nannospalax xanthodon*'un yüksek ve düşük rakımlı popülasyonları kullanılarak rakımın doğuştan gelen bağışıklık savunması üzerindeki etkileri test edilmiştir. Çalışma kapsamında; 2017 ve 2018 yıllarında Orta Toros Dağları'nda deniz seviyesinden 1010m, 1115m ve 2900m yükseklikteki iki düşük ve bir yüksek rakımlı lokaliteden 32 yaban hayvanı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, yüksek rakımlı hayvanlarda doğuştan gelen bağışıklık elemanlarının daha fazla olduğunu göstermiştir. Kör farelerin genel olarak hormonal dengesinin araştırıldığı bir çalışmada ise (Avivi vd. 2014) farklı bölgelere ait farklı türler

kullanılmıştır. Aşırı hipoksik koşullar altında kapalı yeraltı yuvalarında yaşayan İsrail kör yeraltı köstebek faresi *Spalax ehrenbergi* üst türü, serin-nemli koşullarda yaşayan *Spalax galili* (2n = 52 kromozom), yarı nemli koşullarda yaşayan *S. golani* (2n = 54 kromozom), sıcak ve nemli kuzey bölgelerinde yaşayan *S. carmeli*, (2n = 58 kromozom), sıcak ve kuru orta bölgelerinde yaşayan *S. judaei* (2n = 60 kromozom) bazal metabolizma hızlarının (BMR) kuzeyden güneye doğru türler arası dramatik düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Genetik olarak koşullandırılmış türler arası BMR farkının dolaşımdaki tiroid hormonu aracılığıyla ifade edilmesi olasılığı incelendiğinde, serum serbest tiroksin (FT4) ve total 3, 5, 3'-triiodo-L-tironinde (T3) seviyelerinin kuzeyden güneye beklenmedik bir artış ($p < 0,02$) sergilediği belirtilmiştir. Tiroid hormonu seviyeleri ile BMR/hematokrit/hemoglobin arasında tespit edilen ters ilişkinin ise hipoksik bir ortamda oksijen tüketiminde hormon kaynaklı artışa karşı koruma sağlayan hücresel dirençlilikle de tutarlılık sağladığına işaret etmişlerdir.

Spalax sp. türleri ile ilgili gerçekleştirilen genomik ve transkriptomik analizlerden elde edilen veriler ise, bu hayvanların doğal ortamlarında birden fazla strese maruz kalmalarına rağmen sahip oldukları genom onarım ve hücre ölüm mekanizmaları ile p53, mTOR, FOXO3 gibi tümör baskılayıcı genlerinin sergilemiş olduğu benzersiz özelliklerin yaşlanmayı ve kanser gelişimini önlemede etkili rollere sahip olabileceğine işaret etmektedir. Genom onarım sistemlerini araştırmayı hedefleyen transkriptomik analizler; DNA onarımı, DNA metabolizması, DNA rekombinasyonu, DNA hasarı ile ilişkili hücresel yanıt ve hücre döngüsü ile ilişkili bazı genlerin fazlaca ifade edildiklerini rapor etmektedir (Malik vd. 2016).

Spalax sp.'nin yeraltı yuvalarında yaşamaya adapte olduğu ve şiddetli hipoksiye akut maruz kalmayı tolere ettiği bildirilmektedir. Hipoksiye adaptasyonun, yaşlanmanın gecikmeli başlangıcı ve tümör oluşumuna karşı direnç ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. *Spalax* sp.'nin uyarlanmış genlerini ve gen düzenleyici ağlarını araştırmak ve anlamak, insanlarda uzun süreli sağlıklı bir fenotipi sürdürmek için yeni stratejiler belirleyebilmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, % 6 O₂ veya normoksiye maruz bırakılan *Spalax* sp.'nin ve sıçanın karaciğer, böbrek ve dalak hücrelerinin RNA-dizi verileri karşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. *Spalax* sp. ve sıçandan elde edilen

veri farklılıklarının genellikle hücre ölümü, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma, DNA onarımı, enerji metabolizması, bağışıklık tepkisi ve anjiyogenez gibi biyolojik süreçler olduğu bu süreçlerin *Spalax* sp.'nin oksijen yoksunluğu altındaki yaşama adaptasyonunda önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir. Tüm organlarda, genom stabilitesinin korunması ve DNA onarımı ile ilişkili genlerin mRNA ifadesi *Spalax* sp.'de sıçana kıyasla artmıştır. Bununla birlikte; aerobik enerji metabolizması ve proinflatuvar süreçlerle ilişkili genlerin daha düşük gen ekspresyonu bu sonuçlara eşlik etmiştir. Bu transkriptomik değişikliklerin *Spalax* sp.'nin olağanüstü yaşam süresinden ve kanser direncinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Poetzch vd. 2023).

Spalax sp., genom stabilitesini koruyarak ve inflamatuvar yanıtı bastırarak da kansere karşı bir strateji geliştirebilmektedir. *Spalax* sp. fibroblast hücreleri yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipi (SASP) edinmeden yaşlanmaya uğramaktadır. Yaşlanma parakrin faktörler aracılığıyla yayılabildiğinden, yaşlanan *Spalax* sp. fibroblastlarından elde edilen şartlandırılmış ortamın (CM) yaşlanma fenotipini inflamatuvar bir yanıtı neden olmadan kanser hücrelerine aktarabileceğini ve böylece malign davranışı baskılayabileceği varsayılmaktadır. Bu konuyu ele almak amacıyla, *Spalax* sp. yaşlanan fibroblast hücrelerine ait CM'lerin MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri çoğalma, göç ve salgı profili açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, CM'nin kanser hücrelerinde yaşlanmayla ilişkili beta-galaktosidaz (SA- β -Gal) aktivitesinin artmasına bağlı olarak yaşlanmanın tetiklediğini, bunun da büyümenin baskılanması ve yaşlanmayla ilişkili p53/p21 genlerinin aşırı ifadesi aracılığıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, CM'nin kanser hücrelerindeki ana inflamatuvar faktörlerin salgılanmasını baskıladığı ve göçlerini azalttığı da rapor edilmektedir. Buna karşılık, insan CM'sinin MDA-MB-231 hücrelerinde SA- β -Gal aktivitesinde hafif bir artışa neden olmasına rağmen, proliferasyonu, inflamatuvar yanıtı ve kanser hücresi göçünü azaltmadığı belirtilmektedir (Odeh vd. 2023).

Spalax sp.'nin uzun yaşam süreleri ve kansere karşı dirençleriyle ilişkili mekanizmalara ait hipotezlerden bir diğeri ise yaşam tarzları nedeniyle diğer canlılardan farklı bir melatonin sentez mekanizmasına sahip olmalarıdır. Türkiye'de yaşayan *Nannospalax* sp. türlerinde melatonin sentezinde rol alan *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Per1* ve *Per2* Clock

genlerindeki gen varyantları araştırılmış ve *Nannospalax galili*, *Mus musculus*, *Heterocephalus glaber*, *Rattus norvegicus* ve *Homo sapiens* gibi diğer organizmalarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, *Per1* geninde 11, *Per2* geninde 7, *Cry1* geninde 2 ve *Cry2* geninde 9 olmak üzere toplam 29 varyasyon tespit edilmiştir. *Bmal1* geninde ise herhangi bir varyasyona rastlanmadığı belirlenmiştir. Bu varyasyonlardan bazıları, ışık kaynaklı UV hasarı için DNA onarım süreçlerinin gerçekleştiği bölgelerde bulunmuştur. Diğer varyasyonlar PAS domaini ve 5'-UTR bölgelerinde tespit edilmiş, geri kalan varyasyonlar ise proteinlerin nondomain bölgelerinde bulunmuştur (Civelek vd. 2023).

Oksijenin sık sık düştüğü habitatlarda bu türlerin varlığını 40 milyon yılı aşkın bir süredir evrimleşen olağanüstü bir hipoksi toleransı sergileyerek korudukları bilinmektedir. Öte yandan, toprakaltı yaşam tarzları *Spalax* spp. türlerinin beslenmesini şekillendirmekte ve esas olarak Tulipa, Ornithogalum, Muscari ve Fritillaria gibi bitkilerin kökleri, yumruları ve tohumlarının tüketimine yönlendirmektedir. Bu eşsiz diyet ise anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar ve anti-oksidatif aktiviteye sahip olan polifenoller, lif ve ilgili bileşikler açısından oldukça zengin kabul edilmektedir. Bu bağlamda, mevcut beslenme şeklinin ve yaşam koşullarının mikrobiyotayı şekillendirmesi ve özgün mikrobiyota ve mikrobiyota ilişkili metabolitlerin de *Spalax* sp. metabolizması ve geliştirdiği direnç mekanizmaları üzerinde etkinliğinin olması da kaçınılmaz bir gerçektir. Ancak bu konuda gerçekleştirilen çalışmalar oldukça sınırlıdır. *Spalax* sp. cinsi kör farelerin yakın akrabası olan uzun ömürlü çıplak kör farelerin (*Heterocephalus glaber*) mikrobiyota analizlerini içeren sınırlı sayıda çalışmaları, bu türün de kendine özgü ekolojisinin bir sonucu olan benzersiz bir bağırsak mikrobiyota bileşimine sahip olduğunu, mikrobiyota kompozisyonunun insan ve farelere kıyasla çok çeşitli olduğunu ancak kültüre edilebilir mikroorganizma sayısının az olduğunu, mikrobiyotanın metabolik ve immun homeostaz ile ilişkili türler açısından baskın olduğunu ve oksidatif metabolizma eğilimli olduğunu, yüksek kısa zinciri yağ asitleri ile mono ve disakkarit üretim kapasitesinin ise yüksek olduğunu belirtmektedir (Debebe vd. 2017, Cong vd. 2018). Elde edilen güncel veriler *Spalax* sp. mikrobiyota bileşiminin ve içeriğinin özellikle memeli sağlığı ve uzun yaşam konusunda önemli bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, kanser araştırmaları için mükemmel bir model olarak kabul edilen *Spalax* spp. türlerine ait mikrobiyota-kanser

ilişkinine odaklanan ve *Spalax* sp. mikrobiyota üyeleri ile mikrobiyota tarafından üretilen metabolitleri prognostik, tanısal biyo-belirteç ve/veya terapötik ajan olarak tasarlamaya yönelik veriler içeren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, daha önce ekibimiz tarafından *Nannospalax xanthodon* bağırsak mikrobiyotasından izole edilen ve *Ligilactobacillus animalis* olarak tanımlanan bakteriye ait postbiyotiklerin (Zatari, 2022) HSK üzerindeki anti-kanser etkisini küresel OMİKS yaklaşımları kullanarak belirlemektir.

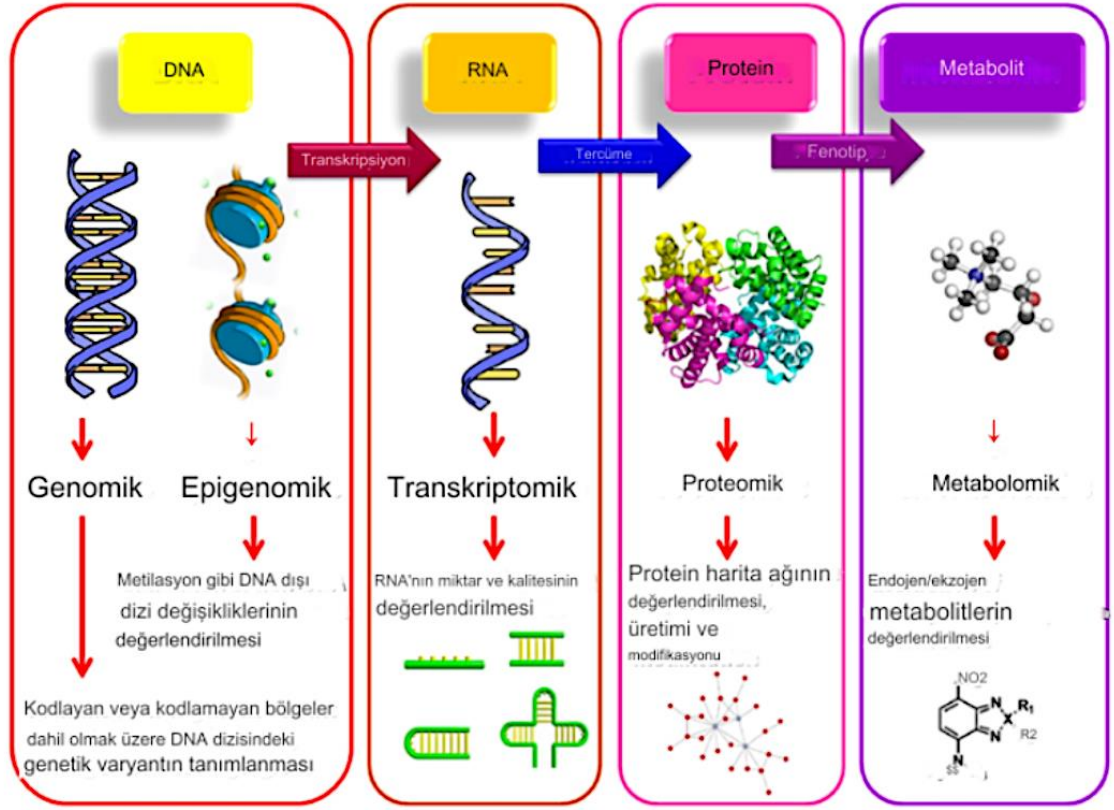
2.7 OMİKS Teknolojileri

OMİKS teknolojileri, belirli bir biyolojik numunedeki çeşitli biyolojik molekülleri büyük ölçekte kapsamlı bir şekilde incelemek, tanımlamak ve ölçmek için tasarlanmış yüksek verimli yöntemleri temsil eden bir yaklaşım olarak nitelendirilmektedir. Tıp, tarım ve çevre bilimi gibi alanlarda uygulamaları bulunan bu teknolojilerin; biyolojik sistemlerin karmaşıklığını anlamak, altta yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak, biyolojik belirteçleri keşfetmek ve biyolojik süreçler hakkındaki anlayışımızı geliştirmek için kritik öneme sahip oldukları belirtilmektedir.

OMİKS teknolojileri, yeni nesil dizileme (NGS) ve kütle spektrometrisi (MS) tabanlı teknikleri içermektedir. NGS tabanlı teknikler genomik, epigenomik ve transkriptomik için sıklıkla kullanılırken MS tabanlı teknikler proteomik ve metabolomik yaklaşımlar için kullanılmaktadır (Chakraborty vd. 2018). Genomik, bir organizmanın genleri ve kodlamayan dizileri de dahil olmak üzere tüm DNA setinin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. DNA dizileme, Sanger dizileme ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi teknikler, bir organizmanın tüm DNA dizisinin belirlenmesini sağlamaktadır. Karşılaştırmalı genomik, evrimsel ilişkileri anlamak ve korunmuş veya benzersiz genetik unsurları tanımlamak için farklı türlerin genomlarını karşılaştırmayı içermektedir (Whalen vd. 2022). Transkriptomik; mesajcı RNA (mRNA), kodlamayan RNA ve küçük RNA dahil olmak üzere RNA moleküllerinin incelenmesine odaklanmaktadır (Liu vd. 2022). Proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translasyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatan bir

yaklaşım olarak bilinmektedir (György 2004). MS, İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2D-PAGE) ve MALDI-TOF gibi teknolojileri içermektedir (Chakraborty vd. 2018). Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanmasını, miktarının belirlenmesini ve tanımlanmasını içermektedir. Çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmiş kromatografi, moleküler spektroskopi ve MS gibi analitik tekniklere ihtiyaç duyan metabolomik çalışmalarında (Goodacre 2005) hedef bileşik analizleri ve metabolik profilleri için; Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi çeşitli kromatografik ayırma ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Metabolomiksin bir alt kümesi olan lipidomik ise, biyolojik sistemlerdeki hücrelipidlerin içeriğinin ve metabolik yollarının geniş ölçekli araştırılması olarak tanımlanmaktadır. MS, NMR spektroskopisi, floresan spektroskopisi, çift polarizasyon interferometrisi ve hesaplama yöntemleri gibi teknolojileri içermektedir (Wenk 2005, Watson 2006, Han ve Gross 2003) (Şekil 2.20). Genomik ve proteomik “ne olabileceğinin” metabolomik ise “gerçekte ne olduğunun” bilgisini vermektedir. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü (metabolomik) hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntem olarak rapor edilmektedir (Ozcan vd. 2021).

Temel OMİKS yaklaşımlarına ilaveten epigenomik; gen ifadesini etkileyebilen DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik modifikasyonları incelemektedir. Bisülfid sekanslama, DNA metilasyon modellerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. ÇİP-Sek yaklaşımı, histon modifikasyonlarını ve protein-DNA etkileşimlerini analiz etmek için kromatin immünopresipitasyon ve ardından sekanslama ile kullanılmaktadır. Glikomik; biyolojik sistemlerdeki karbonhidratların (glikanlar) yapısını ve işlevini incelemektedir. Karmaşık glikan yapılarını analiz etmek için MS ve NMR gibi teknikleri içermektedir (Chernykh vd. 2021).



Şekil 2.20 Temel OMİKS teknolojilerinin genel sınıflandırılması (Dalal vd. 2020)

2.7.1 OMİKS teknolojilerinin kanser alanında kullanımı

Kanser araştırmaları; kanser gelişimi, ilerlemesi ve tedavisinin altında yatan moleküler mekanizmaların kapsamlı bir şekilde açıklanmasına imkan sağlayan çeşitli “OMİKS” teknolojiler tarafından önemli ölçüde öne çıkarılmaktadır. Omiks yaklaşımlar, kanserle ilişkili genetik, epigenetik, transkriptomik, proteomik ve metabolik değişikliklerin anlaşılmasında etkili olmaktadır. Kanser fenotipleri, genomdan proteoma doğru farklı bilgi akışı seviyelerinde değişiklikler sergilemektedir. Farklı bilgi işleme seviyelerindeki moleküler değişiklikler, kanser fenotipinin ortaya çıkması için temel oluşturmaktadır. Kansere özgü özelliklerin elde edilmesini sağlayan temel mekanizmaları anlamak için, genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi farklı omiks teknolojilerle temsil edilen çoklu bilgi entegrasyonlarını sağlamak ve kanser hücrelerini detaylıca analiz etmek önem kazanmaktadır. Çoklu omiks veri entegrasyonu, omiks verilerinin biyolojik olarak anlamlı bir şekilde entegre edilmesi olarak tanımlanmaktadır.

Kansere özgü çevrimiçi omiks-veri kaynakları (kanser genom atlası gibi) ise yeni biyolojik anlayışların üretilmesini kolaylaştırabilmektedir. Son yıllarda özellikle onkoloji alanında yeni biyolojik görüşler oluşturmak, kanserle ilişkili hücresel süreçler ve mekanizmalar hakkındaki anlayışımızı genişletmek, kanserin entegre moleküler imzalarına dayalı biyobelirteçlerini ve moleküler kalıplarını belirlemek, kanser olgularını sınıflandırmak, antikanser ajanların sistem-biyoloji yaklaşımlarını değerlendirmek ve kanser araştırmaları alanının ilerlemesine katkıda bulunmak amacıyla omiks veri kümelerini keşfetmek ve entegre etmek önem kazanmaktadır (Das vd. 2020).

OMİKS teknolojileri-kanser ilişkisi kapsamında önemli bir yere sahip olan genomik bilim, kansere neden olan genetik mutasyonları ve değişiklikleri ortaya çıkarmaya imkan veren bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir. Tüm genom dizilimi ve tüm ekzom dizilimi kanser hücrelerindeki somatik mutasyonları tanımlanmaktadır. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki spesifik mutasyonlar ve değişiklikler tespit edilerek farklı kanser türleri için hedefe yönelik tedaviler için mutasyon profilleri oluşturulmaktadır. Karşılaştırmalı genomik, farklı kanser türleri arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesine yardımcı olmakta ve ilaç geliştirmeye imkan verebilmektedir (Birkbak ve McGrahanan 2020).

Transkriptomiks, kanser hücrelerindeki gen ifadesini inceleyerek gen düzenlemesindeki değişiklikleri ortaya çıkaran bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır. Özellikle kanser teşhisi, prognozu ve tedaviye yanıt için biyobelirteçlerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Alternatif ekleme modellerinin anlaşılması, tümör heterojenliği ve terapötik hedefler hakkında bilgi sağlayabilmektedir. Proteomiks, kanser hücrelerinde protein ifadesini, post-translasyonel modifikasyonları ve protein-protein etkileşimlerini incelemektedir. Erken teşhis, prognoz ve tedavi takibi için kullanılacak protein biyobelirteçlerini tanımlamaktadır. İlaç hedefi belirleyerek kanser tedavisi için spesifik protein hedeflerinin bulunmasında etkili bir rolü bulunmaktadır (Macklin vd. 2020).

Metabolomiks, kanser hücrelerindeki metabolik değişiklikleri incelemekte ve enerji metabolizması ile tümör mikro çevresindeki değişikliklerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte, kanser teşhisi ve izlenmesi için metabolit biyobelirteçlerini

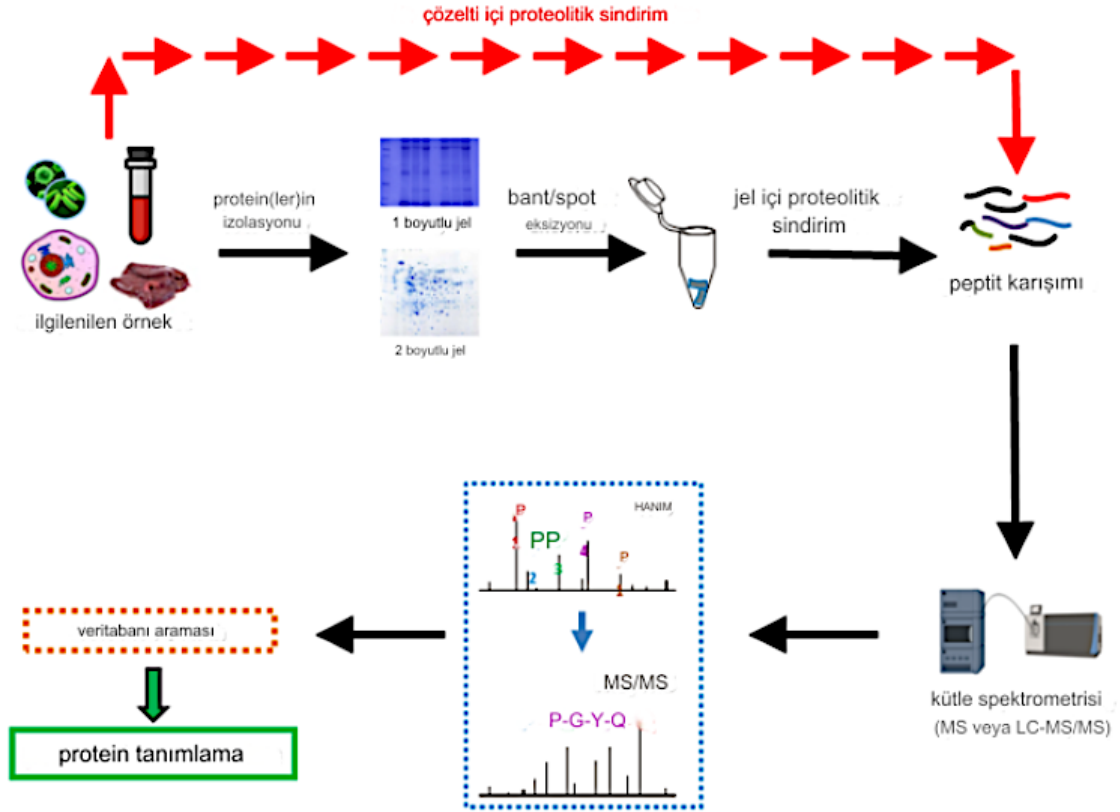
tanımlayabilmektedir. Farmakometabolomik ise, kanser hücrelerinin ilaçları nasıl metabolize ettiğini anlamak ve tedavi rejimlerini optimize etmek için geliştirilmektedir (Stine vd. 2021, Faubert vd. 2020). Epigenomik, kanser hücrelerinde DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'ya odaklanmaktadır. Epigenetik susturma, kanser hücrelerinde epigenetik modifikasyonlarla susturulan genlerin tanımlanmasına ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yol açabilmektedir (Oleksiewicz ve Machnik 2022). Epigenomik değişiklikler ise tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak hizmet edebilmektedir.

Farklı OMİKS teknolojilerinden elde edilen verilerin birleştirilmesi, araştırmacıların kanser biyolojisi hakkında bütünsel bir anlayış kazanmalarını sağlamaktadır. Entegrasyon, kanser ilerlemesini yönlendiren temel moleküler yolların ve ağların belirlenmesine yardımcı olabilmektedir. Kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları, kanser tedavilerini bireysel hastalara göre uyarlamak için birden fazla omiks verisinin birleştirilmesini içermektedir. Sistem biyolojisi teknikleri, kanser ağlarının karmaşık modellerini oluşturmak için omiks verileri kullanarak tümör büyümesinin dinamikleri ve tedavilere yanıt hakkında öngörüler sağlamaktadır. OMİKS teknolojileri sadece kanser anlayışımızı derinleştirmekle kalmayarak, hedefe yönelik tedavilerin ve hassas tıp yaklaşımlarının geliştirilmesine ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine de yol açmaktadır. Kanser araştırmalarında, teşhisinde, prognozunda ve daha etkili ve kişiselleştirilmiş kanser tedavilerinin geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Pan vd. 2020).

2.7.2 Proteomiks ve kanser alanında kullanımı

Proteomiks; biyolojik bir örnekte veya belirli bir hücre, doku veya organizmada bulunan tüm proteinlerin kapsamlı ve sistematik analizini içermektedir (Sobsey vd. 2020). Kütle spektrometrisi, iki boyutlu jel elektroforezi ve protein mikro dizileri gibi çeşitli teknoloji ve tekniklerin kullanımına dayanmaktadır. Herhangi bir örnekten protein izolasyonu gerçekleştirilmekte, elektroforez yaklaşımlarıyla ayrımı ve tespiti yapılmakta, 2D PAGE ardından ilgilenilen protein noktası ayrıştırılmakta, proteolitik kesimlere tabi tutulmakta ve MS ya da LC-MS/MS kullanılarak peptid fraksiyonlarına ayrılmakta, veri bankaları

ile karşılaştırılarak protein tanımlaması yapılmaktadır (Şekil 2.21). Shotgun proteomiks yaklaşımında ise peptidi gaz fazına yüklemek ve aktarmak için nanoelektrosprey ve MALDI olmak üzere iki ana iyonizasyon yöntemi kullanılmaktadır (Wilm vd. 1996).



Şekil 2.21 Proteomiks iş akış şeması (Dupre vd. 2020)

Proteomiks teknolojileri hastalıklara, ilaç tedavilerine ve çevresel değişikliklere verdikleri yanıtlar da dahil olmak üzere biyolojik sistemler hakkındaki anlayışımızı ilerletmek için önem arz etmektedir. Bir organizmanın tüm gen setinin (genom) incelenmesine odaklanan genomik ve RNA molekülleri aracılığıyla gen ifadesini araştıran transkriptomik ile yakından ilişkilidir (Cobbaert vd. 2021). Bu alanlardan elde edilen verilerin proteomiks ile entegre edilmesi, genlerin proteinlere nasıl çevrildiğine ve bu proteinlerin canlı organizmalarda nasıl işlev gördüğüne dair kapsamlı bir bakış açısı sağlamaktadır. Proteomiks teknolojileri kullanılarak belli bir koşulda hücre tarafından üretilen proteinler tanımlanabilmekte, translasyon sonrası modifikasyonlar aydınlatılabilmekte, protein-protein etkileşimleri çözümlenebilmekte, proteinlerin

işlevleri ve çeşitli hücreyel süreçlerdeki rolleri belirlenebilmekte, ilaç geliştirme için kritik olabilecek üç boyutlu yapıları tanımlanabilmekte, belirli durumlar için biyobelirteç olarak tanımlanabilmekte ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları geliştirilebilmektedir.

Proteomiks çok çeşitli bir alan olup her biri proteinlerin incelenmesinin belirli yönlerine odaklanan birkaç farklı proteomiks alt disiplini bulunmaktadır. Fonksiyonel proteomiks; bir hücre veya organizma içindeki proteinlerin işlevlerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Protein aktivitelerini, çeşitli hücreyel süreçlerdeki rollerini ve diğer moleküllerle nasıl etkileşime girdiklerini karakterize etmeyi içermektedir. Yapısal proteomiks; proteinlerin çoklu ve üç boyutlu yapılarının belirlenmesi ile ilgilenmektedir. Proteinlerin şeklini ve konformasyonunu anlamaya yardımcı olmaktadır. Bu da protein işlevlerini anlamak için oldukça önemli olup ilaç keşfinde hayati öneme sahip olabilmektedir. İfade proteomiks; farklı hücre tiplerinde, dokularda veya çeşitli koşullar altında protein ifade seviyelerinin ölçülmesine odaklanmaktadır. Hastalık, ilaç tedavileri veya gelişim aşamaları gibi faktörlere yanıt olarak prteinlerin nasıl değıştiklerini anlamak için protein ifadelerini karşılaştırmayı içermektedir. Translasyon sonrası modifikasyon proteomiksi; proteinlerin fosforilasyon, asetilasyon, glikozilasyon gibi çeşitli modifikasyonlarını tanımlamaya ve ölçmeye yöneliktir. Protein işlevinin belirlenmesinde ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Etkileşim proteomiksi; protein-protein etkileşimlerinin incelenmesine odaklanmakta ve belirli bir proteinle veya bir protein kompleksi içinde etkileşime giren proteinleri tanımlamayı ve karakterize etmeyi amaçlamaktadır. Klinik proteomiks; klinik ve tıbbi uygulamalarda kullanılan yaklaşım olarak tanımlanmaktadır. Kanser gibi hastalıklar için biyobelirteçlerin tanımlanmasını ve teşhis testlerinin ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının geliştirilmesini içermektedir. Kantitatif proteomiks; farklı örneklerdeki proteinlerin göreceli veya mutlak miktarlarının ölçülmesiyle ilgilenmektedir. Farklı koşullar, hastalık durumları veya tedaviler altında protein ifadesindeki değışikliklerin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Shotgun proteomiks; proteinlerin peptidlere ayrıştırılmasını ve daha sonra kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmesini içermektedir. Bu yaklaşım genellikle yüksek verimli protein tanımlama ve miktar belirleme için kullanılmaktadır. Tüm bu farklı proteomiks yaklaşımları, temel araştırmalardan klinik uygulamalara kadar çeşitli uygulamalarda proteinlerin karmaşık biyolojisi hakkında kapsamlı bir anlayış kazanmak için genellikle birlikte

kullanılmaktadır. Hangi türün kullanılacağına seçimi, belirli araştırma hedeflerine ve araştırma sorularına bağlı olarak değişmektedir (Dupree vd. 2020).

Proteomiks teknolojileri, kanser araştırmalarında çok önemli bir rol oynamakta ve hastalığa ilişkin anlayışımızı ilerletmede etkili olmaktadır. Genellikle “kanser proteomiği” olarak adlandırılan proteomiks yaklaşımlar; kanserli hücrede protein odaklı moleküler değişikliklerin kapsamlı incelenmesini, biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin ortaya çıkarılmasını içermektedir (Macklinn vd. 2020). Çeşitli tümör bölgeleri arasında protein ifadesindeki farklılıkları ortaya çıkarmak tümör alt tipleri hakkında bilgi edinilmesini ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlayabilmektedir (Eckert vd. 2019, Doll vd. 2019). Kanser hücrelerindeki protein-protein etkileşimlerinin analiz edilmesi ise hastalık sürecindeki kritik oyuncuların belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Bu bilgi, kanser biyolojisinin karmaşıklığını anlamak için hayati önem taşımaktadır. Fosfoproteomiks, fosforillenmiş proteinlerin incelenmesine odaklanmaktadır. Protein kinazlar ve kanserle ilişkili sinyal yolakları hakkında bilgi sağlamaktadır (Cords vd. 2023). Proteomik, kanser metastazı ve invazyonunda rol oynayan proteinlerin karakterize edilmesine yardımcı olarak bu süreçlerin engellenmesi için potansiyel hedefler sağlamaktadır. Ayrıca, araştırmacılar kanserde ilaç direncine yol açaan moleküler mekanizmaları araştırmak için proteomiks yaklaşımlarını kullanmaktadır. Bu bilgi, kanser direncinin üstesinden gelmek için stratejilerin geliştirilmesine rehberlik edebilmektedir. Kanser proteomiği, kanda veya diğer vücut sıvılarında dolaşan proteinlerin ve eksozomların incelenmesi amacıyla da uygulanmaktadır. Bu moleküller, kanser tespiti ve izlenmesi için invazif olmayan biyobelirteçler olarak hizmet edebilmektedir. Proteomiks, immünoterapilerin geliştirilmesine rehberlik edebilecek immün kontrol noktası proteinleri gibi immün ile ilgili protein belirteçlerini tanımlamak için da kullanılmaktadır (Yanar vd. 2023). Proteomiks verilerin genomiks ve transkriptomiks bilgilerle birleştirilmesi, kanser hücrelerindeki moleküler değişikliklerin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır.

Küresel proteomiks teknolojilerinin uygulandığı bir çalışmada, HBV ilişkili iki HSK hasta kohortunda 260 primer tümörün proteogenomik analizleri gerçekleştirilmiş ve normal ve tümör hücreleri arasında analizler birleştirilerek, HSK’da PDGFRB, FGFR4,

ERBB2/3, CDK6 kinazlar ve MFAP5, HMCN1 ve Hsp proteinleri dahil olmak üzere, çoğu düşük genomik ve/veya transkriptomik sapmalar gösteren aşırı ifade edilmiş hedefler belirlenmiştir. FGFR4 kinaz ve Hsp proteinlerinin protein ifadesi, karşılık gelen inhibitörlerine verilen yanıtla önemli ölçüde ilişkili olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, HSK'da hedef protein tespitine imkan vermiş ve proteomik yaklaşımların potansiyelini ortaya koymuştur (Elmas vd. 2022).

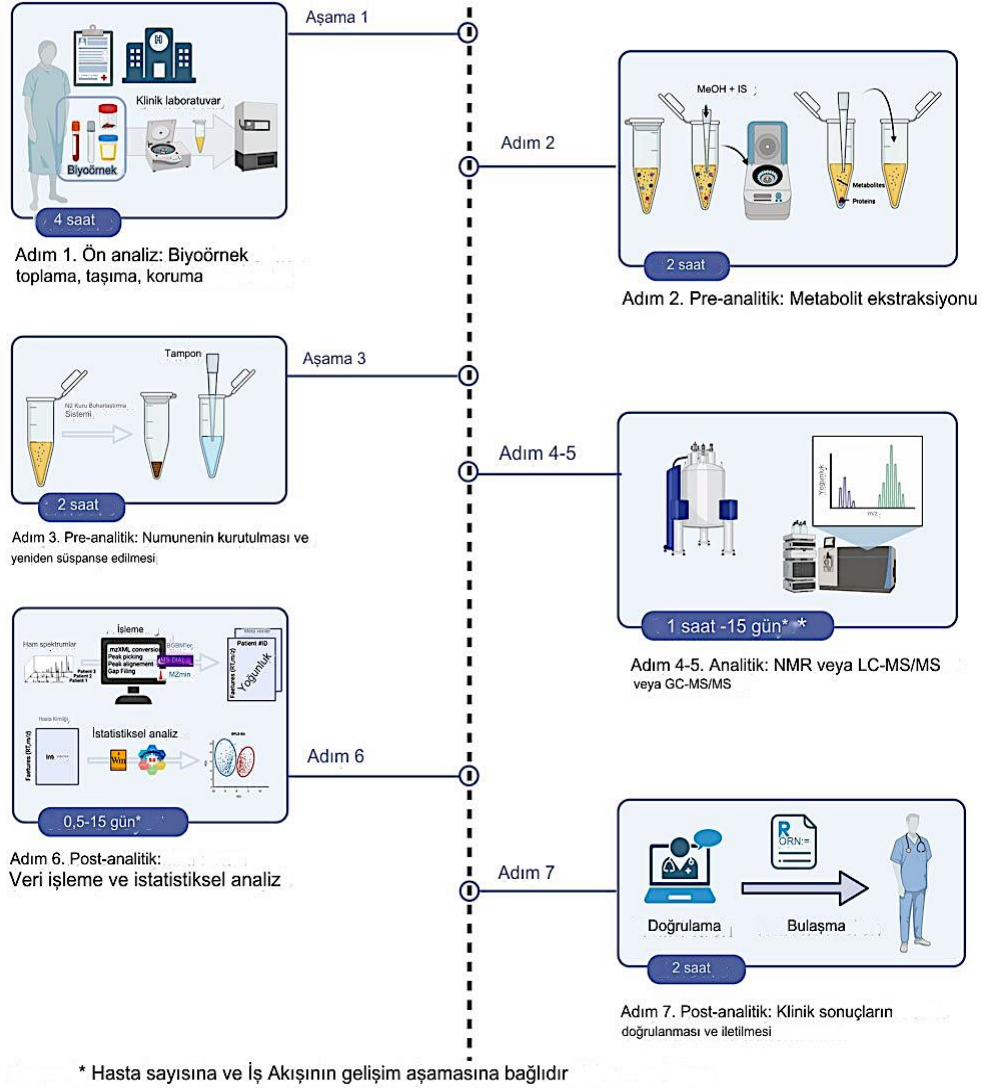
2.7.3 Metabolomiks ve kanser alanında kullanımı

Metabolomiks; metabolitlerin, küçük moleküllü substratların, ara maddelerin ve hücre metabolizma ürünlerinin tanımlanmasını içeren teknoloji olarak tanımlanmaktadır. Metabolitler, genel olarak 1500 Da'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip molekülleri temsil etmektedir. Bir hücre, doku, organ veya organizmanın metabolomu, mevcut olan metabolitlerin tamamını kapsamaktadır (Daviss 2005). Spesifik olarak metabolomiks, "belirli hücresel süreçlerin geride bıraktığı benzersiz metabolit parmak izlerinin sistematik çalışması" olarak açıklanmaktadır (Jordan vd. 2009). Metabolik profillemeye o hücrenin fizyolojisinin anlık bir görüntüsünü vermekte ve bir organizmanın doğrudan "fizyolojik durumunun işlevsel bir okumasını" sağlamaktadır (Villate vd. 2021).

Diğer OMİKS yaklaşımlarına kıyasla nispeten yeni bir alan olan metabolomiks, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile gaz kromatografi-kütle spektrometresi tekniklerini kullanmaktadır (GC-MS). Bu teknikler, bilim insanlarının karmaşık biyolojik örneklerdeki çok çeşitli metabolitleri tanımlamasına ve miktarını belirlemesine olanak tanımaktadır. Metabolomiks iş akış şeması şekil 2.22'de sunulmaktadır. Öncelikli olarak hedefe yönelik doku, plazma, idrar, tükürük, hücreler vb. numuneler toplanmaktadır. Daha sonra, metabolitler genellikle dahili standartların eklenmesi ve türevlendirme ile ekstrakte edilmektedir (Dettmer vd. 2007).

İlerleyen aşamalarda örnekler, analitik yöntemlerle analiz edilmektedir. GC, özellikle kütle spektrometresi ile birlikte kullanıldığında, metabolomik analiz için yaygın olarak kullanılan bir ayırma tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır. GC çok yüksek kromatografik

çözünürlük sunmakta ve bir alev iyonizasyon dedektörü (GC/FID) veya bir kütle spektrometresi ile birlikte kullanılabilir.



Şekil 2.22 Metabolomiks iş akış şeması (Le Gouellec vd. 2023)

Yöntem özellikle küçük ve uçucu moleküllerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için tercih edilmektedir (Soga vd. 2003) Bununla birlikte, GC'nin pratik bir sınırlaması, birçok biyomolekül için kimyasal türevlendirme gerekliliğinin olmasıdır. Türevlendirme olmadan yalnızca uçucu kimyasallar analiz edilebilmektedir. Daha fazla çözünürlük için gerekli olduğu durumlarda, iki boyutlu kromatografi (GCxGC) uygulanabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ise metabolomik analiz için en yaygın ayırma tekniği olarak kullanılmakta olup elektrosprey

iyonizasyonun ortaya çıkmasıyla MS'ye bağlanmış bulunmaktadır. GC'nin aksine, HPLC daha düşük kromatografik çözünürlüğe sahiptir. Ancak polar moleküller için türevlendirme gerektirmemekte ve molekülleri sıvı fazda ayırmaktadır. Ayrıca HPLC'nin, GC yöntemlerine göre çok daha geniş bir analit yelpazesini daha yüksek bir hassasiyetle ölçülebildiği belirtilmektedir (Soga vd. 2003, Gika vd. 2007). Tüm bu teknikler kullanılarak elde edilen veriler işlenerek veri bankaları ile karşılaştırılmakta ve metabolit tanımlaması yapılmaktadır. Hastalık durumları ve sonuçları ile ilişkileri tanımlamak, önemli korelasyonları belirlemek ve mevcut biyolojik bilgi ile metabolik imzaları karakterize etmek için birçok biyoinformatik araç ve yazılım mevcutta bulunmaktadır.

İlaç toksisitesini ve bazı hastalık modellerini değerlendiren birçok çalışmada, ilgilenilen metabolitler önceden bilinmemektedir. Bu durum, sınıf üyeliği konusunda önceden varsayımlarda bulunmayan denetimsiz yöntemleri popüler bir ilk tercih haline getirmektedir. Bu yöntemlerden en yaygın olanı, bir veri kümesinin boyutlarını verimli bir şekilde birkaç taneye indirgeyebilen temel bileşen analizini (PCA) içermektedir. Düşük boyutlu PCA uzayında analiz edildiğinde, benzer metabolik parmak izlerine sahip örneklerin kümelenmesi tespit edilebilmektedir. PCA algoritmaları, tüm ilişkili değişkenleri çok daha az sayıda ilişkisiz değişkenle değiştirmeyi ve orijinal veri kümesindeki bilgilerin çoğunu korumayı amaçlamaktadır (Maritha 2022). Bu kümeleme, kalıpları aydınlatabilmekte ve hastalık biyobelirteçlerinin (sınıf üyeliğiyle en çok korelasyon gösteren metabolitler) belirlenmesine yardımcı olabilmektedir (Li vd. 2020). Doğrusal modeller metabolomik verileri için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, çoklu doğrusal bağlantıdan etkilenmektedir. Bununla birlikte, çok değişkenli istatistikler yüksek boyutlu korelasyonlu metabolomik veriler için gelişen yöntemler olarak dikkat çekmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılanı "Gizli Yapılara Projeksiyon (PLS)" regresyonu ve onun sınıflandırma versiyonu "PLS-DA" olarak tanımlanmaktadır. Tek değişkenli yöntemler söz konusu olduğunda, değişkenler klasik istatistik araçları (Student's t-test, ANOVA veya karma modeller gibi) kullanılarak tek tek analiz edilmekte ve yalnızca düşük p değerlerine sahip olanlar ilgili kabul edilmektedir. Bununla birlikte, hedeflenmemiş metabolomiklerde toplam metabolit miktarını doğrudan ölçmek için standart bir yöntem olmadığından, çoklu karşılaştırmalar yapıldığında yanlış keşifleri

azaltmak için düzeltme stratejileri kullanılmaktadır (Bonini vd. 2020). Çok değişkenli analizlerde sonuçların genelleştirilebilmesini sağlamak amacıyla modellerin her zaman doğrulamasının yapılması gerekmektedir.

Metabolomiks, biyolojik sistemlerin altında yatan biyokimyasal süreçleri anlamak için güçlü bir araç olarak kabul edilmektedir. Metabolit seviyelerinin ölçülmesi neticesinde bir hücrenin, dokunun, organın veya organizmanın fizyolojik durumunun yanı sıra hastalıkların, ilaçların ve diğer çevresel faktörlerin etkileri hakkında bilgi sağlanabilmektedir (Cavicchioli vd. 2022). Biyomedikal araştırmalarda metabolomik, hastalıklar için yeni biyobelirteçleri tanımlamak, hastalık mekanizmalarını anlamak ve yeni terapötik stratejiler geliştirmek için kullanılabilir. Kanser hücrelerinde meydana gelen karmaşık metabolik değişiklikler hakkında bilgi sağlayarak kanser araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Kanserle ilişkili metabolik değişikliklerin anlaşılması, kanser teşhisi, tedavisi ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için önemli sonuçlar doğurabilmektedir. Biyobelirteç keşfinde metabolomik, farklı kanser türleriyle ilişkili spesifik metabolitleri veya metabolik profilleri tanımlayabilmektedir. Bu biyobelirteçler erken teşhis, prognoz ve hastalığın ilerlemesini izlemek için kullanılabilir (Garcia-Aloy vd. 2020). Metabolik profillemeye yapılan kanser metabolomiks çalışmalarında, kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla farklı metabolik profillerini ortaya çıkarabilmektedir. Kanser hücreleri genellikle artan glikoliz (Warburg etkisi) ve değişen lipid metabolizması dahil olmak üzere enerji metabolizmasında değişiklikler sergilemektedir. Bu metabolik değişimlerin anlaşılması, kanser gelişiminin altında yatan mekanizmalar hakkında bilgi sağlayabilmektedir (Dos Santos Cotrim vd. 2023).

İlaç keşfi ve kişiselleştirilmiş Tıp alanında metabolomiks, kanser hücrelerinin değişmiş metabolik yollarındaki potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca kanser hücrelerinin çeşitli tedavilere nasıl yanıt verdiğinin değerlendirilmesine de yardımcı olabilmektedir (Moreno-Torres vd. 2022). Bu bilgiler, kanser hastaları için hedefe yönelik tedaviler ve kişiselleştirilmiş tedavi planları geliştirmek için değerli olabilmektedir. Bir tümörün farklı bölgeleri farklı metabolik profiller sergileyebilmektedir. Kanser hücrelerinin çeşitliliğini ele alan tedavi stratejilerini geliştirmek adına tümör içi heterojenliği incelemek ise oldukça önemli kabul

edilmektedir. Tedavi yanıtının izlenmesi için metabolomikler kanser hücrelerinin tedaviye nasıl yanıt verdiğini izlemek için kullanılabilir (Alarcon-Barrera vd. 2022). Metabolik profillerdeki değişiklikler, bir tedavinin etkili olup olmadığına veya kanserin direnç geliştirip geliştirmediğine dair erken göstergeler de sağlayabilmektedir. Kanser hücreleri hayatta kalmak ve büyümek için genellikle belirli metabolik yolları aktive etmektedir. Metabolomik, terapötik amaçlar için kullanılacak metabolik güvenlik açıklarını ortaya çıkarabilmektedir. Bu güvenlik açıklarının hedeflenmesi, daha etkili kanser tedavilerinin geliştirilmesine yol açabilmektedir (Mukherjee vd. 2022). Metabolomik ayrıca, kanser ilerlemesi sırasında ve deneysel tedavilere yanıt olarak meydana gelen metabolik değişiklikleri araştırmak için hücre hatları, hayvan modelleri ve hastadan türetilmiş ksenograftları içeren kanser araştırmalarında da kullanılmaktadır. Bununla beraber, kanser için minimal invaziv ve son derece hassas tanı testlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilmektedir (Chen vd. 2022).

Karaciğer kanser metabolizması, hem kanser hücrelerinin uygun olmayan şekilde çoğalmasını ve tümör mikro çevresine uyum sağlaması için hücre içi metabolizmanın yeniden programlanmasını, hem de düzenli doku metabolizmasındaki dalgalanmaları içermektedir. Karaciğer sirozu, karaciğer kanseri ve HSK ilişkili metabolomik ve metabolit profili; kanser teşhisi, izlenmesi ve tedavisi açısından ilgi odağı olmaya başlamıştır (Broeckling vd. 2023).

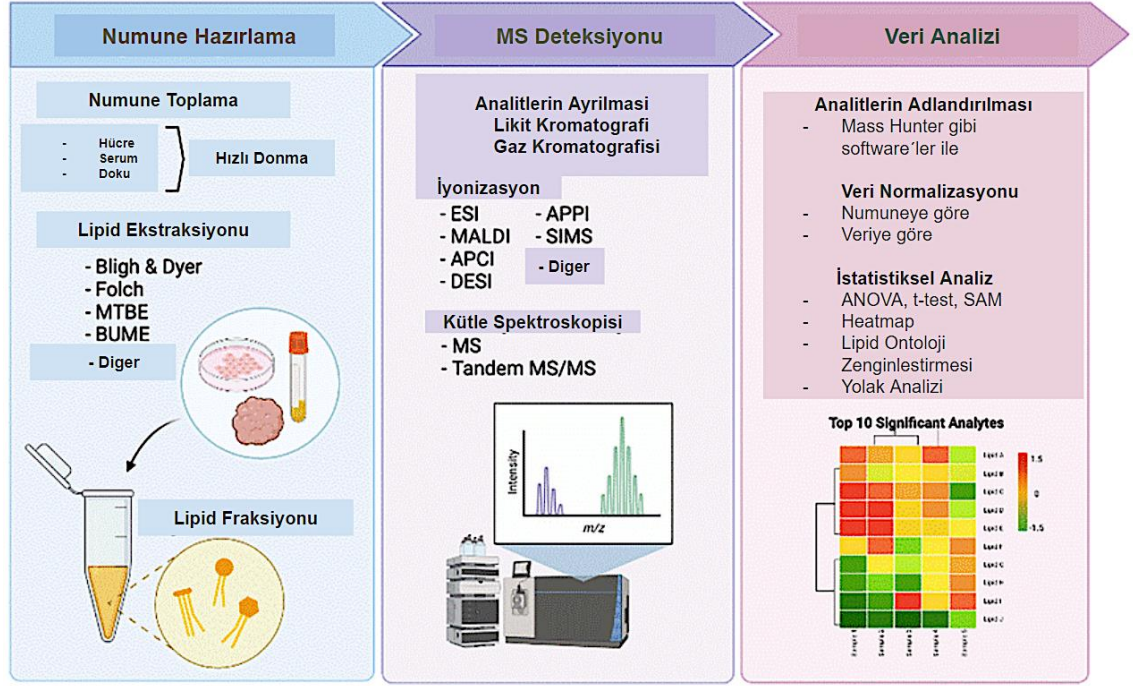
Metabolomiklerin genomik, proteomik ve transkriptomik verilerle entegre edilmesi, kanserin altında yatan moleküler mekanizmaların daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayabilmektedir. Bu multi-omik yaklaşım, araştırmacıların genetik değişikliklerin kanserdeki metabolik yolları nasıl etkilediğinin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Özetle, metabolomik, biyoloji ve sağlık anlayışında devrim yaratma potansiyeline sahip, hızla büyüyen bir alan olarak son yıllarda ön plana çıkmaktadır.

2.7.4 Lipidomiks ve kanser alanında kullanımı

Lipidomiks, biyolojik sistemlerde lipidlerin tanımlanması ve ilgili hücresel yolların ve ağların aydınlatılması olarak bilinmektedir (Han 2007). “Lipidom” kelimesi bir hücre,

doku, organizma veya ekosistemdeki tüm lipid profilini tanımlamak için kullanılmakta ve diğer ana biyolojik molekül sınıflarını (amino asitler, şekerler, glikoliz ve TCA ara ürünleri ve nükleik asitler gibi) da içeren “metabolom”un bir alt kümesi olarak bilinmektedir. Her ne kadar “metabolomiks” şemsiyesi altında yer alsada, lipidlerin diğer metabolitlere göre benzersizliği ve işlevsel özgüllüğü nedeniyle lipidomik başlı başına ayrı bir disiplin olarak kabul edilmektedir. Lipidomiks araştırmaları, hücrel lipidlerin yapılarını, işlevlerini, etkileşimlerini ve dinamiklerini belirlemenin yanı sıra hücrel lipid molekülerinin diğer proteinler ve metabolitlerle etkileşimlerinin tanımlanmasını ve miktarının belirlenmesini içermektedir (Kostidis vd. 2023). Lipidomiks, lipid moleküler türlerini doğasında bulunan spesifik kimyasal özellikleri kapsamlı bir kütle spektrometrik yaklaşımla bütünleştirerek tanımlanmaktadır (Han ve Gross 2005).

Lipidomiks, MS, NMR, floresan spektroskopisi, çift polarizasyon interferometrisi ve hesaplama yöntemlerini içermektedir. Lipidomiks iş akış şeması şekil 2.23’de sunulmaktadır. Biyolojik örneklerden lipid ekstraksiyonu ve izolasyonunu içeren yöntemlerin çoğu, hidrokarbon zincirlerinin organik çözücülerdeki yüksek çözünürlüğünden faydalanmaktadır. Lipid sınıflarındaki çeşitlilik göz önüne alındığında, tüm sınıfları ortak bir ekstraksiyon yöntemiyle karşılamak mümkün olmamaktadır. Geleneksel Bligh/Dyer prosedürü (Bligh ve Dyer 1959), organik katmana faz bölünmesini içeren kloroform/metanol bazlı protokolleri içermektedir. Katı faz ekstraksiyon kromatografisi, ham lipid karışımlarının farklı lipid sınıflarına hızlı ve hazırlayıcı bir şekilde ayrılması için kullanışlı bir yöntem olarak belirtilmektedir. Bu teknik, lipid karışımlarından gliserofosfolipitleri, yağ asitlerini, kolesteril esterleri, gliserolipitleri ve sterolleri ayırmak için silika veya diğer sabit fazları içeren önceden paketlenmiş kolonların kullanılmasını içermektedir (Sullards vd. 2007). HPLC veya LC, lipidomiks analizlerde kütle analizinden önce lipidleri ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Normal fazlı HPLC gliserofosfolipidleri baş grup polaritesi temelinde etkili bir şekilde ayırırken, ters faz HPLC eikosanoitler gibi yağ asitlerini zincir uzunluğu, doymamışlık derecesi ve ikame temelinde etkili bir şekilde ayırabilmektedir (Malavolta vd. 2004).



Şekil 2.23 Lipidomiks iş akış şeması (Ward vd. 2021)

Lipid profili oluşturma, bir hücre veya dokudaki lipid türlerinin kapsamlı bir analizini sağlayan hedefli bir metabolomiks platform olarak bilinmektedir. Elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisine (ESI-MS/MS) dayalı profillemeye, kantitatif veriler sağlayabilmekte ve yüksek verimli analizlere uyarlanabilmektedir (Serhan vd. 2003). Lipidomik için, özellikle MS tabanlı yaklaşımlar için önemli bir zorluk, bilgi edinme ve işleme zinciri boyunca çeşitli aşamalarda ortaya çıkan büyük miktarda veriyi işlemenin hesaplamalı ve biyoinformatik taleplerinde yatmaktadır (Subramaniam vd. 2011). Kromatografik ve MS veri toplama, spektral hizalama ve sinyal yoğunluklarındaki dalgalanmaların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için önemli çabalar gerektirmektedir (Sysi-Aho vd. 2007). Son yıllarda, lipidler de dahil olmak üzere metabolitlerin MS profillemesi ile üretilen verileri analiz etmek için çeşitli şirketler ve araştırma grupları tarafından bir dizi yazılım paketi geliştirilmiştir. Diferansiyel profillemeye için veri işleme genellikle girdi dosyası manipülasyonu, spektral filtreleme, pik tespiti, kromatografik hizalama, normalleştirme, görselleştirme ve veri aktarımı dahil olmak üzere birkaç aşamaldan geçmektedir. Metabolik profil oluşturma yazılımına bir örnek, ücretsiz olarak kullanılabilen Java tabanlı MZmine uygulaması olarak bilinmektedir (Katajamaa vd. 2006). Yakın zamanda MS-DIAL 4 yazılımı, 117 lipid alt

sınıfı ve 8051 lipid için alıkonma süresi, çarpışma kesiti ve tandem kütle spektrometresi bilgileri içeren kapsamlı bir lipidom atlası ile entegre edilmektedir (Tsugawa vd. 2020). Markerview gibi bazı yazılım paketleri ise çok değişkenli istatistiksel analiz (örneğin, temel bileşen analizi) içermekte ve özellikle lipid bazlı biyobelirteçlerin geliştirilmesi için fizyolojik bir fenotiple ilişkili lipid metabolitlerinde korelasyonların tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Kantitatif lipidomik verilerin ilgili transkripsiyonel veriler (gen dizisi yöntemleri kullanılarak) ve proteomik verilerle (tandem MS kullanılarak) birleştirilmesi ise, metabolik veya sinyal yollarının daha derinlemesine anlaşılması için önemli bir sistem biyolojisi yaklaşımı sağlamaktadır.

Lipidomiks araştırmalarda, bir hücrenin fizyolojik veya patolojik durumundaki farklı lipid moleküler türleri tanımlanabilmektedir. Bu nedenle lipidomik çalışmalar, hücrel lipid metabolizması, trafiği ve homeostazındaki değişiklikleri tanımlayarak lipidle ilişkili hastalık süreçlerinin biyokimyasal mekanizmalarını tanımlamada önemli bir rol oynamaktadır (Klose vd. 2012). Kanser araştırmaları bağlamında lipidomiks, kanser hücrelerinde lipid metabolizmasının nasıl değiştiğine ve bu değişikliklerin kanser gelişimi ve ilerlemesi üzerindeki etkisine dair değerli bilgiler sağlamaktadır (Wang vd. 2022). Kanser hücreleri genellikle lipid metabolizmasında önemli değişiklikler sergilemektedir. Bu değişiklikler arasında artmış de novo lipid sentezi, değişmiş yağ asidi bileşimi ve gelişmiş lipid alımı yer alabilmektedir. Lipidomiks, bu değişikliklerin karakterize edilmesine ve kanser biyolojisindeki rollerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Costantini vd. 2023). Spesifik lipid türleri veya lipid profilleri, farklı kanser türleri için biyobelirteç görevi görebilmektedir. Dokuların, kanın veya diğer biyolojik örneklerin lipid bileşimini analiz ederek, lipidomik kanser teşhisine ve hastalığın ilerlemesinin izlenmesine yardımcı olabilmektedir. Örneğin, belirli fosfolipidler veya seramidlerdeki değişiklikler kanserle ilişkilendirilmektedir (Barupal vd. 2023). Lipidomiks, kanserle ilgili yollarda yer alan lipid sinyal moleküllerinin belirlenmesine de yardımcı olabilmektedir (Aramaki vd. 2023).

Bir tümör içindeki farklı bölgeler farklı lipid profillerine sahip olabilmektedir. Lipidomiks, bir tümör çevresindeki lipid çeşitliliğini anlamak için gerekli olan tümör içi heterojenite hakkında bilgi sağlayabilmektedir (Martin-Saiz vd. 2023). Bu bilginin

kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri üzerinde etkileri olabilmektedir. Bununla birlikte lipidomiks yaklaşımları içeren güncel araştırmalar, ilaçların veya tedavilerin kanser hücrelerinin lipid bileşimini nasıl etkilediğini inceleyebilmekte ve bu da lipid hedefli kanser tedavilerinin geliştirilmesine imkan sağlayabilmektedir (Chen vd. 2023). Bazı lipidler ve lipid yolakları kanserde ilaç direnciyle ilişkilendirilmektedir. Lipidomik, ilaca dirençli kanser hücrelerinde lipid bileşimi ve metabolizmasındaki değişiklikleri inceleyerek direncin üstesinden gelmeye ve daha etkili tedaviler geliştirmeye katkıda bulunabilmektedir (Kostidis vd. 2023). Lipidomiks ayrıca, spesifik membran lipidlerinin kanser metastazı süreçlerindeki rolüne ışık tutabilmektedir. Membran lipid bileşimindeki değişiklikler, kanser yayılımının önemli yönleri olan hücre yapışmasını, hareketliliğini ve istilasını etkileyebilmektedir (Pranneshraj vd. 2022).

Hızla genişleyen bu alan, tümü sistem biyolojisi ailesini oluşturan genomik ve proteomik alanlarında kaydedilen büyük ilerlemeyi tamamlamaktadır (Yoon vd. 2022, Kostidis vd. 2023). Lipidomiks verilerinin genomiks, proteomiks ve metabolomiks verilerle entegre edilmesi, kanserdeki moleküler değişikliklerin daha kapsamlı bir görünümüne katkı sağlayabilmektedir (Liu vd. 2022, Bai vd. 2023). Özetle, lipidomik kanser araştırmalarında güçlü bir araç olarak kabul edilmekte ve lipidlerin kanser biyolojisi, teşhis ve terapötik stratejilerdeki rolüne ilişkin öngörüler sağlamaktadır. Kanserle ilişkili lipid değişikliklerinin anlaşılması, yeni kanser tedavilerinin ve kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesi için önemli etkilere sahip olmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında kullanılan malzeme ve kit bilgileri çizelge 3.1’de, cihaz bilgileri ise çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kıyasal ve kit bilgileri

Kimyasal Malzemeler ve Kitler	Marka
Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, ABD
MRS	Merck, ABD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Serva, ABD
Fetal Sığır Serum (FBS)	Sartorius, Almanya
Penisilin-Streptomisin	Sartorius, Almanya
L-glutamin	Sartorius, Almanya
10X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Sartorius, Almanya
Tripsin-EDTA	Sartorius, Almanya
Tripan mavisi	Sartorius, Almanya
3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Sigma, ABD
Anneksin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti	BioLegend, ABD
Tripsin/Lys-C endoproteinaz	Promega, ABD
Tetraetilamonyum bromür	Sigma, ABD
Metabolomiks dahili standart kiti	Biocrates, Avusturya
Asetonitril	Sigma, ABD
Formik asit	Sigma, ABD
Metanol	Sigma, ABD
Kloroform	Merck, ABD

Çizelge 3.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan cihaz bilgileri

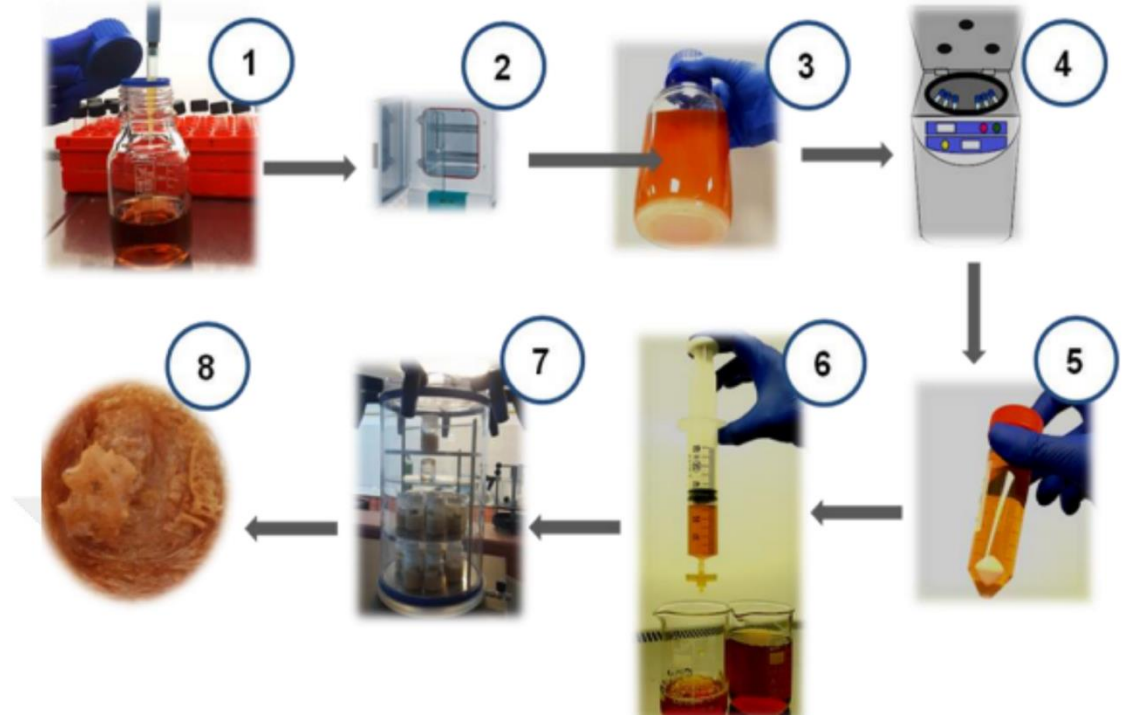
Cihazlar	Marka
Liyofilizatör	Buchi, İsviçre
CO ₂ 'li İnkübatör	Nüve, Türkiye
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Sıcak su banyosu	Nüve, Türkiye
Hücre sayım cihazı	BioRad, ABD
Inverted mikroskop	Olympus, Japonya
Mikroplaka okuyucu	Epoch, ABD
LC/MS-MS Orbitrap	Thermo Scientific, ABD
Oto Örnekleyici Robot	Zinsser Analytical, Almanya
Derin dondurucu	Eppendorf, Almanya
Mikro Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Visiprep TM vakum	Sigma Aldrich, ABD
Qubit Protein Analizörü	Invitrogen, ABD
Vortex karıştırıcı	Helma, Almanya

3.2 Yöntem

3.2.1 Postbiyotiklerin hazırlanması

Tez çalışması kapsamında, Niğde bölgesinden toplanan kansere dirençli kör köstebek faresi *Nannospalax xanthodon* (erkek; 2n=58) bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşu (Zatari, 2022) postbiyotik üreticisi olarak kullanılmıştır. Postbiyotik eldesinin temel aşamaları şekil 3.1'de özetlenmiştir. -80 °C'de gliserol stoklarında saklanan bakteri suşu MRS-B besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat kültüre edilmiştir. Bakterilerin gelişimi için ihtiyaç duyduğu anaerobik koşullar anaerobik kit (Sigma, Almanya) içeren jar kullanımı ile sağlanmıştır. İnkübasyonu takiben 8.500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilen kültürün üst fazı (süpernatant) toplanmış ve steril membran filtreden (0.22 µm) geçirilerek hücrelerinden tamamen

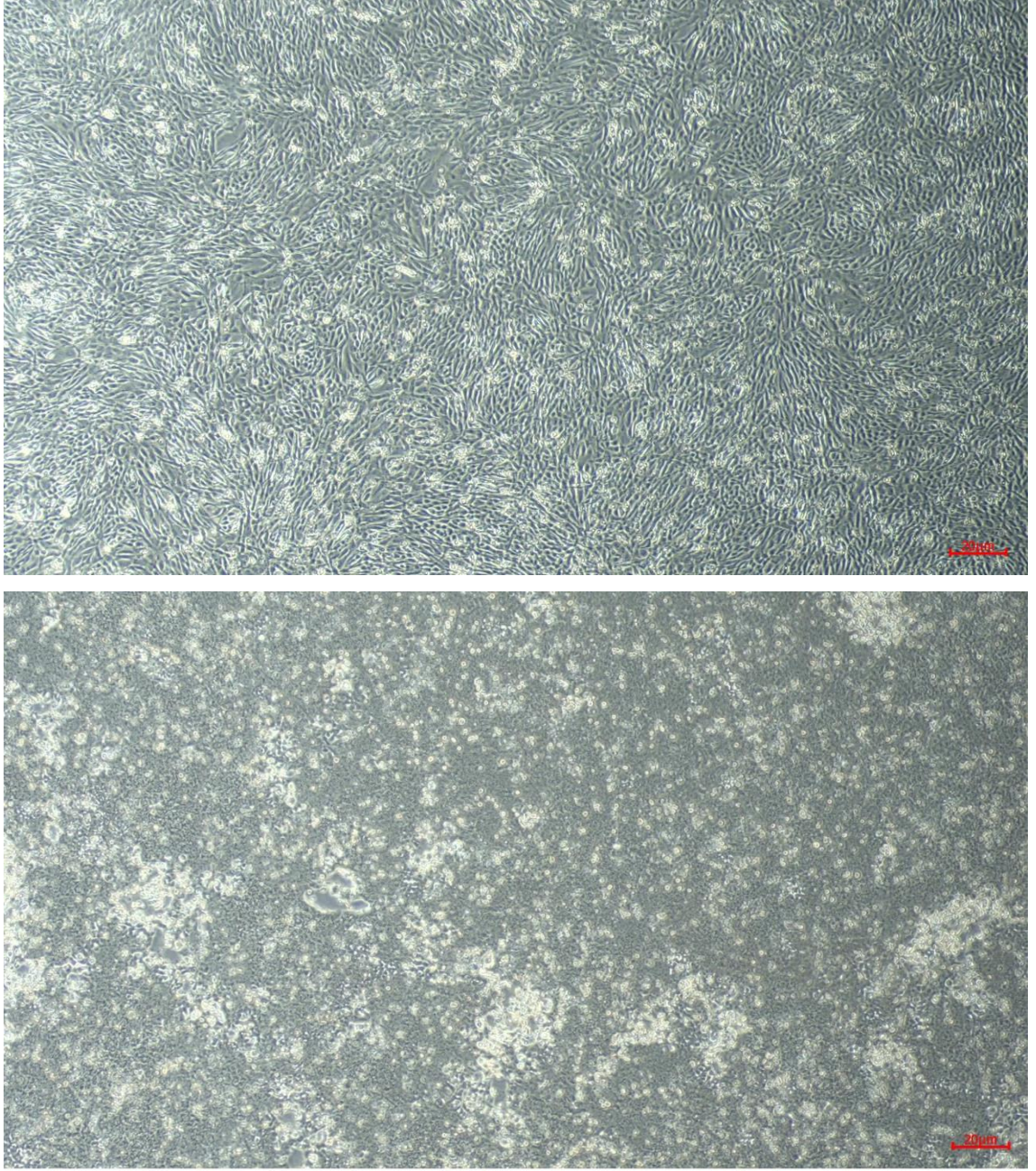
uzaklaştırılmıştır. Ardından, sırasıyla -20 °C ve -80 °C’de dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Toz formda elde edilen postbiyotikler steril distile su ile çözülmüş, membran filtre (0.22 µm) kullanılarak sterilize edilerek sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Postbiyotik eldesinin şematik özeti (1) Saf kültürün 100 mL sıvı besiyerine % 1 oranında inokülasyonu, (2) 37 °C’de 24 saat inkübasyon, (3) Aktif kültürün eldesi, (4) 8.500 rpm’de 20 dakika santrifüj, (5) Postbiyotik içerikli üst fazın ayırımı, (6) Postbiyotik içerikli üst fazın hücrelerinden arındırılmak için 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilmesi, (7) Liyofilizasyon [vakum basıncı: 0.120 mB-kondansör sıcaklığı -58 °C (Buchi freze dryer, İsviçre)], (8) Postbiyotiklerin toz formda eldesi.

3.2.2 Hücre kültürü

Tez çalışması kapsamında, karaciğer kanser hücresi olarak hepatosellüler karsinoma hücre hattı (Hep-40), kontrol grubu olarak da karaciğer stellat hücre hattı (Lx-2, primer insan hepatik stellat hücre) kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Hücrelerin (Lx-2 ve Hep-40) genel mikroskop görüntüleri

Hep-40 hücreleri % 1 penisilin/streptavidin ve % 10 fetal sığır serumu içeren düşük glukozlu DMEM besiyerinde, Lx-2 hücreleri ise % 1 penisilin/streptavidin ve % 10 fetal sığır serumu içeren yüksek glukozlu DMEM besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ ile % 95 bağıl nem içeren kültür ortamında geliştirilmiştir. Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında (konfluent), tripsin-EDTA ile toplanarak T-75 kültür kabına transfer edilmiş ve belirli yoğunluklarda pasajlanmıştır. Tez çalışması kapsamında

mikoplazma kontaminasyonu açısından negatif ve 10-20 pasaj numarasına sahip hücreler kullanılmıştır.

3.2.3 Sitotoksite analizleri

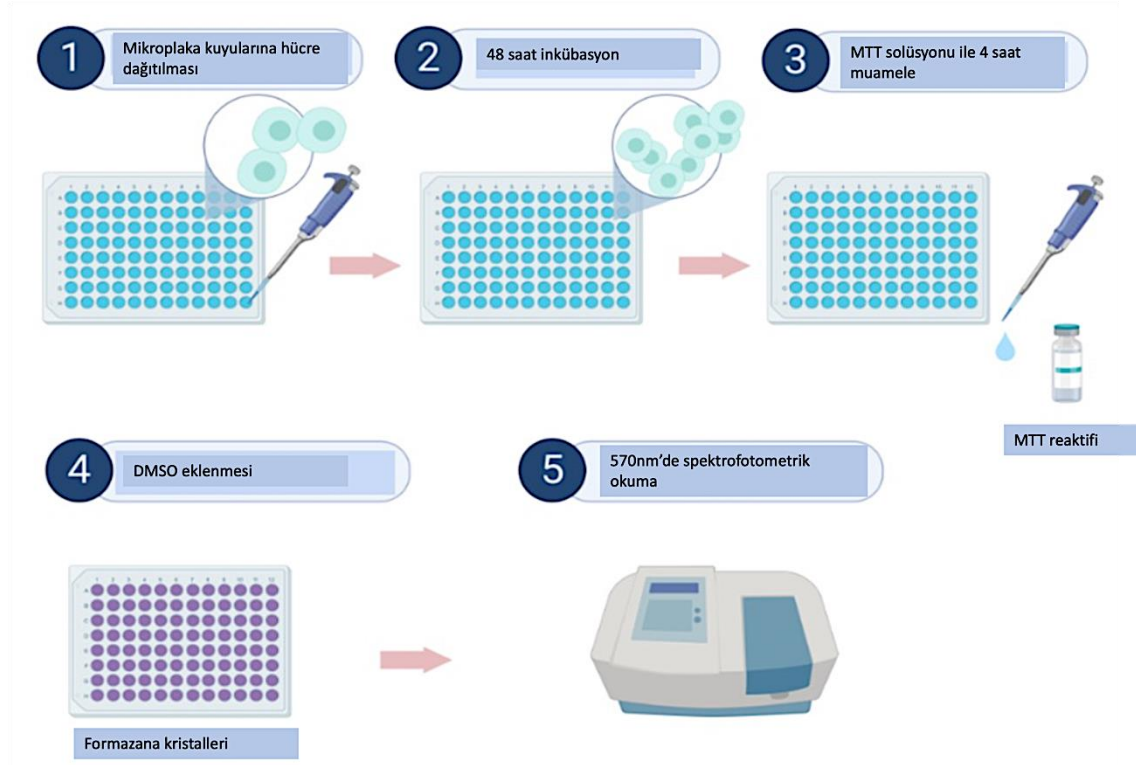
Daha önceki çalışmalarımız neticesinde Hep-40 hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki sergilediği belirlenen postbiyotiklerin 1.000 µg/mL dozunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi tekrar doğrulanmıştır. Bu amaçla, 96 kuyulu mikropalakalara kuyu başına 100.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara 1.000 µg/mL dozunda postbiyotik içeren besiyeri eklenmiştir. Postbiyotik içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulara 10 µL MTT solüsyonu (5 mg/mL) eklenmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. Oluşan mor renkli formazan kristalleri 100 µL DMSO kullanılarak çözülmüş ve açığa çıkan rengin sahip olduğu optik yoğunluk mikropalaka okuyucuda 570_{nm} dalga boyunda okuma alınarak belirlenmiştir (Şekil 3.3) (Denizot vd. 1986).

3.2.4 Apoptoz analizleri

Postbiyotik ile muamele sonrası hücrelerin canlılıkları ve apoptoz durumları, üreticinin talimatlarına uygun olacak şekilde Anneksin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti kullanılarak akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir.

6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 500.000 hücre ekilmiş ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂, % 95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılan kuyulara 1.000 µg/mL dozunda postbiyotik içeren besiyeri eklenmiştir. Postbiyotik içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat süren inkübasyonun ardından kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve 200xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücrelerin PBS ile yıkaması yapılmış ve 150 µL Annexin V Binding Buffer eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Ardından, süspanse haldeki hücrelerin üzerine 5 µL FITC-Annexin V ile 1

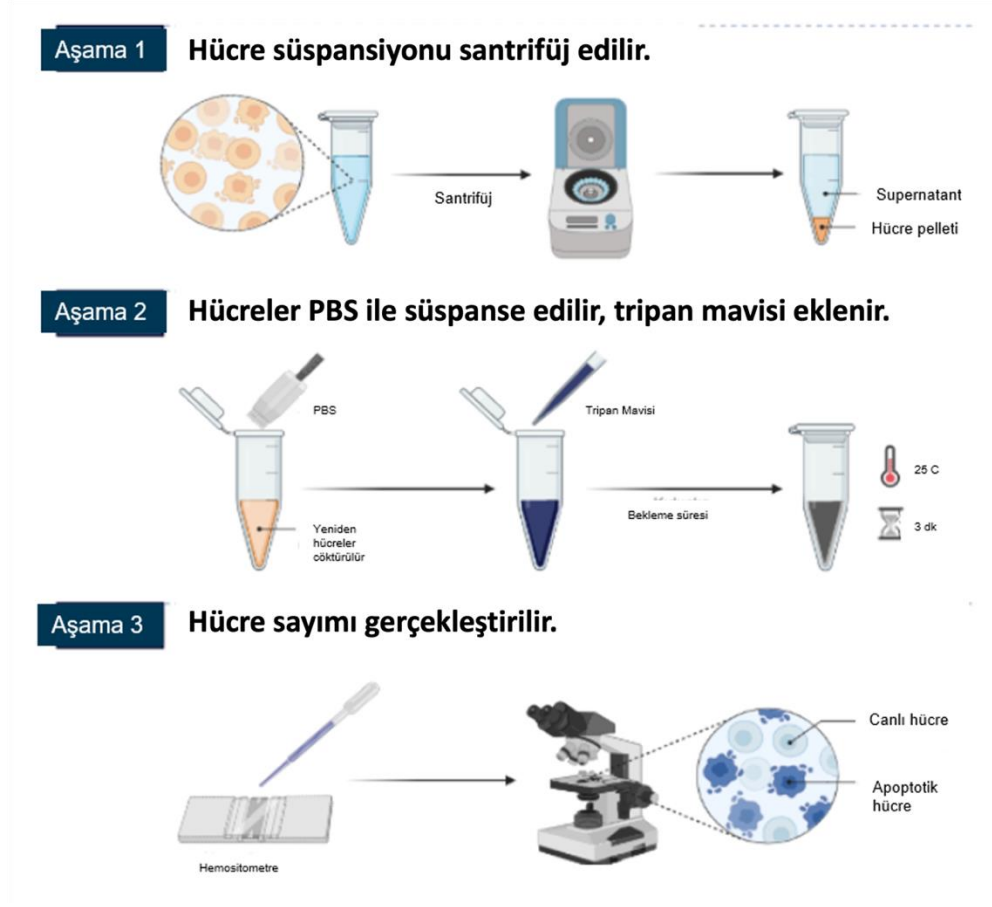
μ L propidyum iyodür (PI) solüsyonu karanlık ortamda eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben, akış sitometrisi kullanılarak apoptoz analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 MTT analizine ait iş akış şeması

3.2.5 Canlı hücre sayımı

Bu amaçla, apoptoz analizleri için tasarlanan hücre kültürü çalışmaları tekrar edilmiştir. Postbiyotiklerle inkübasyonu takiben kuyulardaki üst faz uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve $200\times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Canlı hücre sayıları, tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazı (TC20™ Bio-Rad) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Canlı hücre sayımına ait teknik aşamaların iş akış şeması

3.2.6 Sekretomların eldesi

Karaciğer kanser hücresi olarak kullanılan Hep-40 hücreleri ve kontrol grubu olarak seçilen LX-2 primer insan hepatik stellat hücreleri ile kansere dirençli kör köstebek faresi bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* EIR/SpX-1 suşuna ait postbiyotikler (1.000 µg/mL) birlikte daha önce belirtilen koşullarda kültüre edilmiştir. Kontrol olarak postbiyotik içermeyen hücreler kullanılmıştır. İnkübasyonu takiben kuyulardaki üst faz toplanmış ve membran filtreden (0.22 µm) geçirilerek hücrelerinden tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından, sırasıyla -20 °C ve -80 °C'de dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada, besiyerinden gelen protein ve metabolitleri göz ardı etmemek adına hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ile postbiyotik eldesinde kullanılan MRS besiyeri de çalışmalara dahil edilmiştir.

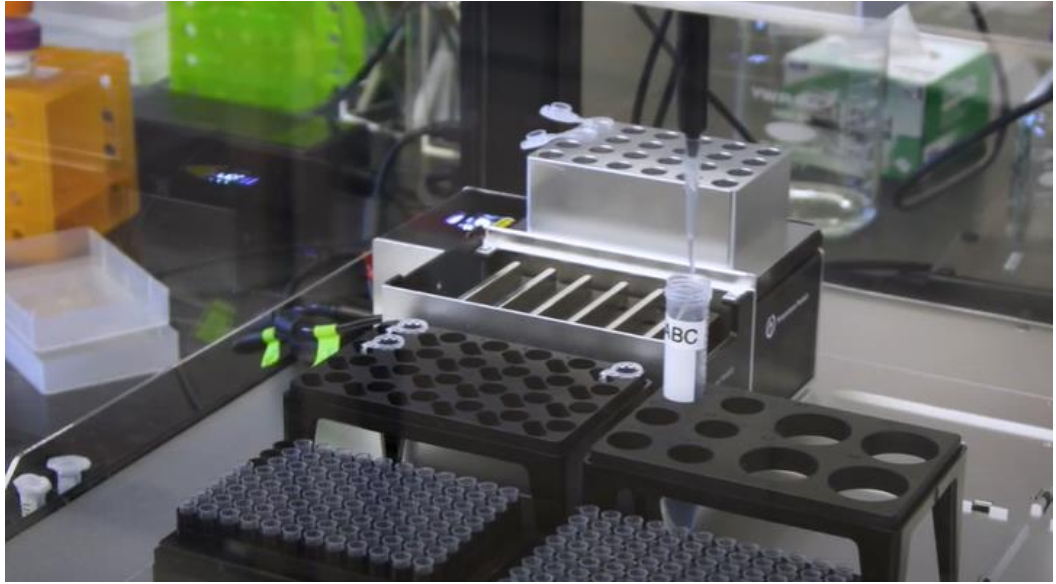
3.2.7 Proteomiks analizler

3.2.7.1 Protein ekstraksiyonu

Bir önceki aşamada elde edilen liyofilize sekretom örneklerinden öncelikli olarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, liyofilize haldeki sekretom numuneleri üzerine 300 µL proteaz ve fosfataz inhibitörü (Roche, ABD) ile desteklenen 0.1 M Na₂CO₃ ve 10 mM sodyum ortovanadat (pH:11) çözeltisinden eklenerek buz üzerinde 3 kez 10 saniye süreyle sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Dun vd. 2015). Ardından protein ekstraksiyonu Zinsser Anaytical (Salzburg, Avusturya) ön hazırlama ünitesi kullanılarak otomatize olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Protein miktarı ise bicinchoninic asit (BCA) protein tayin kiti kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.7.2 Kromatografik analizler ve kütle spektrometre çalışmaları

Kromatografik analizler kapsamında 200 µg protein üre/tiyöüre denatürasyon tamponu (6 M üre, 2 M tiyöüre) ile muamele edilmiştir. Denatüre proteinler 10 mM dithiothreitol kullanılarak oda sıcaklığında 30 dakika süresince indirgenmiştir. İndirgenen örnekler, 20 mM iyodoasetamid kullanılarak oda sıcaklığında 45 dakika süresince karanlık ortam şartlarında alkilenmiştir. Ardından, ilk olarak Lys-C sindirimini etkinleştirmek amacıyla 1:40 (enzim:protein) oranında Tripsin/Lys-C endoproteinaz (Promega, ABD) kullanılarak karanlık ortamda oda sıcaklığında 3 saat boyunca sindirim işlemi gerçekleştirilmiştir. Lys-C sindirim işleminden sonra, numune solüsyonuna 20 mM tetraetilamonyum bromür (pH:7.8) eklenerek 1 M üre, 0.33 M tiyöüre oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiş ve tripsin sindirimini etkinleştirmek için numunler gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.



Şekil 3.5 Proteomiks çalışmalarında kullanılan otomatik protein ekstraksiyon hazırlama ünitesi genel görüntüsü (a), otomatize pipetleme ünitesine ait görüntü (b)

Tripsinasyonu takiben, peptid çözeltilerine lipidlerin çöktürülmesi için formik asit (% 2 v/v) eklenmiş ve numuneler 4 °C’de 10 dakika boyunca 14.000xg’de santrifüj edilmiştir. Ardından örnekler üreticinin talimatları takip edilerek Empore™ C18 katı

faz ekstraksiyon (SPE) kartuşuna (1 mL başına 4 mm) enjekte edilmiş ve Visiprep™ vakum manifoldu (12 portlu, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak tuzdan arındırılmıştır.

Peptid elüsyonlarının saflığı ve miktarı Qubit® Protein Assay (Invitrogen, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Liyofilize edilen örnekler MS yükleme tamponu (% 2 asetonitril, % 0.1 trifloroasetik asit) ile yeniden süspansiyon edilmiş ve kütle spektrometre analizlerine kadar önce -80 °C'de saklanmıştır.

Shotgun proteomiks için sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılmıştır. Cihaz (Vanquish Nano/Cap 3500-RS LC sistemi, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) 500 ng peptid enjekte edilmiş ve numuneler EASY-Spray PepMap C18 LC kolonu (75 µm × 15 cm, C18, 2 µM, 100 Å, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak MS öncesinde 300 nL/dakika sabit akış hızında 150 dakikalık bir gradyanla ayrılmıştır. Bu kapsamda çözücü A olarak su içerisinde hazırlanmış olan % 0.1 formik asit, çözücü B olarak da asetonitril içerisinde hazırlanmış olan % 0.1 formik asit kullanılmıştır. Peptidler öncelikle 6 dakika boyunca % 2 oranında çözücü B ile enjekte edilmiş ve 6 ile 126 dakika arasında % 2 ile % 35 oranında çözücü B arasında bir gradyanla elüsyon işlemine tabi tutulmuştur. Ardından kalan peptitler 0.1 dakika artışla % 35 ile % 90 oranında çözücü B kullanılarak 1.9 dakika boyunca yıkanmıştır. Son olarak LC başlangıç koşullarına dönmeden önce 22 dakikalık bir dengeleme adımı (% 2 çözücü B) uygulanmıştır.

Bu aşamaları takiben, MS analizleri için Q-Exactive Plus High-Resolution Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) tandem kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılmıştır (Şekil 3.6). Öncü iyonlar; tam kütle taraması (400-2000 m/z, 70.000 çözünürlük) ile $1e^6$ 'da otomatik kazanç kontrolü (AGC) hedef değeri ve maksimum enjeksiyon dolun süresi 50 ms'de ölçülmüştür. Ürün iyonları 27 V normalleştirilmiş çarpışma enerjisi ile parçalanmış ve Orbitrap üzerinde 35.000 çözünürlükte analiz edilmiştir. AGC hedef değeri $2e^5$ olarak ayarlanmış ve orbitrap içindeki doğru iyon popülasyonunu kontrol etmek için maksimum enjeksiyon dolun süresi 120 ms olarak belirlenmiştir. Dinamik dışlama 30 saniye boyunca kullanılmıştır.

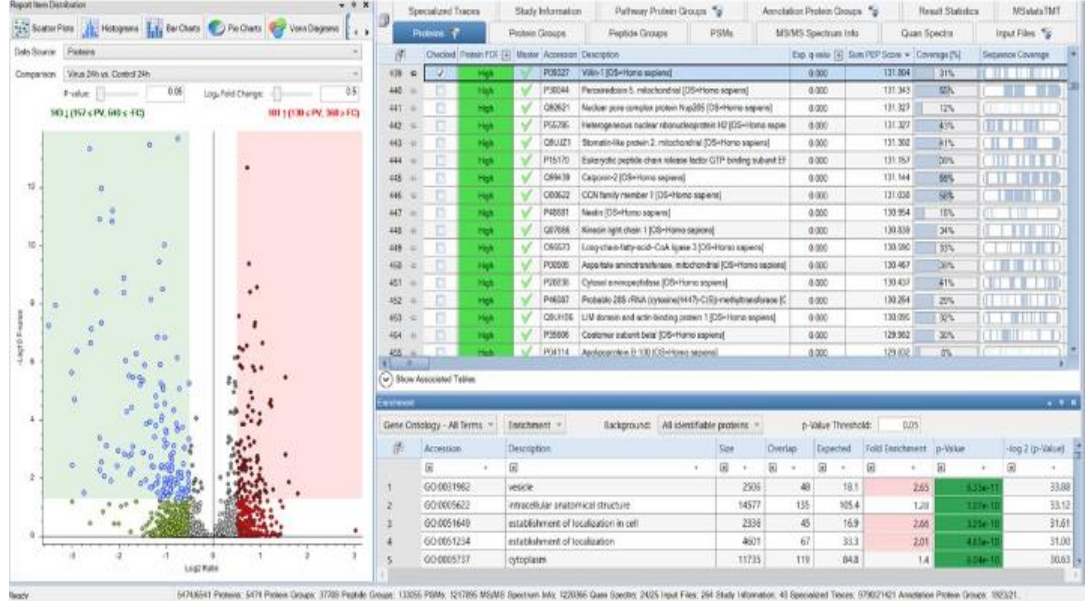


Şekil 3.6 Proteomiks çalışmaları kapsamında kullanılan Q-Exactive Plus High-Resolution Quadrupole-Orbitrap cihazı genel görüntüsü

3.2.7.3 Veri analizi

Shotgun proteomiks çalışmaları kapsamında LC-MS/MS'den elde edilen ham verilerin analizi Thermo Proteome Discoverer (sürüm 2.4.1.15) yazılım programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yazılım programının ara yüzü şekil 3.7'de sunulmuştur. Programda yer alan Sequest HT arama motoru kullanılarak Uniprot proteom veritabanına (Human proteome, Taxonomy ID: 9606) karşı bir protein/peptid tanımlama raporu oluşturulmuştur. MS ve MS/MS analizlerinde gerçekleştirilen tüm taramalar 10 ppm hata payı ile değerlendirilmiştir. Hem proteinlerin hem de peptidlerin tanımlanması için güven göstergeleri $\leq \%1$ (strict) ve $\leq \%5$ (relaxed) yanlış keşif oranı olarak eşiklenmiştir. Örneklerdeki protein tanımlaması için güven seviyesi “yüksek”, “pik bulundu” ve “bulunamadı” olarak netleştirilmiştir. Programda parçalayıcı enzim olarak tripsin seçilmiştir. Metiyonin oksidasyonu, asparajin ve glutamin deamidasyonu, sisteinlerin karbamidometilasyonu, lizin asetilasyonu, lizin metilasyonu, serin, treonin ve tirozin fosforilasyonu, metiyonin kaybı ve metiyonin kaybı ile asetilasyonu ise dinamik modifikasyonlar olarak seçilmiştir. Peptid doğrulaması, Thermo Proteome Discoverer (sürüm 2.4.1.15) programında bulunan Precursor Ions Quantifier ve Minora algoritması kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veri matrisleri aynı yazılım programı kullanılarak temel bileşen analizi (PCA) ve çok değişkenli istatistiksel analiz

yöntemleri ile değerlendirilmiş ve grupların ayrılmasında önemli olan proteinler tespit edilerek volkan grafikleri, venn diyagramları ve ısı haritaları oluşturulmuştur.



Şekil 3.7 Proteom discoverer yazılım programının ara yüzüne ait genel bir görüntü

3.2.8 Metabolomiks ve lipidomiks analizler

3.2.8.1 Metabolit/lipid ekstraksiyonu

Bir önceki aşamada elde edilen liyofilize sekretom örneklerinden öncelikli olarak metabolit ve lipid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla suda çözünen her numune gece boyunca 4 °C inkübe edilmiş ve ardından 11.000xg'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi takiben üst fazdan 200 µL alınarak mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerine kloroform:metanol (1:1; v/v) içeren çözücü karışımından 800 µL eklenmiş ve örnekler 60 saniye boyunca vortekslenmiştir. Ardından su ile seyreltme işlemi yapılarak tekrar 60 saniye vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir. 11.000xg'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj işlemi takiben üst faz metabolit analizinde alt faz ise lipid analizinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Lipidomiks analizleri için; lipid bileşiklerini içeren faz 4 °C'de azot akışı altında kurutulmuş ve 200 µL kloroform: metanol karışımı (2:1; v/v) kullanılarak hazırlanan 16:0 d31-18:1 fosfatidiletanolamin (10 µg/mL) ile sulandırılmıştır. Son olarak 1 dakika süresince vortekslenen numunelerden 100 µL alınmış ve LC-MS analizi için otomatik örnekleyici ortamına aktarılmıştır.

Metabolomiks analizleri için; metabolitleri içeren 200 µL faz üzerine 800 µL 1.6 mg/L dahili standart (internal) içeren ve önceden soğutulmuş olan kloroform:metanol (1:1, v/v) eklenmiştir. Dahili standartlar olarak; d5-L-triptofan, d4-sitrik asit, d10-lösin, d2-tirozin, d35-stearik asit, d5-benzoik asit, 13C2-glukoz ve d7-alanin kullanılmıştır. Ardından üst faz (200 µL) alınmış ve daha önce belirtildiği şekilde buharlaştırılarak kurutulmuştur. 200 µL % 0.1 formik asit içeren asetonitrilde çözülen örnekler analiz edilmek üzere HILIC tipi kolona aktarılmıştır.

3.2.8.2 Kromatografik analizler ve kütle spektrometre çalışmaları

Hedeflenmemiş metabolit ve lipid analizleri LC-MS/MS cihazında (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) farklı kolonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Fraser vd. 2012). Cihazın genel görüntüsü şekil 3.8'de sunulmuştur. Apolar ve yarı polar lipidler için C18 kolon kullanılırken, polar ve yarı polar metabolitler için HILIC kolonu kullanılmıştır. Lipidomiks analizler için örnekler 1.9 µm partikül boyutuna sahip 100 mm × 2.1 mm Thermo Hypersil Gold C18 kolona enjekte edilmiş ve 400 µL/dakika akış hızıyla 16 dakikalık bir gradyan üzerinden elüsyon gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak, suda hazırlanan % 0.1 formik asit (çözücü A) ve asetonitrilde hazırlanan % 0.1 formik asit (çözücü B) çözücülerini kullanılmıştır.

Metabolomiks analizler için örnekler 5 µm partikül boyutuna sahip 100 mm × 2.1 mm ZIC-PHILIC kolona enjekte edilmiş ve % 97 çözücü A (1 dakika), % 97-70 çözücü A (1-12 dakika), % 70-10 çözücü A (12-14.5 dakika) ve %10 çözücü A (14.5-17 dakika) arasında bir çözücü gradyanı kullanılarak 17 dakika boyunca elüsyon işlemine tabi tutulmuştur. Mobil faz olarak asetonitrilde hazırlanan % 0.1 formik asit (çözücü A) ve

suda hazırlanan 16 mM amonyum format (çözücü B) kullanılmıştır. Akış hızı 250 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8 Metabolomiks ve lipidomiks çalışmaları için kullanılan Q-Exactive Orbitrap cihazının genel görüntüsü

C18 ve HILIC kolonlarına enjekte edilen numuneler, elektrosprey iyonizasyon teknolojisine sahip Exactive Orbitrap™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) adlı yüksek çözünürlüklü bir kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Lipid analizi Q-Exactive kütle spektrometresi (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tam ve veriye bağlı MS2 (ddMS2) taramalarının her ikisi de profil veri toplama modunda toplanmıştır. Tam tarama modu için, maksimum 250 ms'lik bir tuzak dolun süresiyle m/z 200-2000 kütle aralığını kaydetmek üzere 35.000'lik bir kütle çözünürlüğü parametreleri kullanılmıştır. ddMS2, MS2 ölçümleri ayarlanmış bir pik yoğunluğu eşğine ulaşıldığında etkinleştirilmiştir. ddMS2 tarama modu için, maksimum 120 ms tuzak dolun süresi ile aynı kütle çözünürlüğü ayarı korunmuştur. Seçilen MS1 taramalarının izolasyon penceresi, normalleştirilmiş çarpışma enerjisi 30 ± 1.5 m/z olarak belirlenmiştir. Örnekler hem pozitif hem de negatif iyonizasyon modlarında ayrı ayrı analiz edilmiştir. Pozitif iyon modu parametreleri kapsamında 4 kV püskürtme voltajı, 275 °C kapiler sıcaklık, 90 V kapiler voltaj, 120 V tüp lens olarak kullanılmıştır. Negatif iyon modu parametreleri ise; -2.5 kV püskürtme voltajı, 275 °C kapiler sıcaklık, -90 V kapiler voltaj, -100 V tüp

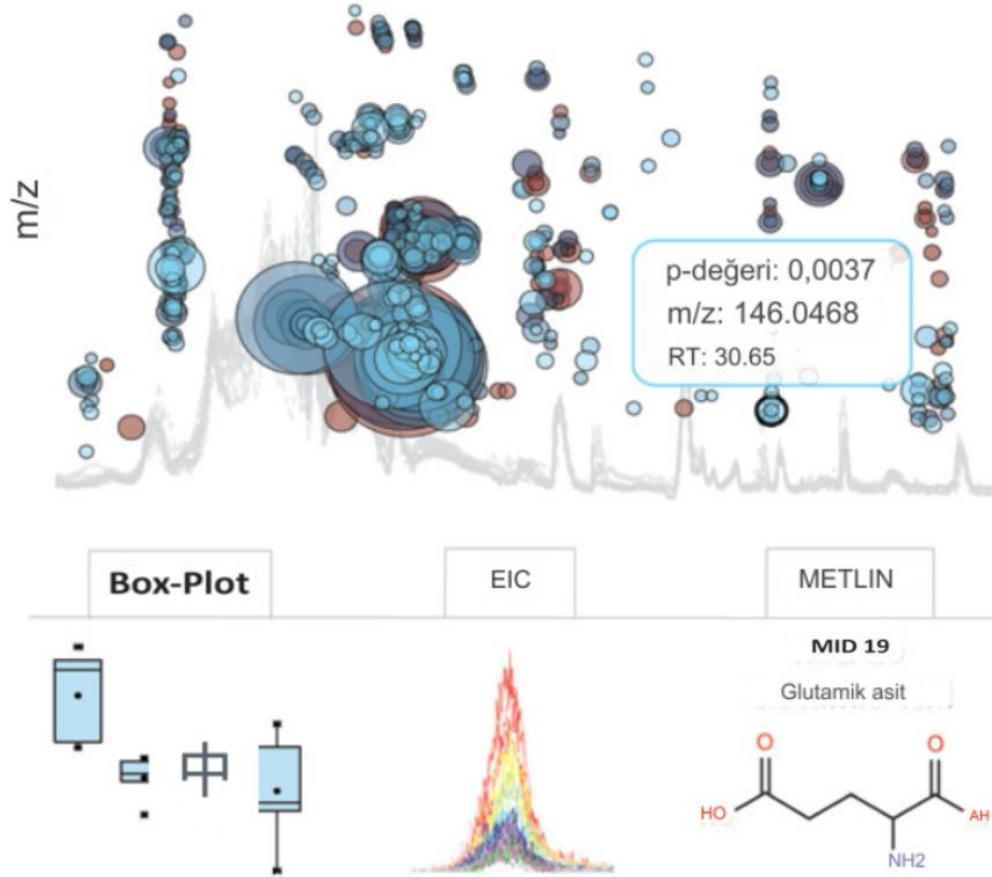
lens olarak ayarlanmıştır. Azot kaynak gazı desolvasyon ayarları tüm modlar (pozitif ve negatif) için değişmeden kullanılmıştır. Bu çalışma koşulları altında perdeleme gazı 40 mL/dakika, yardımcı gaz 10 mL/dakika, süpürme gazı ise 5mL/dakika olarak belirlenmiştir. Tüm bu parametreler üretici tarafından sağlanan Xcalibur yazılım paketi (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak oluşturulmuştur. Yöntemin validasyonu için her 10 numunede bir kalite kontrol numunesi enjekte edilmiştir. Dahili standardın alıkonma süresi, sinyal yoğunluğu ve kütle hatası çalışmalar sırasında sürekli olarak izlenmiştir. İyonizasyon modu (pozitif ve negatif) başına toplamda yaklaşık dört numuneye ait parçalanma verileri metabolit ve lipid iyonlarının/sınıflarının tanımlanması için kullanılmıştır.

3.2.8.3 Veri analizi

Hedeflenmemiş metabolit ve lipid analizlerin kapsamında MS analizini takiben elde edilen ham veri dosyaları (Thermo.raw dosyaları) ProteoWizard™ MSConvert işlevi kullanılarak mzXML dosyalarına dönüştürülmüştür (Holman vd. 2014). Pik tespiti, alıkonma süresi hizalaması, gruplama ve boşluk doldurma gibi işlemler XCMS R paketinde yer alan araçlara dayalı olarak uygulanmıştır (Smith vd. 2006). MS ve MS/MS analizleri kapsamında gerçekleştirilen tüm taramalar için 15 ppm pik tespiti, 3:15 pik genişliği, 0.02 kütle farklılığı ve 10 sinyal eşik değeri hata payı olarak değerlendirilmiştir. Alıkonma zamanı hizalaması, varsayılan parametrelerle “orbitrap” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekrar örneklerindeki pikler aynı bölgedeki sinyal entegrasyonunu içeren “chrom” yöntemiyle kontrol edilmiştir. Pik tabloları hata payı dikkate alınarak filtrelenmiş ve istatistiksel değerlendirme için kullanılmıştır (Cao vd. 2017). Analiz aşamasında geniş pikler değerlendirmeye alınmıştır. Bilinen bazı metabolitlerin pik şekli için HILIC, lipidler için C18 verileri uygulanmıştır. Son değerler Şekil 3.9’da arayüzü gösterilen XCMS Online metabolomics (xcmsonline.scripps.edu) yazılımına “.raw data” formatında yüklenmiştir.

Analizler kapsamına pozitif iyonlar olarak $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ve $[M+NH_4]^+$, negatif iyonlar olarak da $[M-H]^-$, $[M+FA-H]^-$ ve $[M+Cl]^-$ iyonları kullanılmıştır. Eklenti kimliğini kontrol etmek amacıyla potansiyel moleküler formülün izotopik

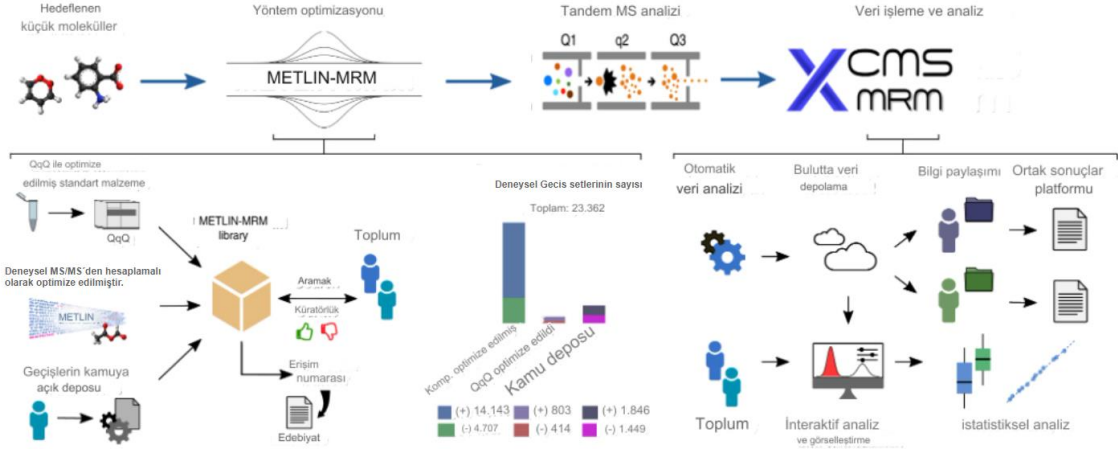
dağılımı incelenmiştir. Tanımlanan piklerin alıkonma süresinin (RT) eşleşmesi harici standartlara ve analiz içi ilgili kütüphanelere göre değerlendirilmiştir. QSRR (Kantitatif Yapı-Alıkonma İlişkisi) modeli HILIC ve C18'den elde edilen adayların RT'sini tahmin etmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.9 XCMS Online metabolomiks yazılımının ara yüzüne ait genel bir görüntü

Elde edilen veri matrisleri aynı yazılım programı kullanılarak temel bileşen analizi (PCA) ve çok değişkenli istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirilmiş ve grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve lipidler tespit edilerek molekül karşılaştırma ve dağılım analizleri, yoğunluk haritaları ve venn diyagramları oluşturulmuştur. Metabolit ve lipidlerle ilişkili biyo-yolaklarının keşfi içinse Metlin XCMS (Almanya) ve KEGG (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) yazılımı kullanılmıştır. Şekil 3.10'da özetlenen ve yukarıda detayları sunulan tüm aşamaları takiben elde edilen MS

verileri (mzxML olarak) ve meta veriler, çalışma tanımlayıcısı ile MetaboLights veritabanına yüklenmiş ve biyo-yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10 Metabolomik ve lipidomik çalışmalarda takip edilen veri analizinin özet iş akış şeması

3.2.9 İstatistiksel analizler

Bu araştırmanın tüm aşamaları, en az 3 teknik tekrar ve iki bağımsız biyolojik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Dunnett ve Tukey analizleri kullanılarak SPSS sürüm 22.0 (IBM, New York, NY, ABD) ve GraphPad Prism v.3.0 (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) yazılımlarıyla değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

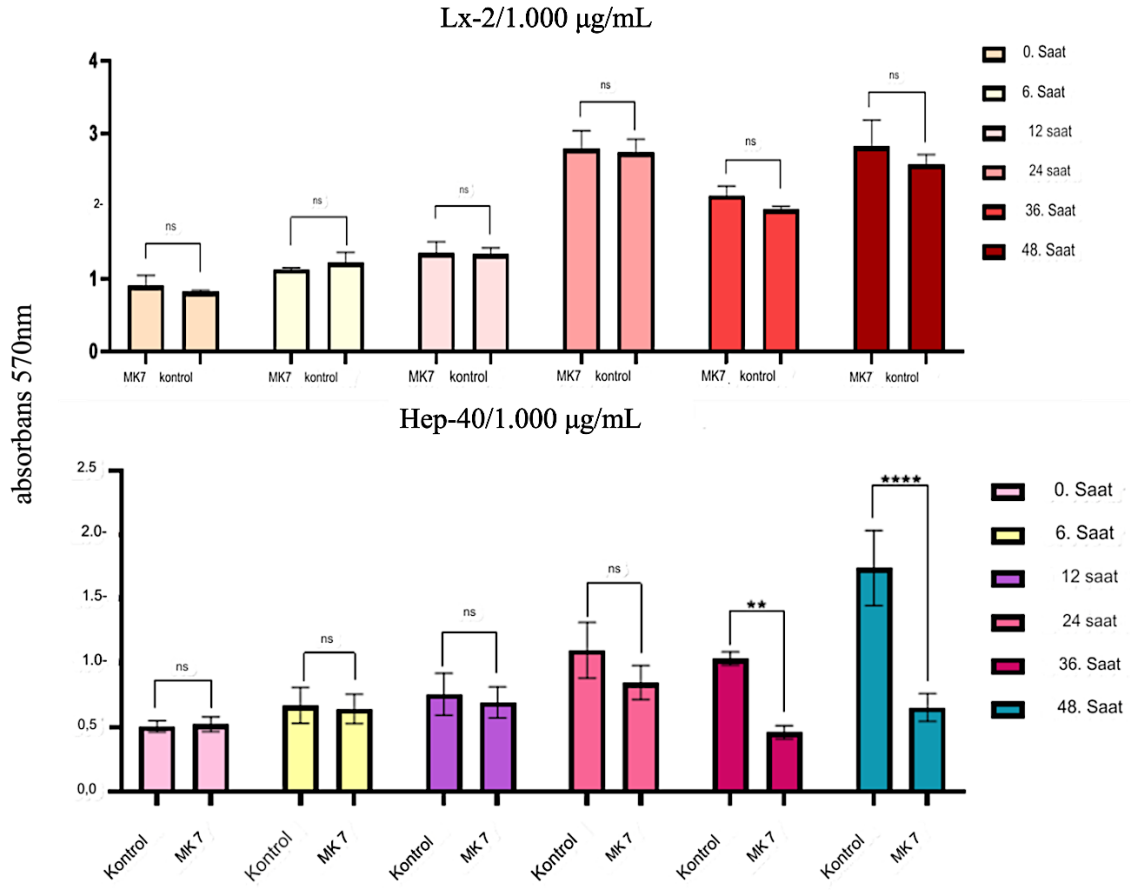
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Postbiyotiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

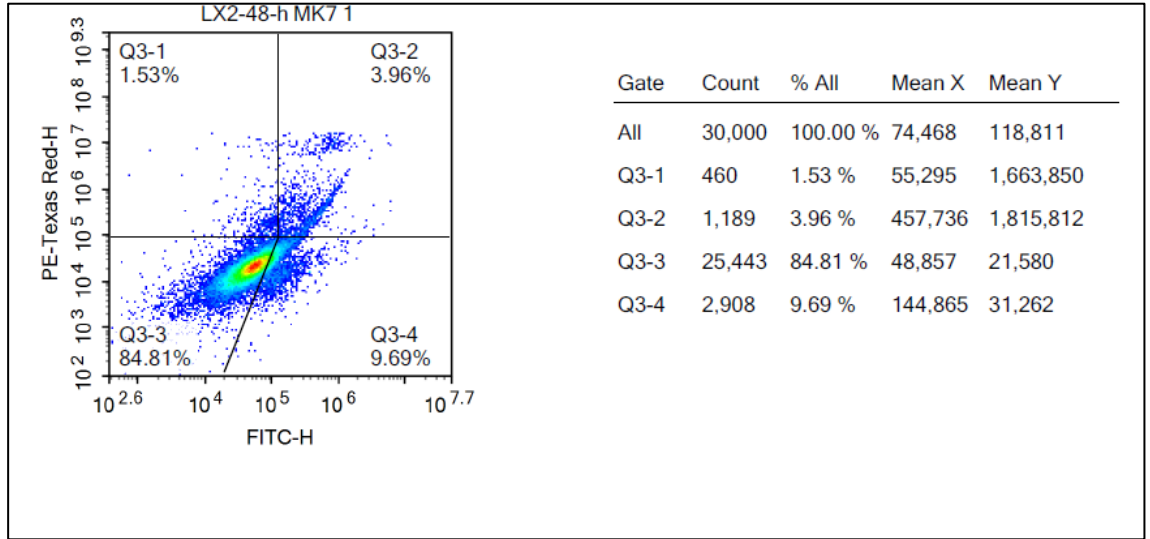
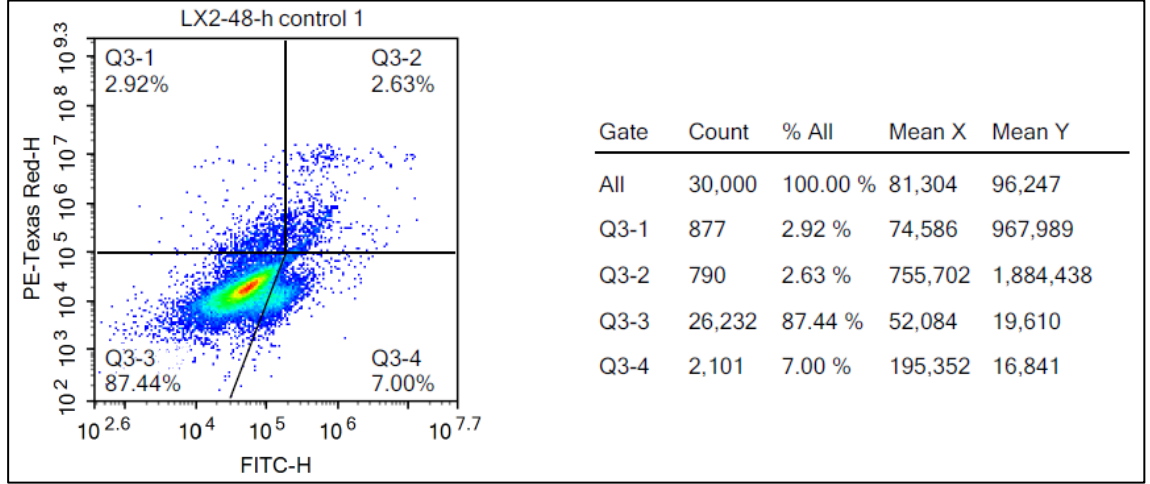
Bu tez çalışması kapsamında, deneysel olarak indüklenen karsinogeneze direnci ile önemli bir model organizma olarak kabul edilen ve eşsiz biyolojik karakteristikleri ile dikkat çeken kör köstebek faresi *Nannospalax xanthodon* bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Ligilactobacillus animalis* bakterisi tarafından üretilen postbiyotiklerin HSK üzerindeki anti-kanser etkisi küresel OMİKS yaklaşımları kullanılarak analiz edilmiştir. *Ligilactobacillus animalis* bakterisine ait postbiyotikler ise daha önceki çalışmalarımızda HSK hücre hatlarına karşı seçici sitotoksosite sergiledikleri için seçilmiştir (Zatari, 2022).

OMİKS çalışmalarına başlamadan önce, daha önceki çalışmalar neticesinde tespit edilen seçici anti-kanser aktivitenin doğrulaması yapılmıştır. Bu amaçla, postbiyotikler ile muamele edilen hücrelerin canlılığı MTT ile belirlenmiştir. 48. saate kadar kontrol olarak kullanılan Lx-2 hücrelerinde herhangi bir sitotoksosite gözlenmemiştir. Ancak, kullanılan postbiyotiklerin Hep-40 hücreleri üzerinde 36. saatten itibaren seçici sitotoksosite sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

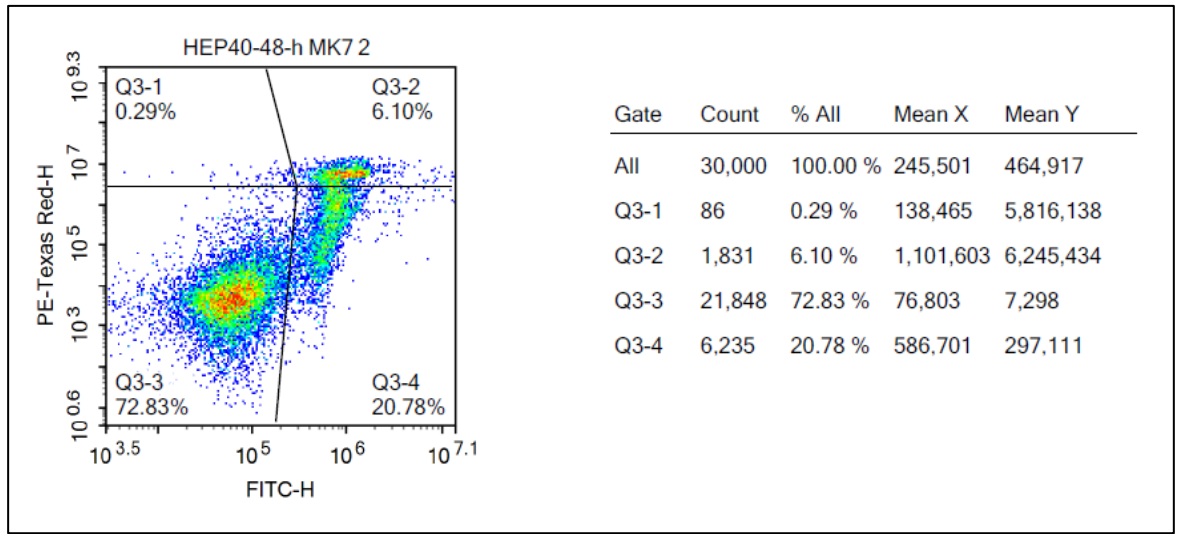
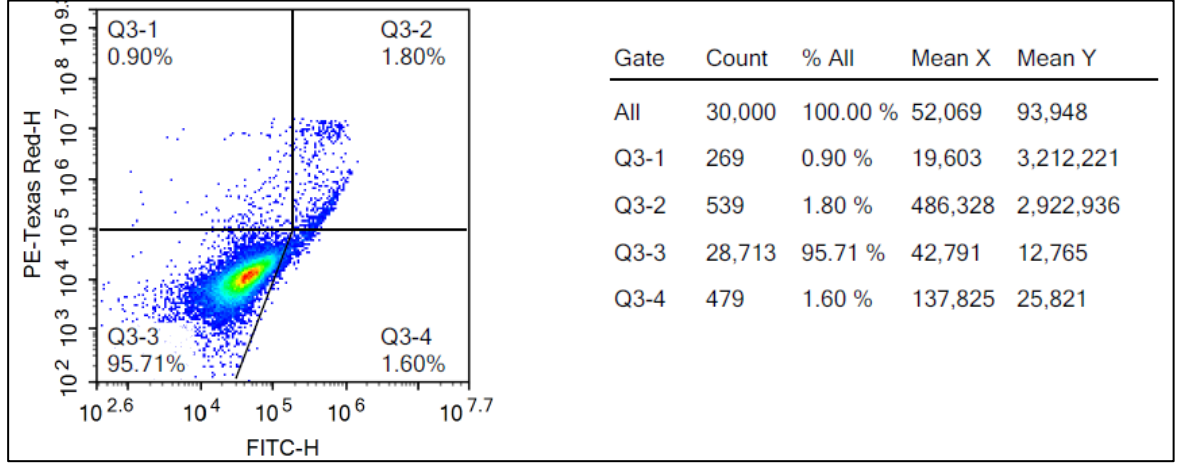
Tripan mavisi kullanılarak yapılan canlı hücre sayımlarında ise 48. saate postbiyotikler ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerinde 1.23×10^7 , muamele edilen hücrelerde 9.91×10^6 hücre sayılırken, postbiyotikler ile muamele edilmeyen Hep-40 hücrelerinde 1.05×10^7 , muamele edilen hücrelerde 8.29×10^5 hücre sayılmıştır. 48 saat inkübasyonu takiben canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri ise PI-Annexin kiti kullanılarak gerçekleştirilen boyamayı takiben akış sitometresi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler şekil 4.2-4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 48 saat inkübasyonu takiben farklı zaman aralıklarında hücre canlılığı MTT analiz sonuçları (Kontrol; postbiyotik içermeyen, MK-7; postbiyotik ile muamele edilen)



Şekil 4.2 48 saat inkübasyonu takiben postbiyotiklerle muamele edilmeyen ve edilen Lx-2 hücrelerine ait canlı (sol alt quadran) ve apoptotik (sağ alt ve sağ üst quadran) hücre yüzdelerini gösteren akış sitometre diyagramları

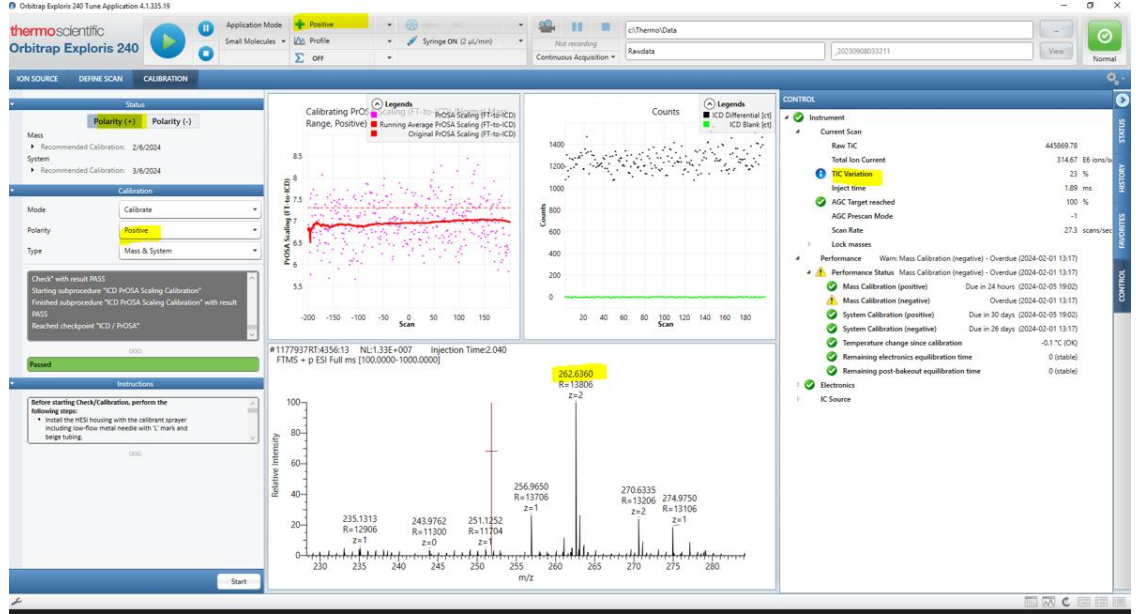


Şekil 4.3 48 saat inkübasyonu takiben postbiyotiklerle muamele edilmeyen ve edilen Hep-40 hücrelerine ait canlı (sol alt kvadrant) ve apoptotik (sağ alt ve sağ üst kvadrant) hücre yüzdelerini gösteren akış sitometre diyagramları

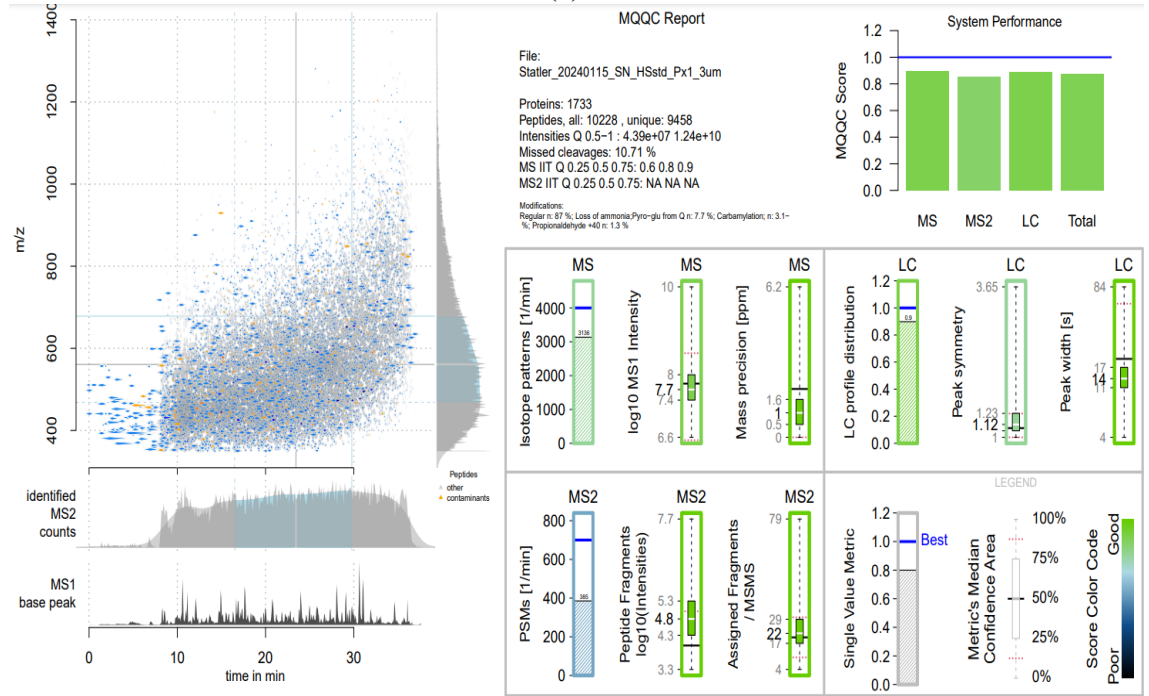
4.2 Proteomiks Analizi Neticesinde Elde Edilen Genel Sonuçlar

Postbiyotiklerin, postbiyotiklerin elde edildiği ticari besiyerinin, postbiyotiklerle 48 saat muamele edilen ve edilmeyen hücrelere ait sekretomlar ile hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinin protein profilleri Shot-gun proteomiks çalışmaları neticesinde değerlendirilmiştir. Birleştirilmiş peptit tanımlamaları, peptit düzeyinde tanımlama amacıyla “Protein Discoverer” yazılımına aktarılmıştır. Exploris 480 Orbitrap LC-MS/MS (ThermoScientific, ABD) analizleri sonrasında kütüphane oluşturulmuştur. Veriler MaxQuant sürüm 1.6.3.4 (ThermoScientific, ABD) yazılımı kullanılarak

kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Analiz öncesinde sistem doğrulanması ve kalibrasyonu yapılmıştır. Bu sürece ait ekran görüntüsü şekil 4.4’de sunulmuştur.



(a)



(b)

Şekil 4.4 Proteomiks analizi öncesi cihaz kalibrasyonuna (a) sprey kararlılığı ve ölçüm doğruluğuna (b) yönelik sonuçların ekran görüntüsü

Çalışılan numune isimleri ProteoDiscoverer (ThermoScientific, ABD) programına çizelge 4.1’de belirtildiği şekilde tanıtılmıştır.

Çizelge 4.1 Omiks çalışmalarına dahil edilen numunelerin isimleri ve kodları

Hep-40’ın besiyeri	Blank (Kör)
Hep-40’ın MK7 ile muamele edilmemiş hali	Hep-40
Hep-40’ın MK7 ile muamele edilmiş hali	Hep40_MK7
Lx-2’nin besiyeri	Blank (Kör)
Lx-2’nin MK7 ile muamele edilmemiş hali	LX2 cells
Lx-2’nin MK7 ile muamele edilmiş hali	LX2 cells treated with MK7
MK7’nin besiyeri (MRS-B)	Blank (Kör)
MK7	MK7

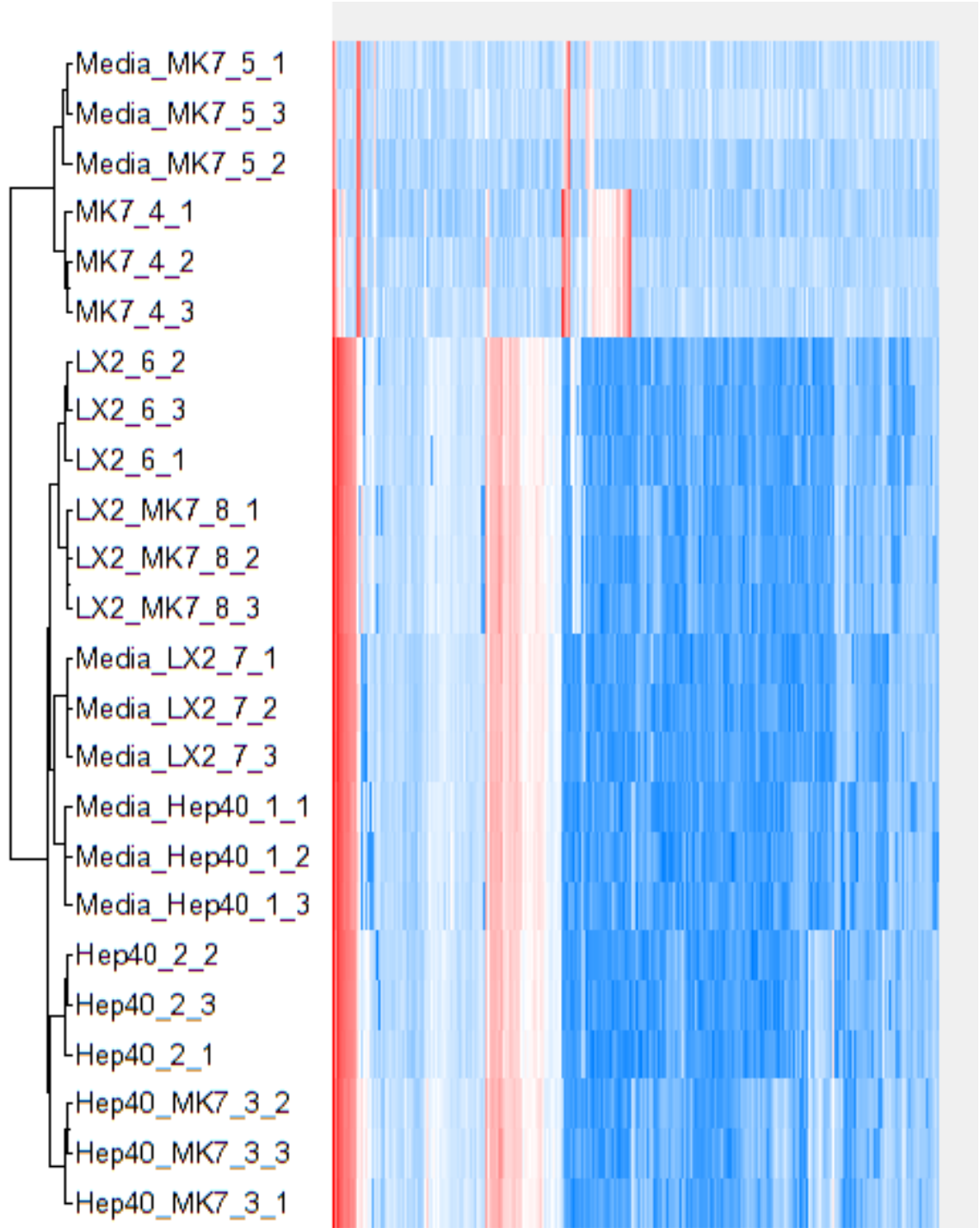
MK7: Postbiyotik kodu

Her bir numune grubu için 3 tekrarlı yapılan analizler neticesinde örneklerde tespit edilen protein sayıları çizelge 4.2’de sunulmuştur. Elde edilen veriler neticesinde en yüksek protein sayısı, postbiyotikler ile muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunda tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm proteinler için z skoru temel alınarak genel bir kümeleme yapılmış ve yoğunluk ısı haritaları oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Z-skoru, sayısal veriler üzerinde uygulanan ve değerlerin ortalamaya göre konumunu betimleyen puanlar olup basit bir dönüşüm sonucu olarak elde edilmektedir. Genelde ortalama ölçüsü için basit aritmetik ortalama, değişkenlik için de standart sapma değerleri hesaplanmaktadır. Mavi sütunlar negatif sapmayı (farklılıkları), kırmızı sütunlar ise pozitif sapmayı (benzerlikleri) belirtmektedir. Elde edilen veriler neticesinde tüm tekrarlar aynı sınıfta toplanırken, postbiyotik proteinleri hücre sekretom proteinlerinden farklı bir profil sergileyerek ayrı bir yerde kümelenmiştir.

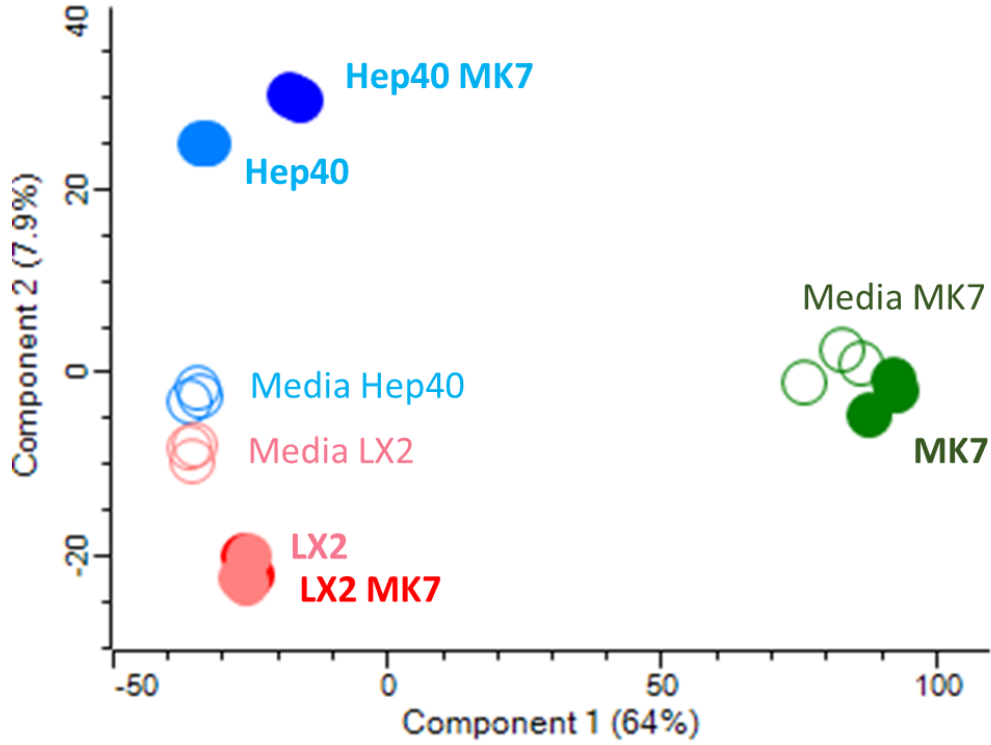
Çizelge 4.2 Numunelerde tespit edilen protein sayıları (3 tekrar)

Numunenin İsmi	Tanımlanan Protein Sayısı	Ortalama Protein Sayısı
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (1. tekrar)	45	45
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (2. tekrar)	46	
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (3. tekrar)	44	
Postbiyotik (MK-7) (1. tekrar)	128	128
Postbiyotik (MK-7) (2. tekrar)	128	
Postbiyotik (MK-7) (3. tekrar)	127	
Lx-2 kültür besiyeri (1. tekrar)	477	477
Lx-2 kültür besiyeri (2. tekrar)	477	
Lx-2 kültür besiyeri (3. tekrar)	478	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	511	512
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	512	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	513	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	517	518
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	520	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	517	
Hep-40 kültür besiyeri (1. tekrar)	480	479
Hep-40 kültür besiyeri (2. tekrar)	477	
Hep-40 kültür besiyeri (3. tekrar)	481	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	544	548
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	550	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	550	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	624	624
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	625	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	624	



Şekil 4.5 LFQ (Label Free Quantitation of Proteins) yoğunluk ısı haritası

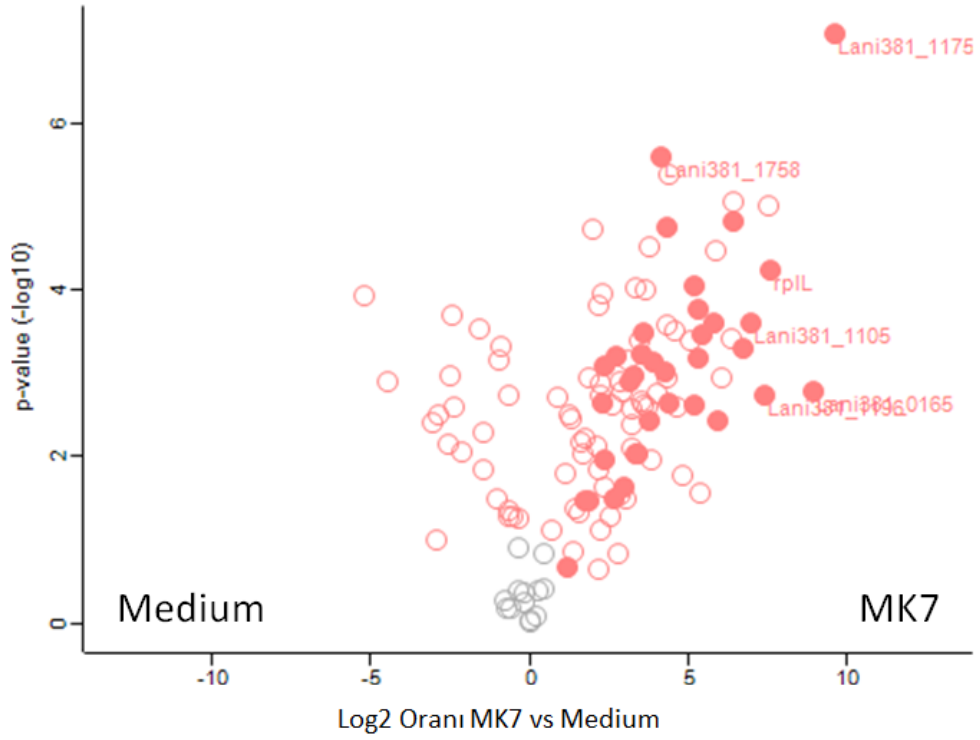
Elde edilen veriler neticesinde analiz edilen tüm örneklerdeki proteinler temel alınarak hazırlanan PCA grafiği şekil 4.6’da sunulmuştur. PCA hesaplamasına göre, tüm gruplar kendi arasında kümelenmiş olup, en farklı protein kümelenmesine postbiyotikler ile muamele edilen Hep-40 sekretom profillerinde rastlanmıştır.



Şekil 4.6 Protein dağılımının kümelenmesini gösteren genel PCA grafiği

4.2.1 Postbiyotiklere ait protein profili

Postbiyotikler ile MRS-B besiyerinde tespit edilen protein dağılımına ait volkan grafiği şekil 4.7’de, proteinlerin listesi ise çizelge 4.3’de sunulmuştur.



Şekil 4.7 Postbiyotik ile MRS-B besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği

Çizelge 4.3 Postbiyotiklerde tespit edilen proteinlere ait bilgiler

No	Protein ID	Gen ismi	Protein ismi
1	A0A062WY81	Lani381_1716	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIA component
2	A0A062WY815	Lani381_1715	PQQ-dependent catabolism-associated beta-propeller protein
3	A0A062WZG8	Lani381_1322	Rib/alpha/Esp surface antigen repeat protein
4	A0A062WZG81	Lani381_1321	Catabolite control protein A, ccpA
5	A0A062X094	pfkA	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
6	A0A062X0K6	rpe	Ribulose-phosphate 3-epimerase
7	A0A062X0N4	greA	Transcription elongation factor GreA
8	A0A062X103	rpmC	Large ribosomal subunit protein uL29
9	A0A062X112	rplO	Large ribosomal subunit protein uL15
10	A0A062X248	Lani381_0225	DNA sulfur modification protein DndD, dndD
11	A0A062X249	Lani381_0227	Putative metal-dependent protease of the PAD1/JAB1 superfamily
12	A0A062X268	Lani381_0245	Uncharacterized protein

Çizelge 4.3 Postbiyotiklerde tespit edilen proteinlere ait bilgiler (devam)

13	A0A062X2D8	Lani381_0320	ABM domain-caintaining protein
14	A0A062X2Y1	Lani381_0091	Choloylglycine hydrolase
15	A0A062X347	Lani381_1758	Fructose-bisphosphate aldolase
16	A0A062X383	Lani381_1692	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
17	A0A062X4P7	Lani381_1175	Sortase
18	A0A062X4T8	Lani381_1105	Phosphocarrier protein
19	A0A062X6B4	Lani381_0724	Rib/alpha surface antigen repeat protein
20	A0A062X712	pgi	Glucose-6-phosphate isomerase
21	A0A062X790	Lani381_1430	Peptidase S8/S53 domain-containing protein
22	A0A062X792	Lani381_1432	Peptidoglycan hydrolase
23	A0A062X7M0	Lani381_0165	Spore coat assembly protein SafA
24	A0A062X8P0	Lani381_1196	Chromosome segregation protein SMC
25	A0A062X8Y9	rplL	Large ribosomal subunit protein bL12
26	A0A062X933	Lani381_1799	Thioredoxin, trxA
27	A0A062X9I8	Lani381_1433	Spore coat assembly protein SafA
28	A0A062XA95	Lani381_0725	coenzyme a biosynthesis bifunctional protein
29	A0A062XA95	Lani381_0725	Rib/alpha/Esp surface antigen repeat protein
30	A0A062XB29	Lani381_1112	Daunorubicin resistance ABC transporter, ATP-binding protein
31	A0A062XB79	Lani381_1157	Spore coat assembly protein SafA
32	A0A062XBH9	Lani381_1684	Cysteine desulfurase, SufS family, sufS
33	A0A062XBH9	Lani381_1684	Cysteine desulfurase, SufS family, sufS
34	A0A062XCD8	infA	Translation initiation factor IF-1
35	A0A062XCD9	infA2	ABC exporter ATP-binding subunit, DevA family
36	A0A062XCI9	Lani381_0887	Lipoprotein SmpA/OmlA domain-containing protein
37	A0A062XCI9	Lani381_0887	Lipoprotein SmpA/OmlA domain-containing protein
38	A0A062XCP5	rpmA	Large ribosomal subunit protein bL27
39	A0A062XCS5	Lani381_0952	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit E, gatE
40	A0A062XD62	rpsP	Small ribosomal subunit protein bS16
41	A0A062XD64	rpsP3	Uncharacterized protein
42	A0A062XDM6	rpmD	Large ribosomal subunit protein uL30
43	A0A062XEB4	Lani381_0114	5,6-dimethylbenzimidazole synthase, bluB
44	A0A062XEQ0	Lani381_0229	Single-stranded DNA-binding protein
45	A0A0A0MP92	SERPINA3-7	Endopin 2
46	A0A0A0MPA0	LOC784932	Serpin domain-containing protein
47	A0A0A0MSI0	PRDX1	Peroxioredoxin-1

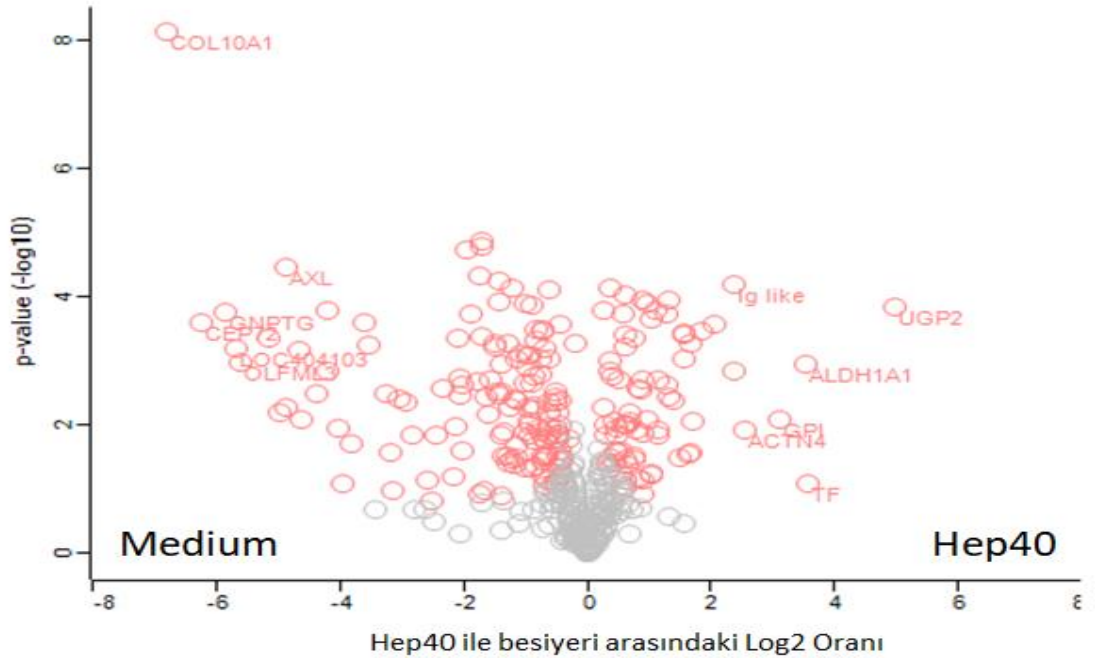
Çizelge 4.3 Postbiyotiklerde tespit edilen proteinlere ait bilgiler (devam)

48	A0A0U1RQF0	FASN	Fatty acid synthase
49	A0A140T897	ALB	Albumin
50	A0A140T8D4	LGMN	Legumain
51	A0A3Q1LJB2	KRT13	IF rod domain-containing protein
52	A0A3Q1LYQ9	MYH1	Myosin heavy chain 1
53	A0A3Q1MM92	XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase
54	A0A3S5ZPW7	XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase
55	A0A6Q8PGD7	ACTB	Actin beta
56	A0A7I2V3H3	EEF1A1	Uncharacterized protein
57	A0A7P0Z497	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
58	A0JNP2	SCGB1D	Secretoglobin family 1D member
59	B0YJC4	VIM	Vimentin
60	C9J0E4	CSTA	Cystatin A
61	C9JKG1	BGN	Biglycan
62	CH60_CAMJE	groEL	Chaperonin GroEL
63	CON_Q05443	LUM	Uncharacterized protein
64	F1MN80	WTAP	WT1 associated protein
65	F1MUT3	XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase
66	F1N5M2	GC	Vitamin D-binding protein
67	F6QIC1	TNNI2	Troponin I, fast skeletal muscle
68	G5E6M1	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor
69	O14455	RPL36B	Large ribosomal subunit protein eL36B
70	O14545	TRAFD1	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1
71	P00359	TDH3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3
72	P00424	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial
73	P00447	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
74	P00560	PGK1	Polymeric immunoglobulin receptor
75	P01833	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor
76	P01834	IGKC	Immunoglobulin kappa constant
77	P01966	HBA	Hemoglobin subunit alpha
78	P02070	HBB	Hemoglobin subunit beta
79	P02081	LOC107131172	Hemoglobin fetal subunit beta
80	P02453	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain
81	P02458-1	COL2A1	Collagen alpha-2 chain
82	P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14
83	P02663	CSN1S2	Alpha-S2-casein

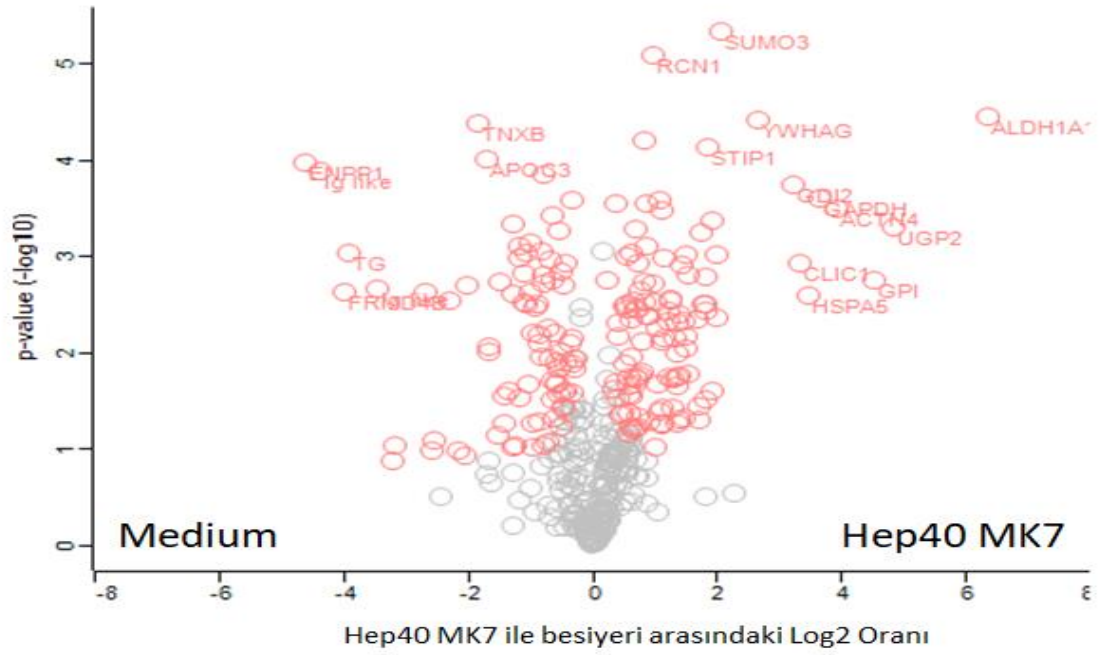
*pembe renk ile işaretlenenler fazla ifade edilen proteinleri temsil etmektedir.

4.2.2 Hücre sekretomlarına ait protein profili

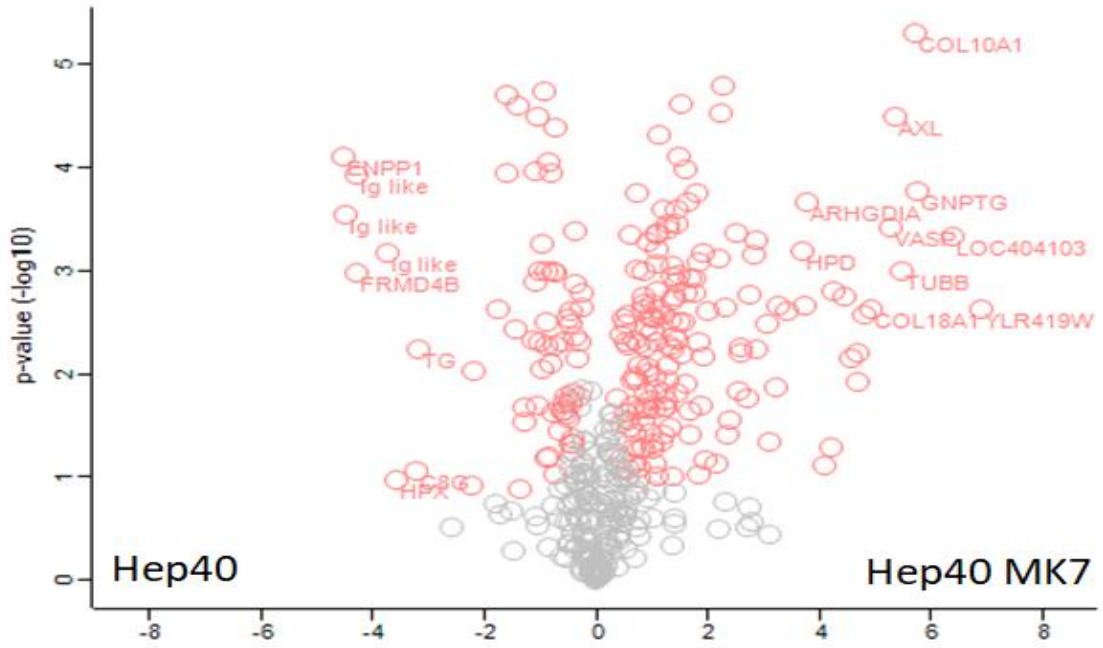
Postbiyotikler ile muamele edilen ve edilmeyen hücre sekretom protein içeriklerinin hücre kültüründe kullanılan temel besiyeri protein içerikleri ile karşılaştırıldığı volkan grafikleri şekil 4.8 ve 4.13’de sunulmuştur. Postbiyotiklerle muamele edilmiş ve edilmemiş Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen protein içerikleri ve farklılıklarına ait yoğunluk ısı grafiği şekil 4.14’de, Lx-2 hücre sekretomları içinse şekil 4.15’de sunulmuştur. Elde edilen tüm veriler, venn diyagramı olarak düzenlenmiş ve postbiyotiklerle muamele edilmiş Hep-40 hücre sekretomunun 172 adet farklı protein içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.16). Sekretomlarda tespit edilen proteinler besiyeri ve postbiyotiklerde bulunan proteinlere karşı filtrelenmiş (Fold Change abs > log of 2) ve sadece postbiyotiğin Hep-40 hücrelerinde üretimini teşvik ettiği proteinler tespit edilmiştir (Çizelge 4.4 ve 4.5). Bu proteinlerin anti-kanser yollarla ilişkisi ise Reactome Proteom Pathway (Reactome, ABD) ve ProteomDiscoverer (ThermoScientific, ABD) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Anti-kanser yolak ilişkili proteinlerin muhtemel yolları ise şekil 4.17-4.25’de sunulmuştur.



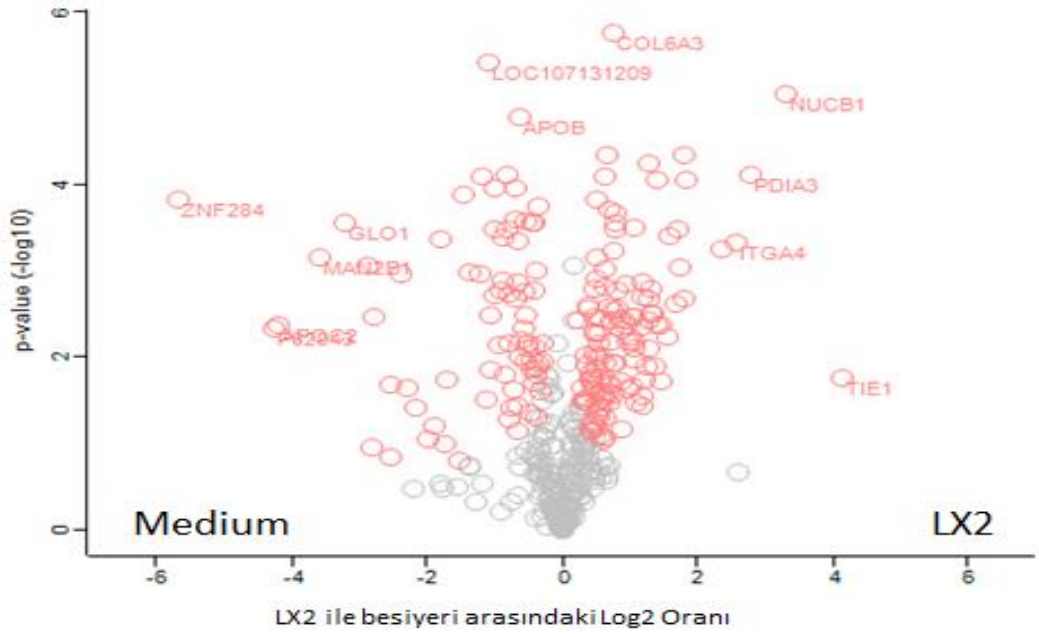
Şekil 4.8 Postbiyotik ile muamele edilmeden Hep-40 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği



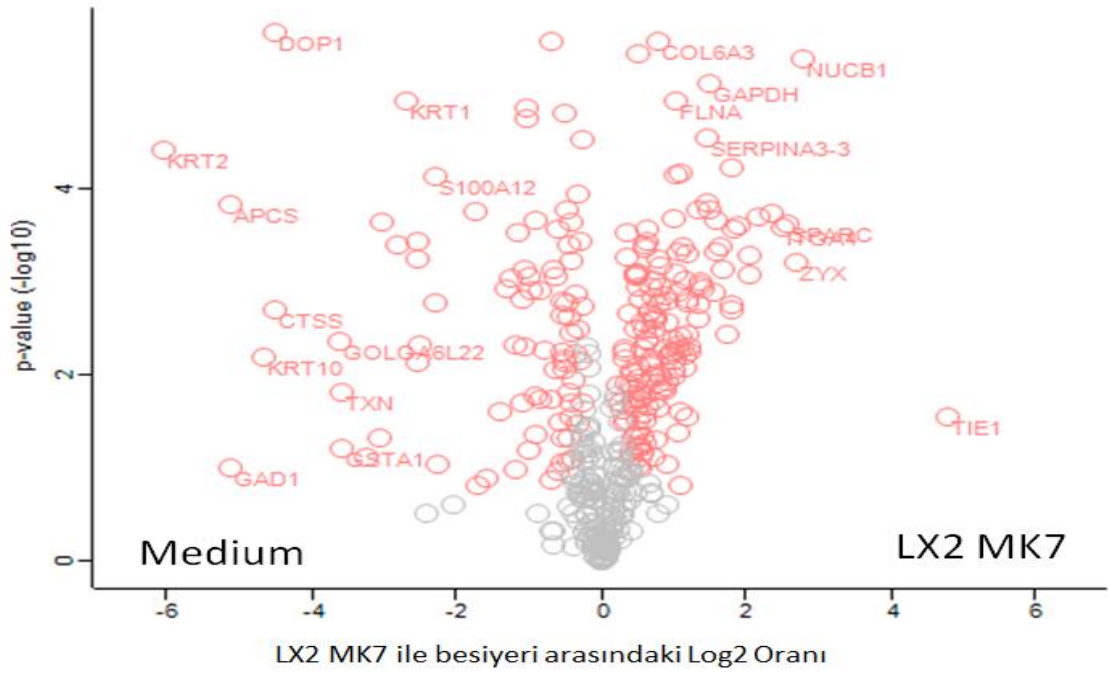
Şekil 4.9 Postbiyotik ile mumale edilen Hep-40 hücre sekretomu ile besiyeri protein dağılımına ait volkan grafiği



Şekil 4.10 Postbiyotik ile mumale edilen Hep-40 hücre sekretomu ile edilmeyen Hep-40 hücre sekretomuna ait protein dağılımına ait volkan grafiği

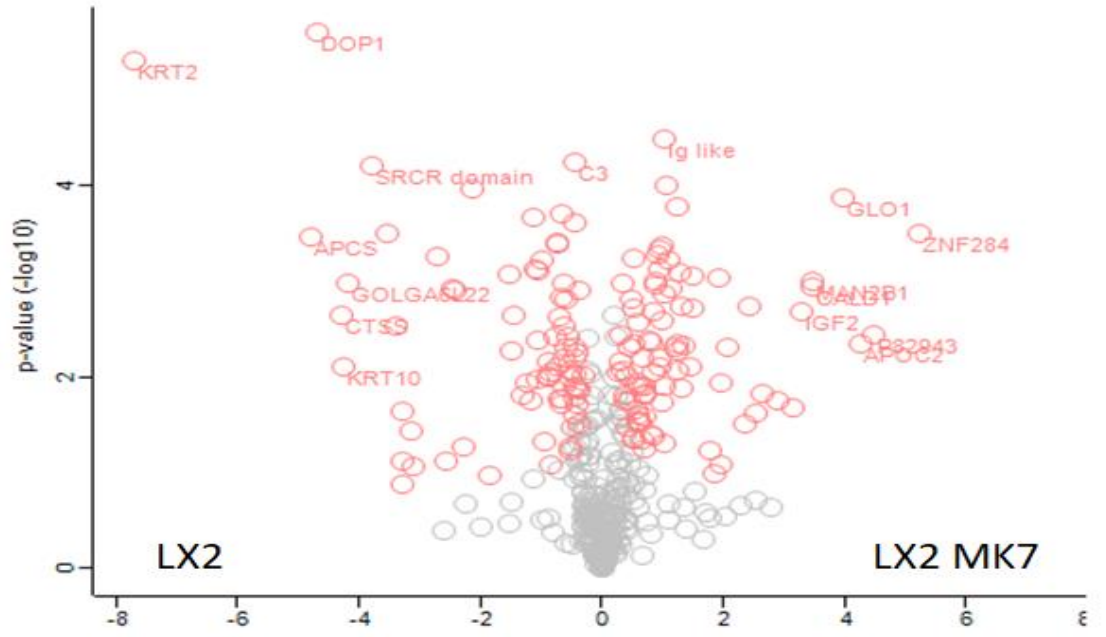


Şekil 4.11 Postbiyotik ile mumale edilmeyen Lx-2 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği

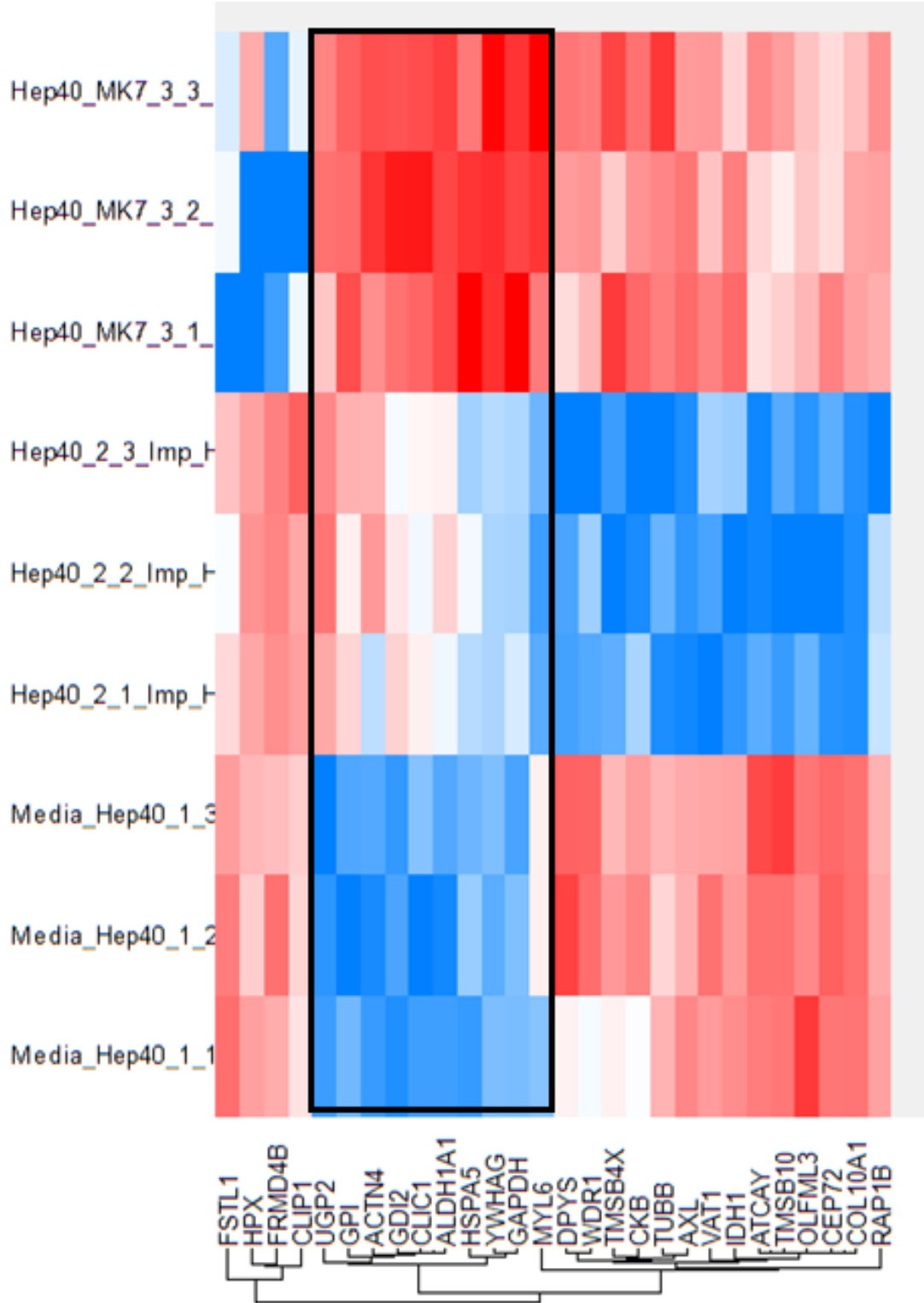


(b)

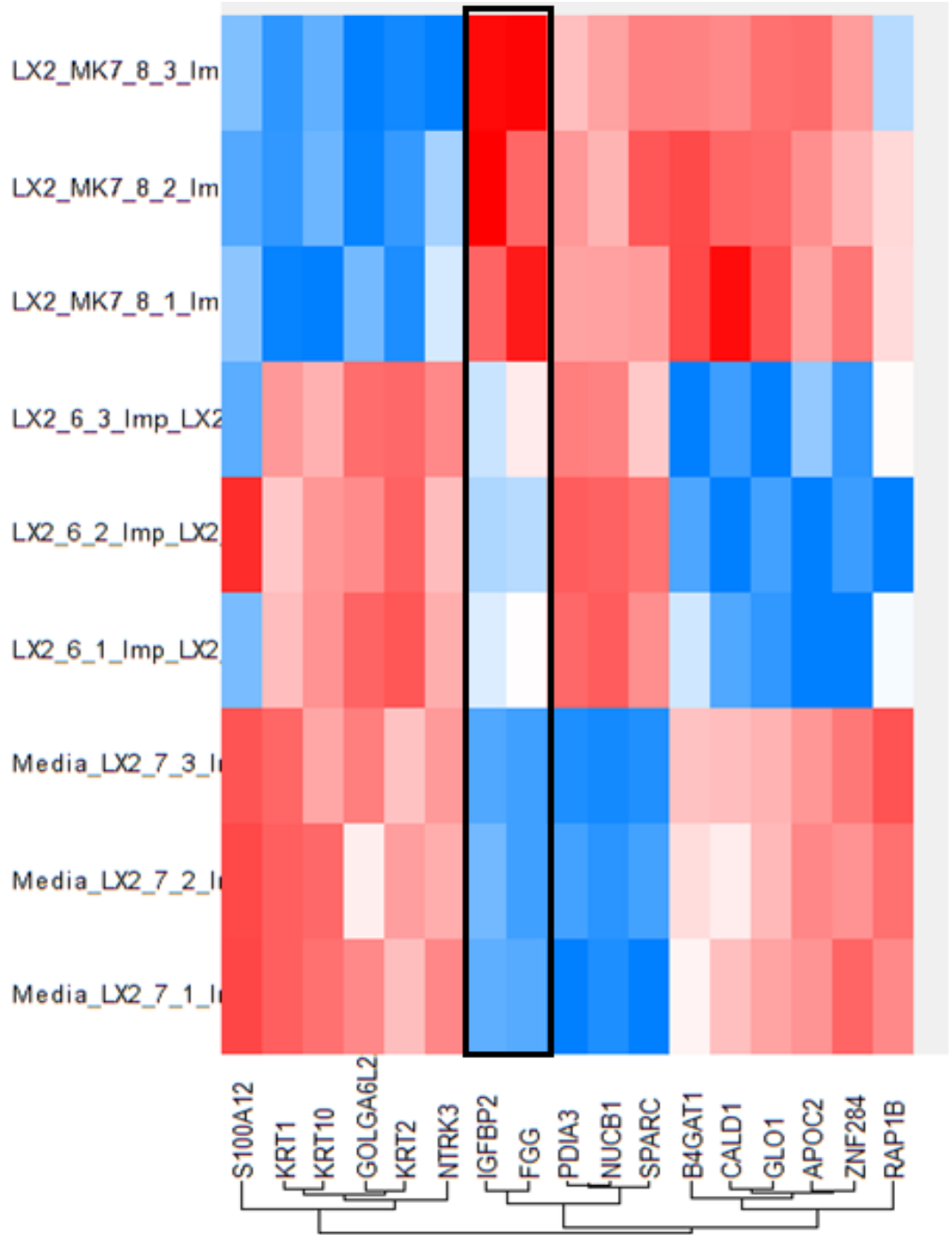
Şekil 4.12 Postbiyotik ile mumale edilen Lx-2 hücre sekretomu ile besiyerinde bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği



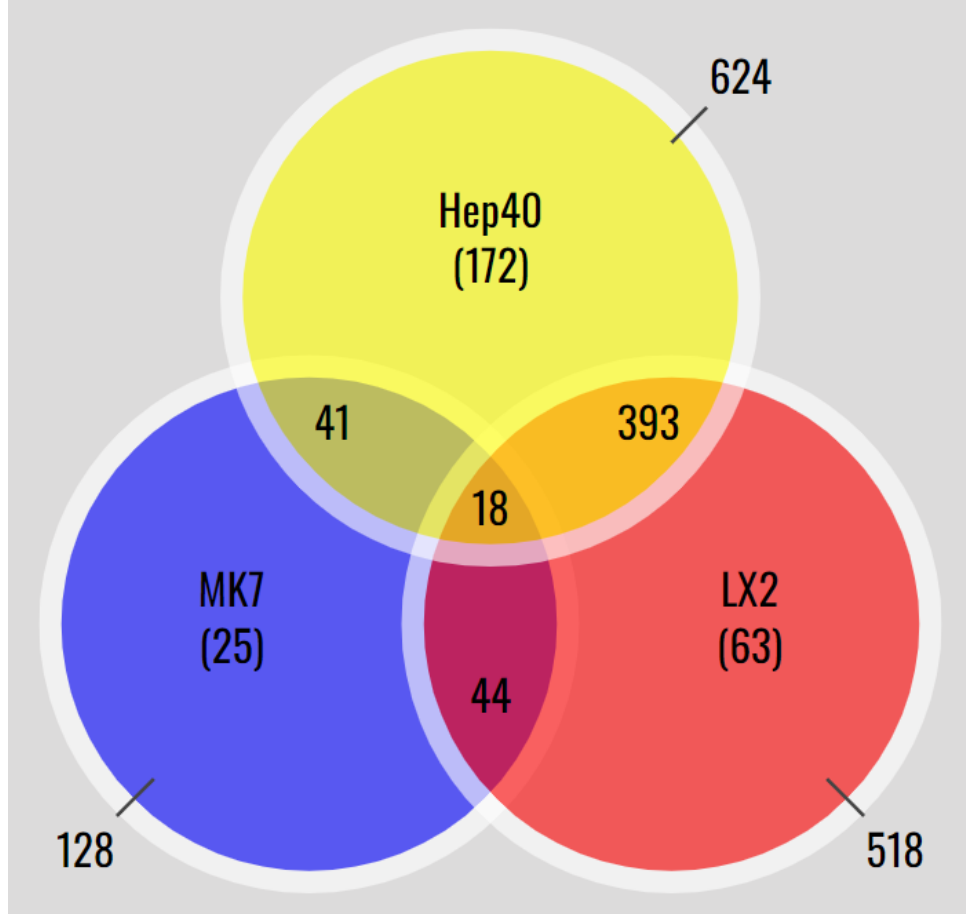
Şekil 4.13 Postbiyotik ile mumale edilen Lx-2 hücre sekretomu ile edilmeyen Lx-2 hücre sekretomunda bulunan protein dağılımına ait volkan grafiği



Şekil 4.14 Postbiyotiklerle muamele edilmiş ve edilmemiş Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen protein içerikleri ve farklılıklarına ait yoğunluk ısı grafiği



Şekil 4.15 Postbiyotiklerle muamele edilmiş ve edilmemiş Lx-2 hücre sekretomlarında tespit edilen protein içerikleri ve farklılıklarına ait yoğunluk ısı grafiği



Şekil 4.16 Tespit edilen protein sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı

Çizelge 4.4 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen proteinleri kodlayan gen listesi

Gen İsmi		
ACTB	ENO1	PCBP1
ACTN4	ERP29	PCBP2
AHCY	FAM3C	PDCD5
AK2	FASN	PCBP3
ALB	FLNB	PFN1
BRCA1	GANAB	PLTP
ALDOA	RAN	PLXNA1
AMBP	GDI1	PRCP
ANP32E	GDI2	PRDX1
API5	GLOD4	PSAP
APOA1	GPI	PSAT1
APOA1BP	GPRIN1	PTMA
APOC4	GSR	PTPRK
APOE	GSTA3; GSTA2; GSTA1	PZP
APOH	H3F3B; H3F3A; HIST2H3A	QDPR
APRT	HIST1H1C; HIST1H1E; HIST1H1D	GSP1; GSP2
ARPC4-TTLL3; ARPC4	HMGB1; HMGB1P1	RAP1A

Çizelge 4.4 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomlarında tespit edilen proteinleri kodlayan gen listesi (devam)

BRCA2	HNRNPC	ROBO4
B2M	HNRPA2B1; HNRNPA2B1	RPL11
BHMT	HSP90AA1	RPL13
C1QTNF3-AMACR; C1QTNF3	HSP90AB1	RPL7
C5	HSP90B1	RPLP1
CCT2	HSPA5	RPLP2
CCT3	HSPA8	RPS16
CCT8	HSPA9	RPS2
CDH11	HSPB1	TPM2b
CEP72	HSPD1	S100A9
CFI	HSPE; HSPE1-MOB4	SERPINA1
CFL1	IGFBP2	SFPQ
CHGA	IGFBP7	SOD1
CILP	IPO5	SPON1
CKB	KCTD12	ST13; ST13P4; ST13P5
CLIC1	RPL40B	STIL
CLSPN	NME2P1	STIP1
CLU	LAMB1	TAGLN2
COL12A1	LCP1	TBCA
COL4A2	LDHA	TCP1
COL6A1	LGALS3BP	TF
COTL1	LMNA	TKT
CPVL	LRP1	TMSB4X
CSE1L	LSM5	TPI1
CST3	MAPRE1; MAPRE3	TPM2
CYCS	MARCKS	TPM4
DBI	MDH1	TPT1
DCD	MDH2	TUBA1B
DDT	MDK	TUBB
DDX39B; DDX39A	MEGF10	TUBB4B; TUBB4A; TUBB2B
DPYS	NAP1L1	PABPC1
DPYSL3	NCL	UBA1
EEF1A1; EEF1A1P5	NELL2	UBB; RPS27A; UBC; UBA52
EEF1B2	NME1	UBE2I
EEF1G	NME2;NME2P1	UCHL1
EEF2	NOTCH3	WDR1
EFHD2;EFHD1;PP1187	NPM1	YWHAE
EIF5A2;EIF5A;EIF5AL1	NSD1	YWHAG; YWHAB
PARK7	NTRK3	YWHAH
PARP1	OGN	HPD
PAICS	OIT3	

*sarı renk ile işaretlenenler fazla ifade edilen proteinleri temsil etmektedir.

Çizelge 4.5 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında fazla ifade edilen proteinleri kodlayan gen isimleri ve ilişkili biyolojik yolları

Gen İsmi	Stabil Tanımlayıcısı	Bulunduğu Yolak Lokasyonu	Alt Lokasyonları
ACTN4	R-HAS-390558	Hücre-Hücre İletişimi (<i>Homo sapiens</i>)	Adherens Kavşağı ile İlişkili Proteinler
ALB	R-HSA-8956690	Protein Metabolizması (<i>Homo sapiens</i>)	Post-translasyonel Protein Modifikasyonu, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Taşınmasının Düzenlenmesi
BRCA1	R-HSA-71688	Hücre Döngüsü, DNA Tamiri, Üreme (<i>Homo sapiens</i>)	DNA Çift İplik Kırılması Onarımı, Mayoz Bölünme
ALDOA	R-HSA-71492	Metabolizma (<i>Homo sapiens</i>)	Karbonhidrat Metabolizması
APOA1	R-HSA-8956724	Protein Metabolizmi (<i>Homo sapiens</i>)	Post-translasyonel Protein Modifikasyonu, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Taşınmasının Düzenlenmesi
BRCA2	R-HSA-50951	Hücre Döngüsü, DNA Tamiri, Üreme (<i>Homo sapiens</i>)	DNA Çift İplik Kırılması Onarımı, Mayoz Bölünme
CDH11	R-HSA-418979	Hücre-Hücre İletişimi (<i>Homo sapiens</i>)	Hücre Bağlantı Organizasyon
CFL1	R-HSA-350751	Gelişim Biyolojisi, Hemostaz, Bağışıklık sistemi, Sinyal İletimi (<i>Homo sapiens</i>)	Sinir Sistemi Gelişimi, Trombosit Aktivasyonu, Sinyalizasyon ve Agregasyon, Bağışıklık Sisteminde Sitokin Sinyallemesi, Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi, Sinyal İletimi
DCD	R-HSA-6802997	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
DPYS	R-HSA-73467	Metabolizma (<i>Homo sapiens</i>)	Nükleotid Metabolizması

Çizelge 4.5 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında fazla ifade edilen proteinleri kodlayan gen isimleri ve ilişkili biyolojik yolları (devam)

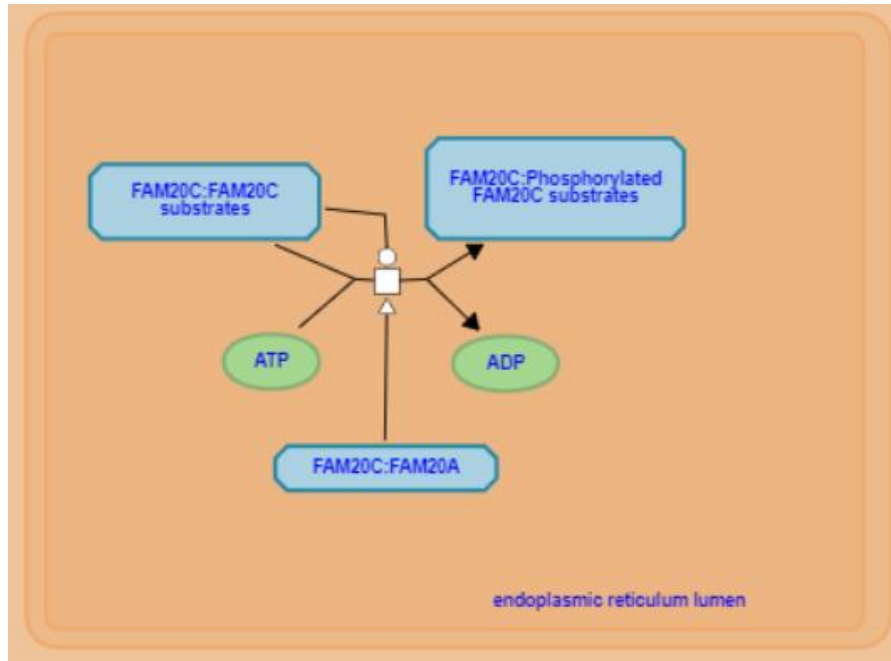
EEF2	R-HSA-6801513	Bağışıklık sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
GDI1; GDI2	R-HSA-6800904	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
GDI2	R-HSA-6806176	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
GSR	R-HSA-3322998	Uyanarlara Karşı Hücresele Tepkiler (<i>Homo sapiens</i>)	Strese Karşı Hücresele Tepkiler
HSPA5	R-HSA-985498	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Adaptif Bağışıklık Sistemi
HSPA8	R-HSA-264476	Uyanarlara Karşı Hücresele Tepkiler, Biyolojik Gelişim, Bağışıklık Sistemi, RNA Metabolizması, Vezikül Aracılı Taşıma (<i>Homo sapiens</i>)	Strese Karşı Hücresele Tepkiler, Sinir Sistemi Gelişimi, Bağışıklık Sisteminde Sitokin Sinyali, AU-zengin Elementleri Bağlayan Proteinler Tarafından mRNA Stabilitesinin Düzenlenmesi, Membran Kaçakçılığı, Trans-Golgi Ağı Vezikül Ağı
KRT1	R-HSA-6800428	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
KRT10	R-HSA-6809604	Biyolojik Gelişim (<i>Homo sapiens</i>)	Kornifiye Zarfın Oluşumu
LCP1	R-HSA-8950517	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Bağışıklık Sisteminde Sitokin Sinyali
LRP1	R-HSA-1454844	Metabolizma, Duyusal Algı, Vezikül Aracılı Taşıma (<i>Homo sapiens</i>)	Vitamin ve Kofaktörlerin Metabolizması, Görsel Fototransdüksiyon, Vezikül Aracılı Taşıma
NELL2	R-HSA-9010198	Biyolojik Gelişim (<i>Homo sapiens</i>)	Sinir Sistemi Gelişim
OGN	R-HSA-2105000	Metabolizma (<i>Homo sapiens</i>)	Karbonhidrat metabolizması
OIT3	Q8WWZ8	Metabolizma (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi
PTPRK	R-HSA-6785699	Sinyal İletimi (<i>Homo sapiens</i>)	Reseptör Tirozin Kinazlar ile Sinyalizasyon

Çizelge 4.5 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında fazla ifade edilen proteinleri kodlayan gen isimleri ve ilişkili biyolojik yolları (devam)

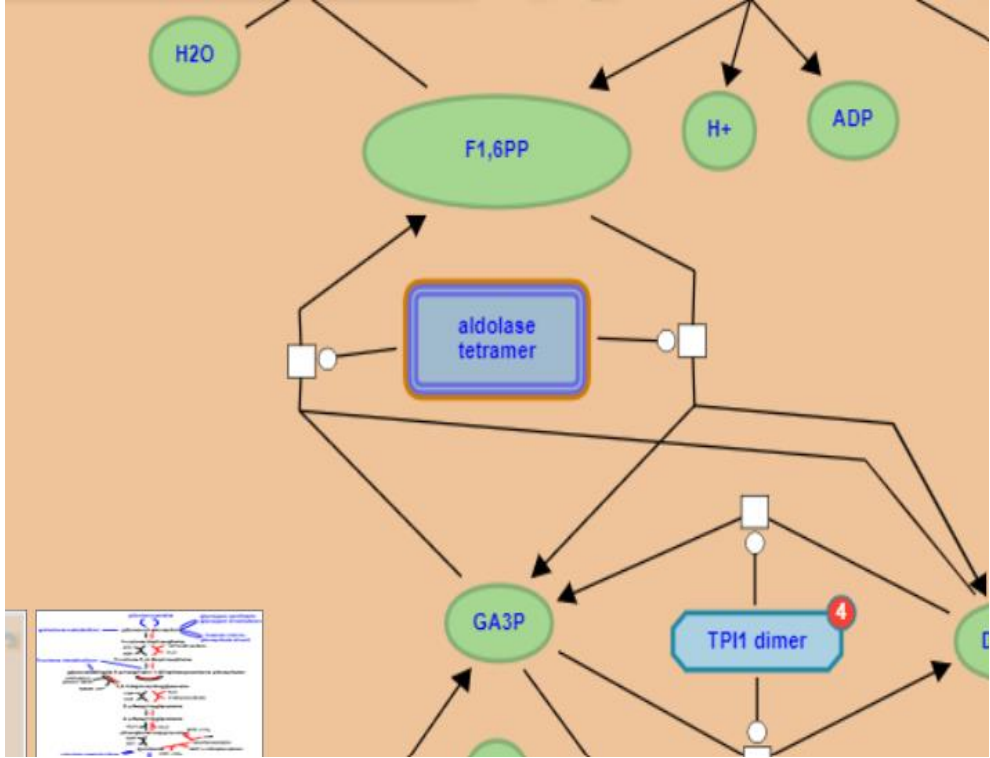
QDPR	R-HSA-71119	Metabolizma (<i>Homo sapiens</i>)	Amino Asitler ve Türevlerinin Metabolizması
RAN; GSP1; GSP2	R-HSA-180701	Hastalık (<i>Homo sapiens</i>)	Bulaşıcı Hastalık
RAP1A	R-HSA-377590	Hemostaz, Bağışıklık Sistemi, Sinyal İletimi (<i>Homo sapiens</i>)	Trombosit Aktivasyonu, Sinyalizasyon ve Agregasyon, Adaptif Bağışıklık Sistemi, İntegrin Sinyali
ROBO4	R-HSA-376176	Biyolojik Gelişim (<i>Homo sapiens</i>)	Sinir Sistemi Gelişim
S100A9	R-HSA-5432857	Bağışıklık Sistemi (<i>Homo sapiens</i>)	Adaptif Bağışıklık Sistemi
STIP1	R-HSA-443857	Uyarılara karşı hücrel tepkiler, Sinyal İletimi (<i>Homo sapiens</i>)	Strese karşı hücrel tepkiler, Rho GTPazlar, RHOBTB3 ile Sinyalizasyon
TMSB4X	R-HSA-349758	Hemostaz (<i>Homo sapiens</i>)	Trombosit aktivasyonu, sinyalizasyon ve agregasyon
TPM4	R-HSA-390548	Kas Kasılması, Sinyal İletimi (<i>Homo sapiens</i>)	Düz Kas Kasılması, Rho GTPazlar, RHOBTB3 ile Sinyalizasyon
TUBA1B	R-HSA-191691	Nöron Sistemi, Uyarılara Karşı Hücrel Tepkiler, Biyolojik Gelişim, Bağışıklık Sistemi, RNA Metabolizması, Vezikül Aracılı Taşıma, Protein Metabolizması, Organel Biyogenezi ve Bakımı (<i>Homo sapiens</i>)	Hücre Döngüsü, Mitotik, Strese Karşı Hücrel Tepkiler, Sinir Sistemi Gelişimi, Megakaryosit Gelişimi ve Trombosit Üretiminde Rol Oynayan Faktörler, Adaptif Bağışıklık Sistemi, Post-translasyonel protein modifikasyonu, Kimyasal Sinapslar Üzerinden İletim, Silyum Düzenegi, Rho GTPazlar, RHOBTB3 ile Sinyalizasyon

Çizelge 4.5 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında fazla ifade edilen proteinleri kodlayan gen isimleri ve ilişkili biyolojik yolları (devam)

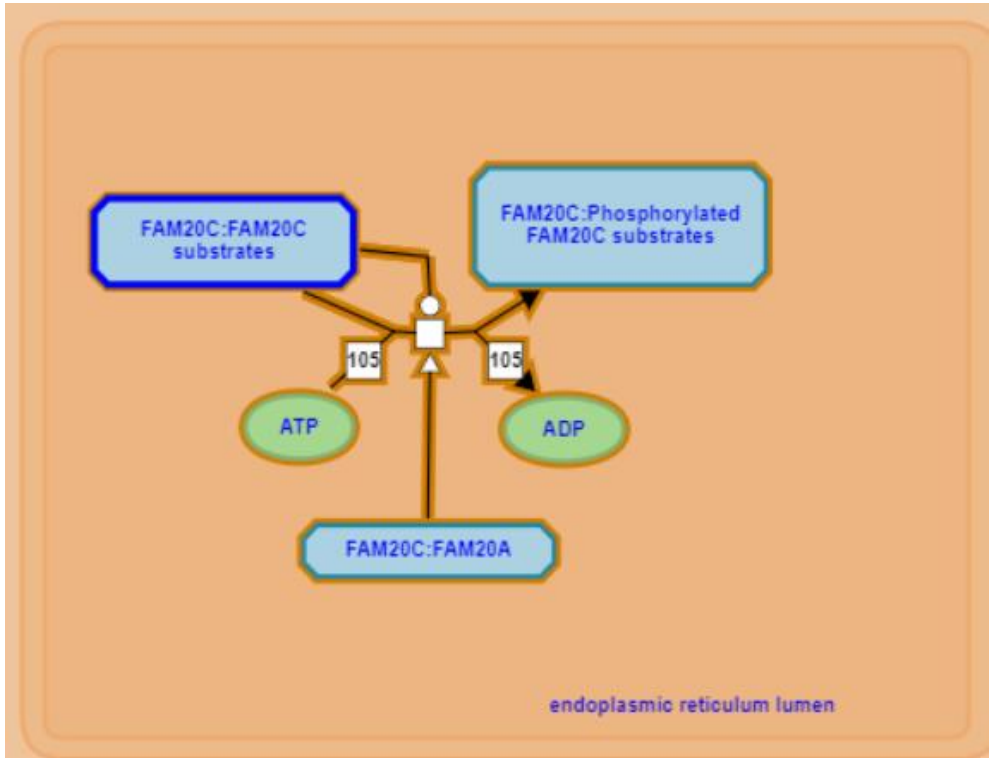
TUBB	R-HSA-380317	Hücre Döngüsü, Bağımsıklık Sistemi, Organel Biyogenezi (<i>Homo sapiens</i>)	Doğuştan Gelen Bağımsıklık Sistemi, Hücre Döngüsü
TUBB4B; TUBB4A; TUBB2B	R-HSA-5610435	Organel Biyogenezi ve Bakımı, Sinyal Yönetimi (<i>Homo sapiens</i>)	Sinyalizasyon
YWHAG; YWHAB	R-HSA-380312	Hücre Döngüsü, Gen Ekspresyonu, Organel Biyogenez ve Bakım, Programlanmış Hücre Ölümü, Sinyal İletimi, Vezikül Aracılı Taşıma (<i>Homo sapiens</i>)	Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları, RNA Polimeraz II Transkripsiyonu, Apoptozis, Rho GTPazlar, RHOBTB3 ile Sinyalizasyon
YWHAH	R-HSA-48888	Hücre Döngüsü, Gen Ekspresyonu, Organel Biyogenez ve Bakım, Bağımsıklık Sistemi, Programlanmış Hücre Ölümü, Sinyal İletimi, Vezikül Aracılı Taşıma (<i>Homo sapiens</i>)	Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları, RNA Polimeraz II Transkripsiyonu, Silyum Düzeneği, Apoptozis, Rho GTPazlar, RHOBTB3 ile Sinyalizasyon, Membran Kaçakçılığı, Adaptif Bağımsıklık Sistemi



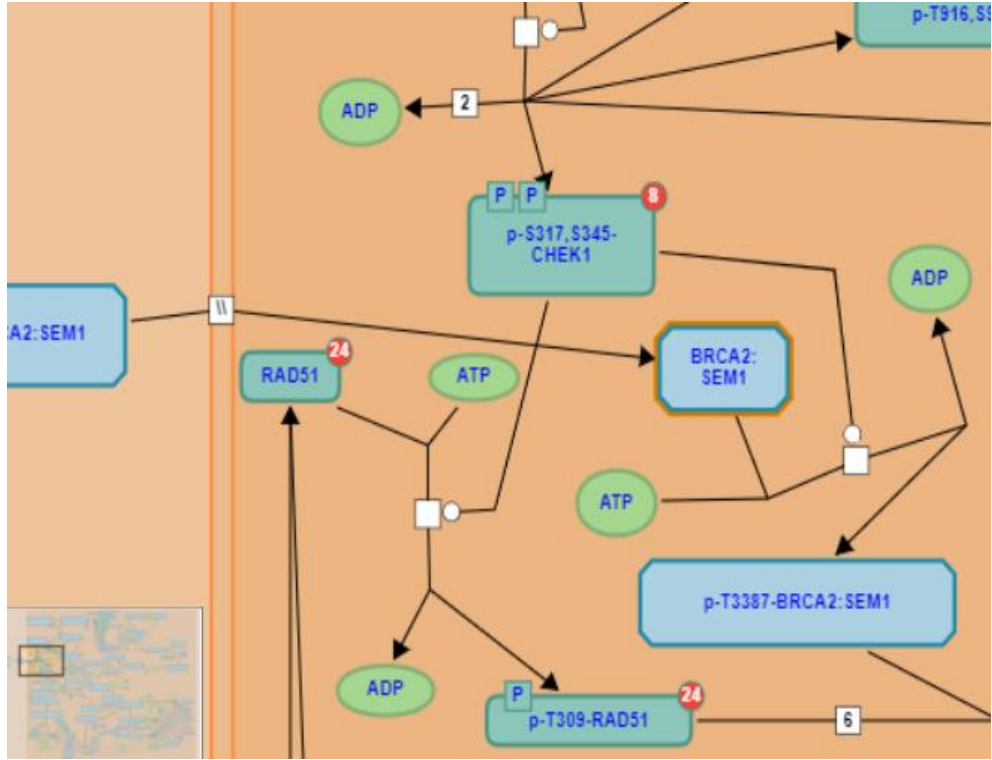
Şekil 4.17 ALB proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



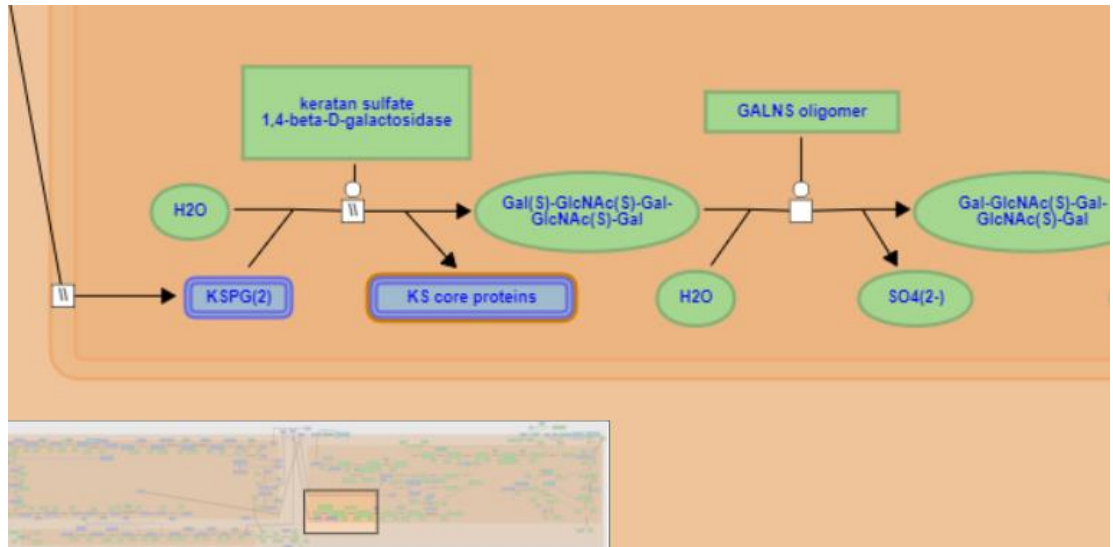
Şekil 4.18 ALDOA proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



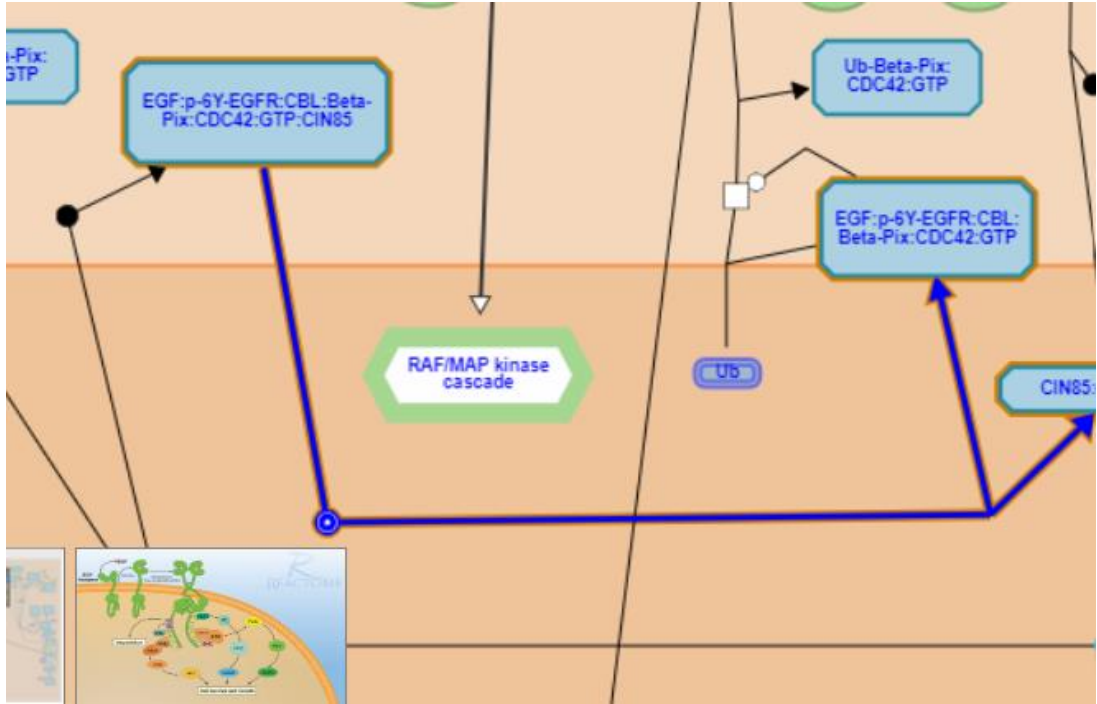
Şekil 4.19 APOA-1 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



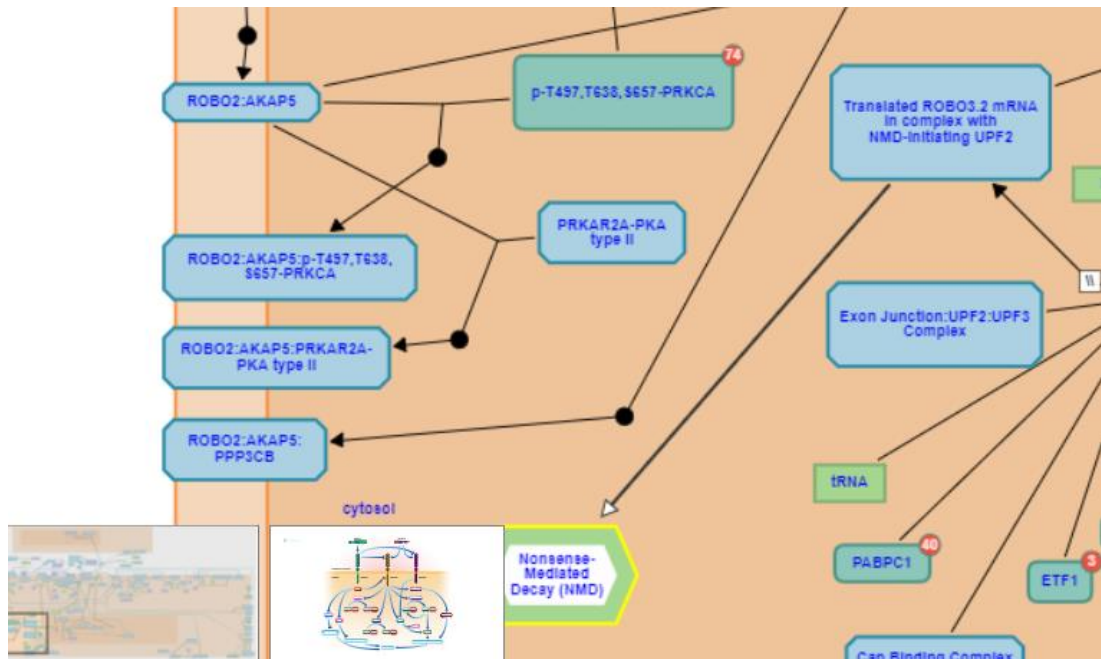
Şekil 4.20 BRCA-2 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



Şekil 4.21 OGN proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



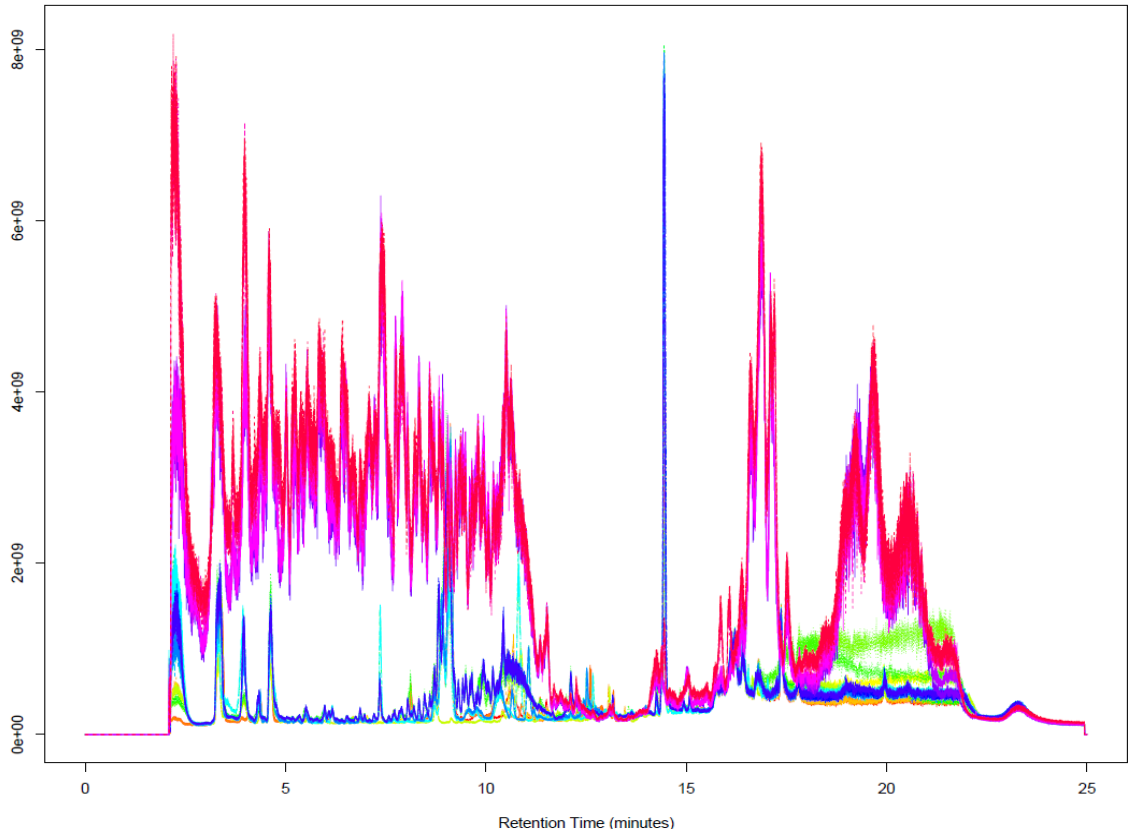
Şekil 4.22 PTPRK proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı



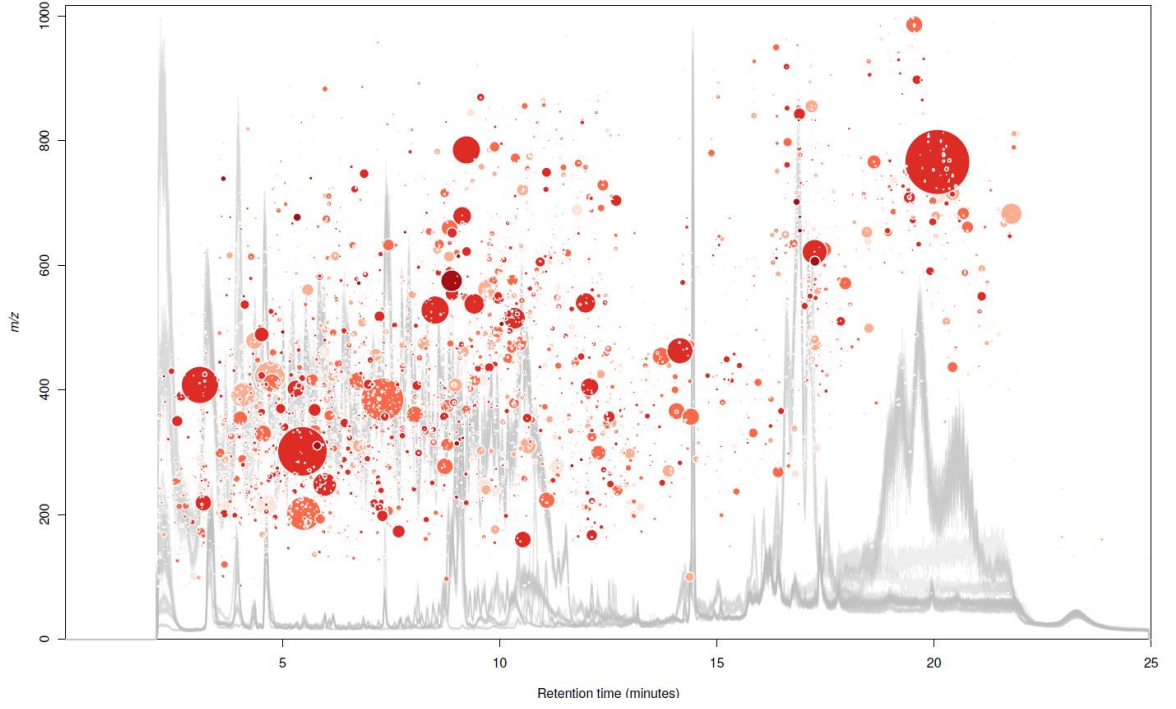
Şekil 4.23 ROBO-4 proteininin anti-kanser ilişkili biyoyolağı

bir metabolitin tanımlamaları Exploris 480 Orbitrap LC/MS-MS (ThermoScientific, ABD) cihazındaki pozitif ve negatif okumalar neticesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalar pozitif ve negatif mod olarak ikiye ayrılmıştır. Pozitif mod için elde edilen sonuçlar şekil 4.26-4.30'da, negatif mod için elde edilen sonuçlar ise şekil 4.31-4.35'de sunulmuştur.

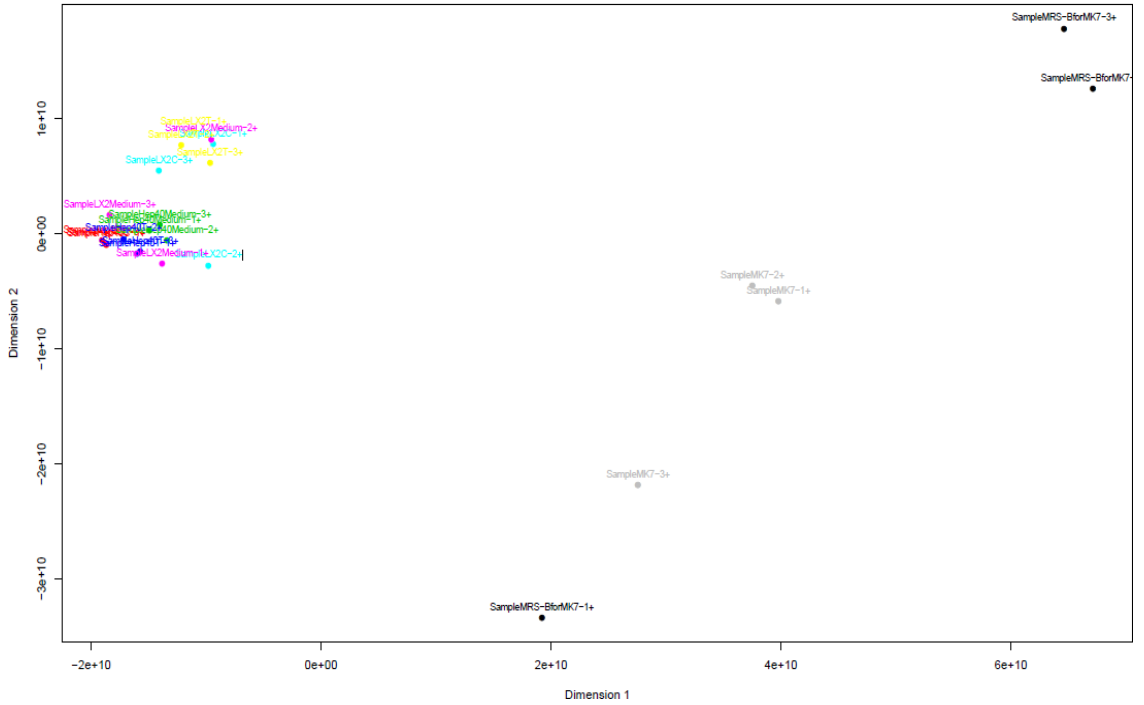
Her bir numune grubu için 3 tekrarlı yapılan analizler neticesinde tespit edilen metabolit sayıları çizelge 4.6'da sunulmuştur. Elde edilen veriler neticesinde en yüksek metabolit sayısı, postbiyotik ile muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunda tespit edilmiştir.



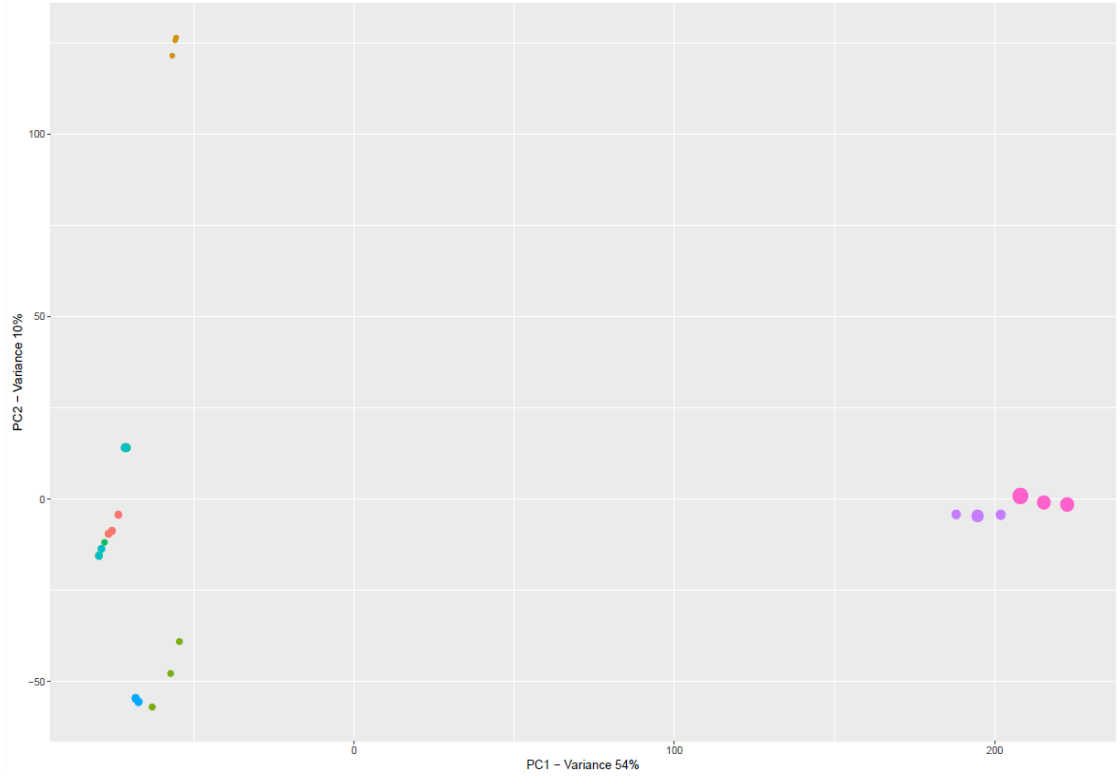
Şekil 4.26 Numunelerin pozitif moddaki toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı



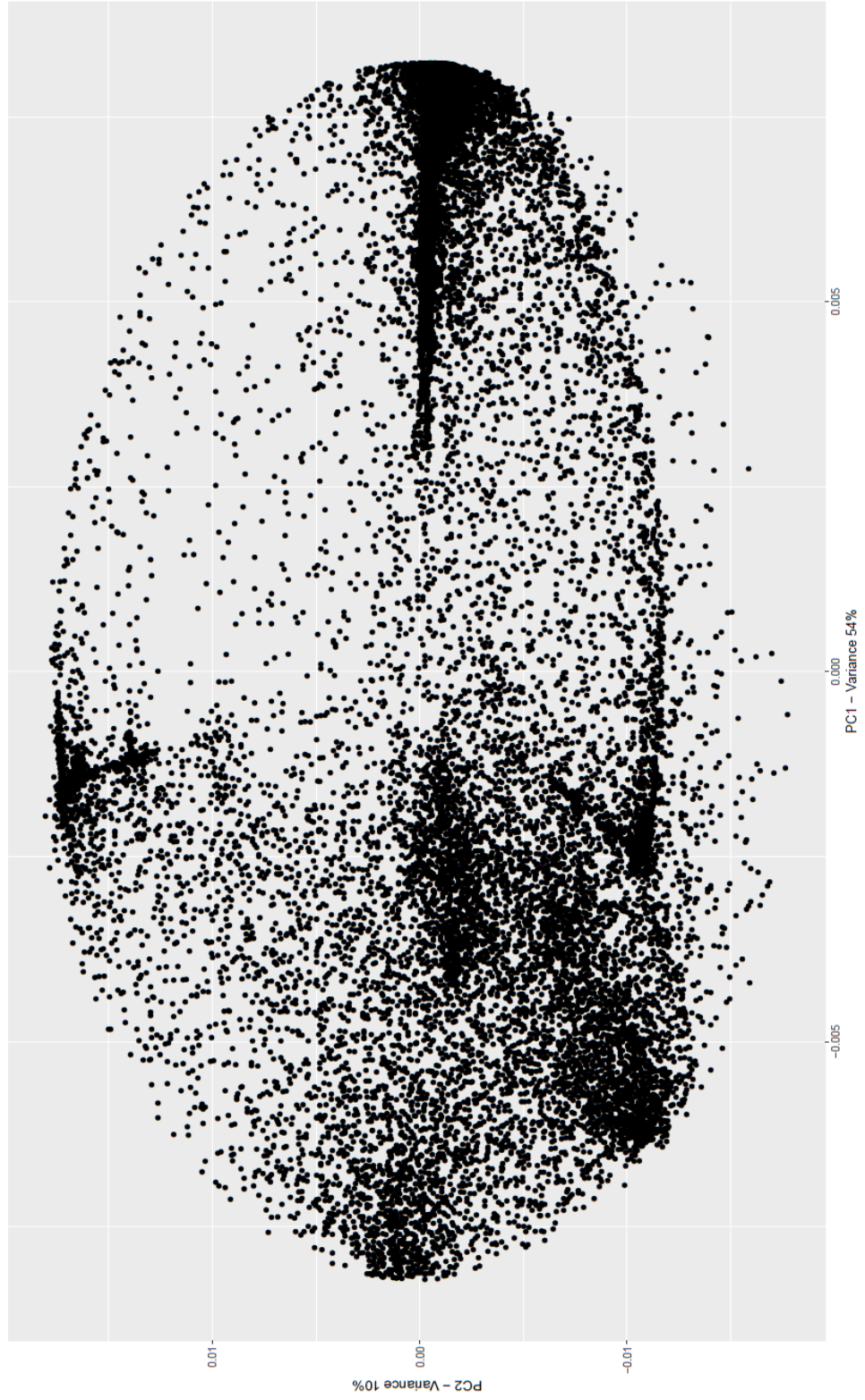
Şekil 4.27 Pozitif moddaki numunelerin moleküler yoğunluk anlamında toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı



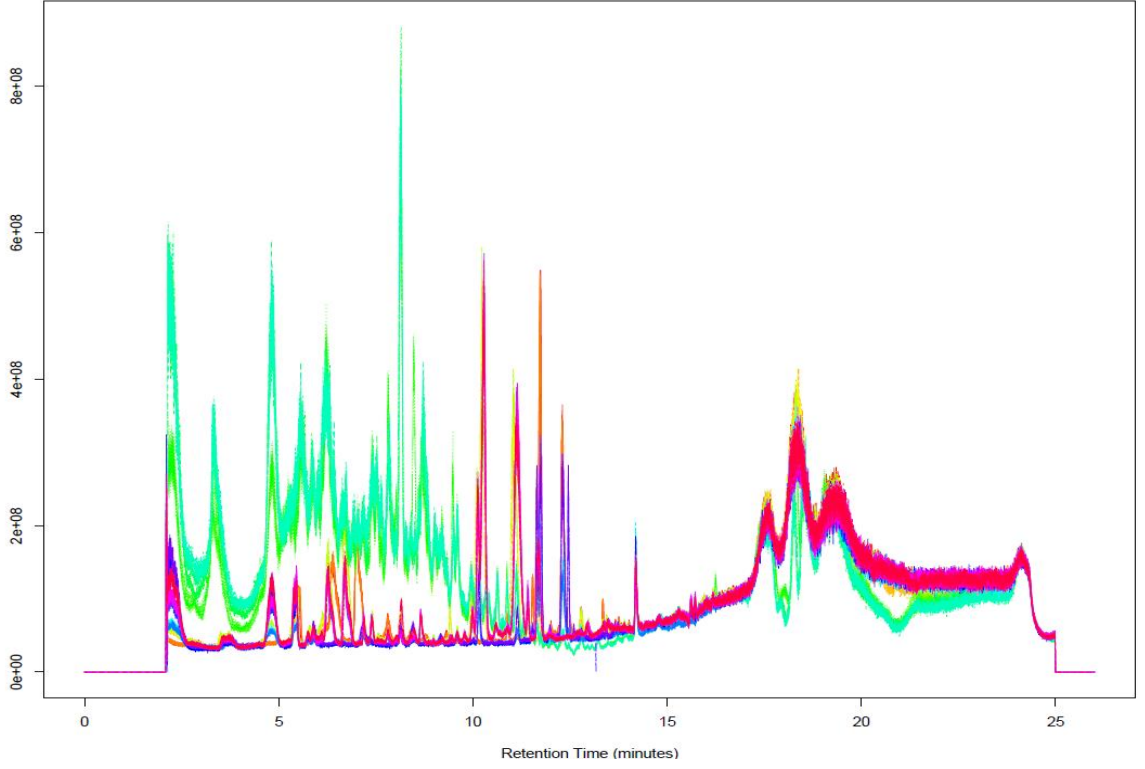
Şekil 4.28 Pozitif moddaki numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği



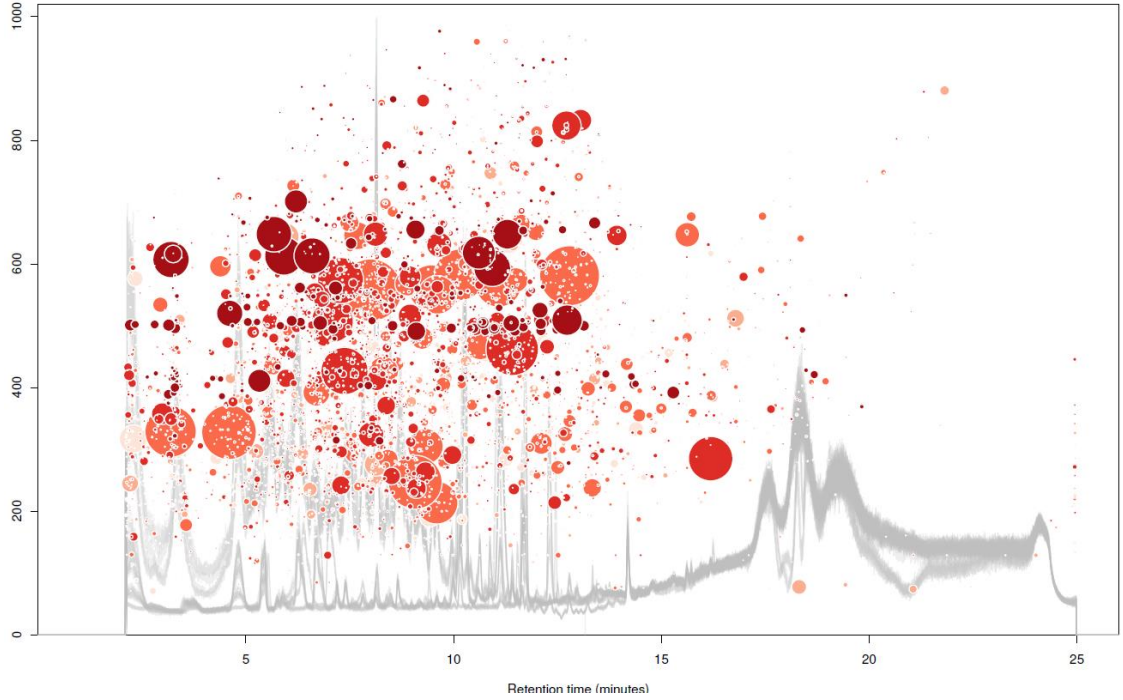
Şekil 4.29 Pozitif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılım grafiği



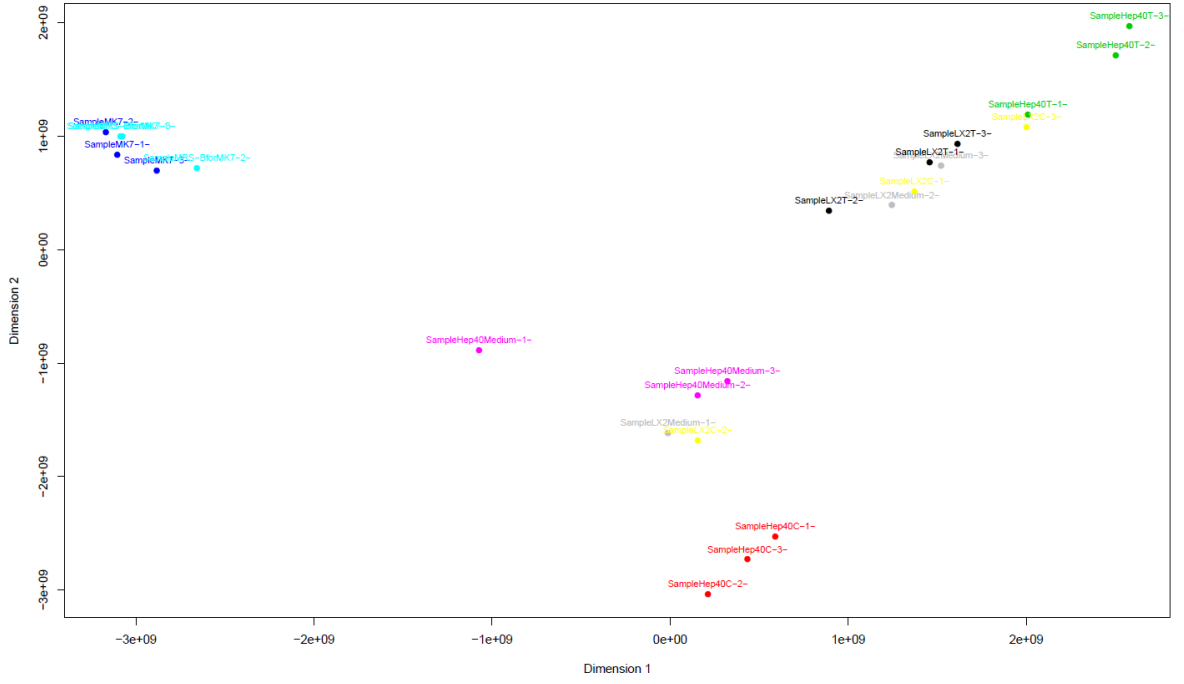
Şekil 4.30 Pozitif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılımının tüm metabolit bileşenleri yönünden nokta diyagramı



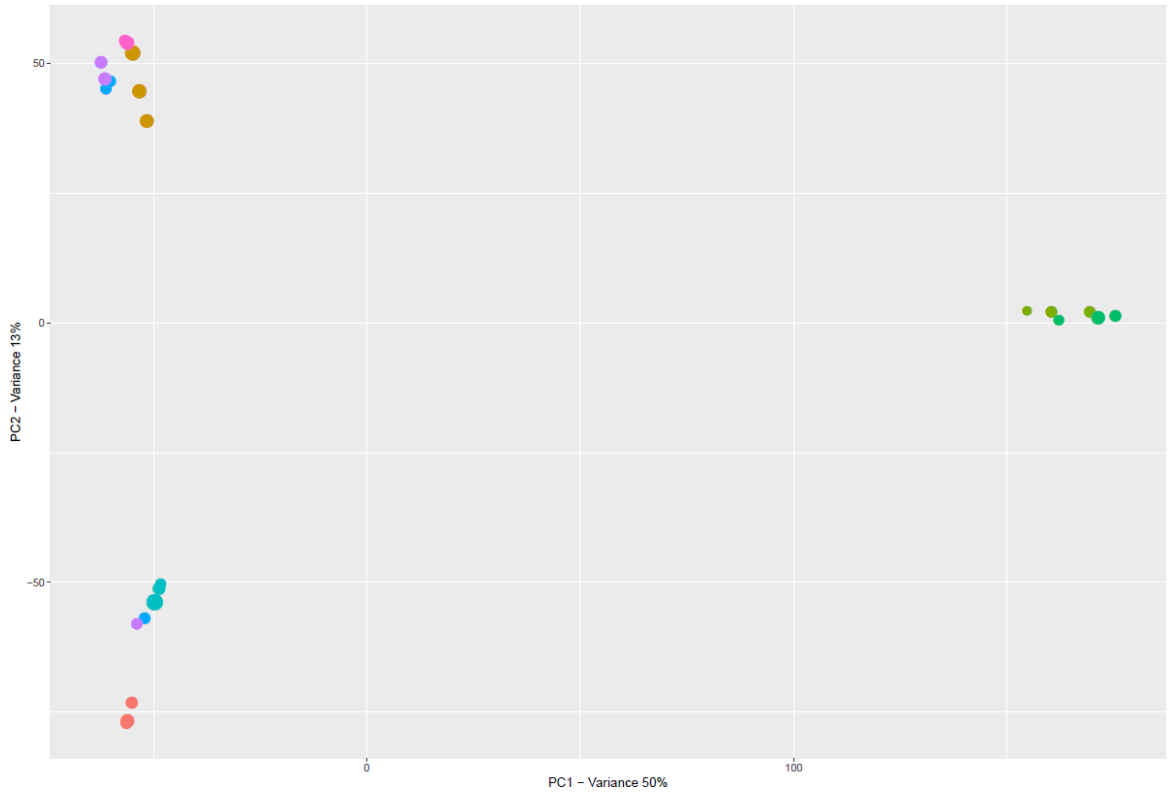
Şekil 4.31 Numunelerin negatif moddaki toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı



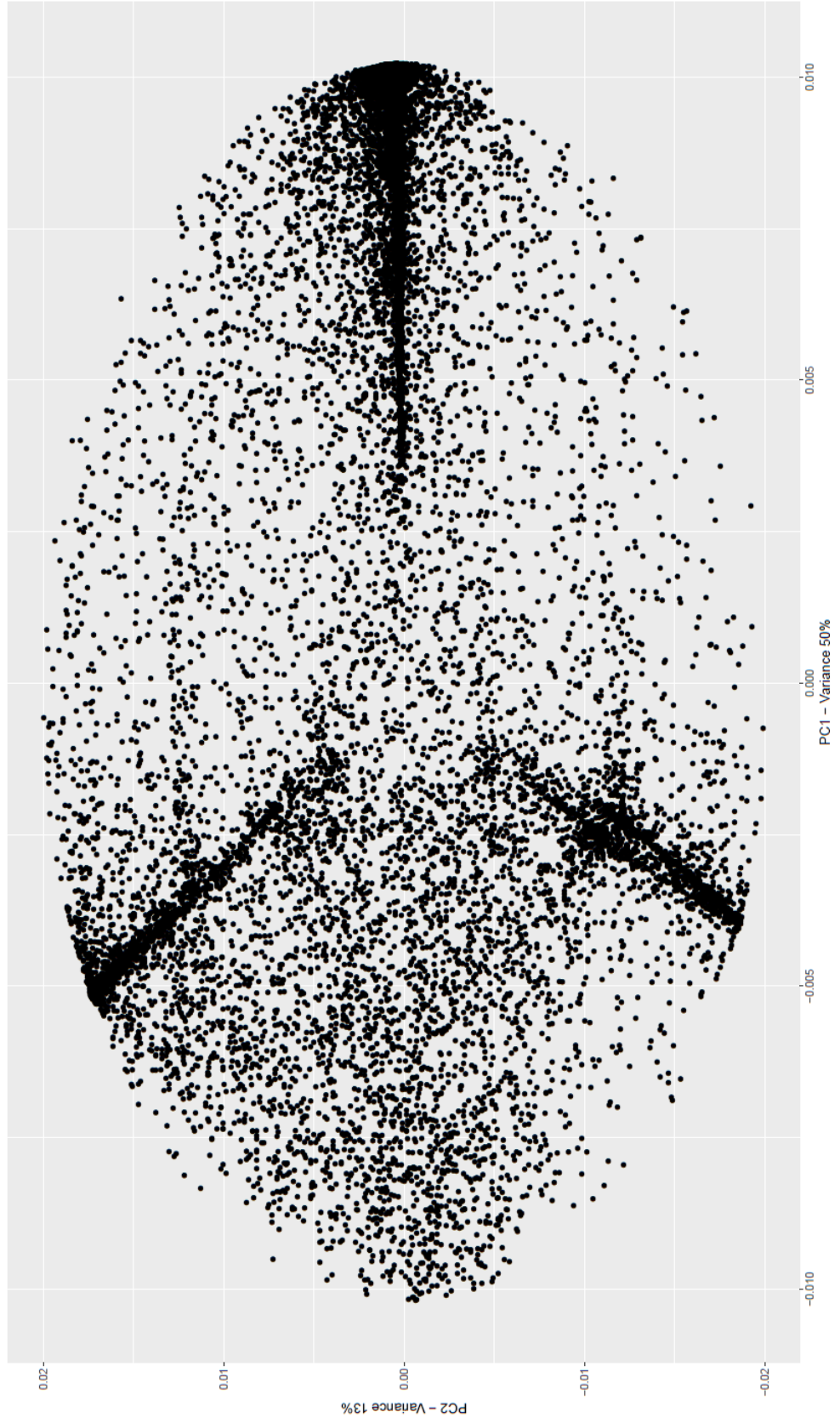
Şekil 4.32 Negatif moddaki numunelerin moleküler yoğunluk anlamında toplam iyon kromatografi görüntülerinin toplamı



Şekil 4.33 Negatif moddaki numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği



Şekil 4.34 Negatif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılım grafiği



Şekil 4.35 Negatif moddaki numunelerin temel bileşen analizinin çoklu boyutsal dağılımının tüm metabolit bileşenleri yönünden noktalamaları

Çizelge 4.6 Numunelerde tespit edilen metabolit sayıları (3 tekrar)

Numune İsmi	Tanımlanan Metabolit Sayısı	Ortalama Metabolit Sayısı
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (1. tekrar)	36	36
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (2. tekrar)	37	
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (3. tekrar)	36	
Postbiyotik (MK-7) (1. tekrar)	75	74
Postbiyotik (MK-7) (2. tekrar)	74	
Postbiyotik (MK-7) (3. tekrar)	74	
Lx-2 kültür besiyeri (1. tekrar)	59	59
Lx-2 kültür besiyeri (2. tekrar)	58	
Lx-2 kültür besiyeri (3. tekrar)	60	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	75	75
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	76	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	75	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	83	84
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	85	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	83	
Hep-40 kültür besiyeri (1. tekrar)	66	67
Hep-40 kültür besiyeri (2. tekrar)	68	
Hep-40 kültür besiyeri (3. tekrar)	67	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	79	80
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	80	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	80	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	91	92
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	93	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	93	

4.3.1 Postbiyotiklere ait metabolit profili

Postbiyotiklerde tespit edilen 74 adet metabolitin listesi çizelge 4.7’de sunulmuştur.

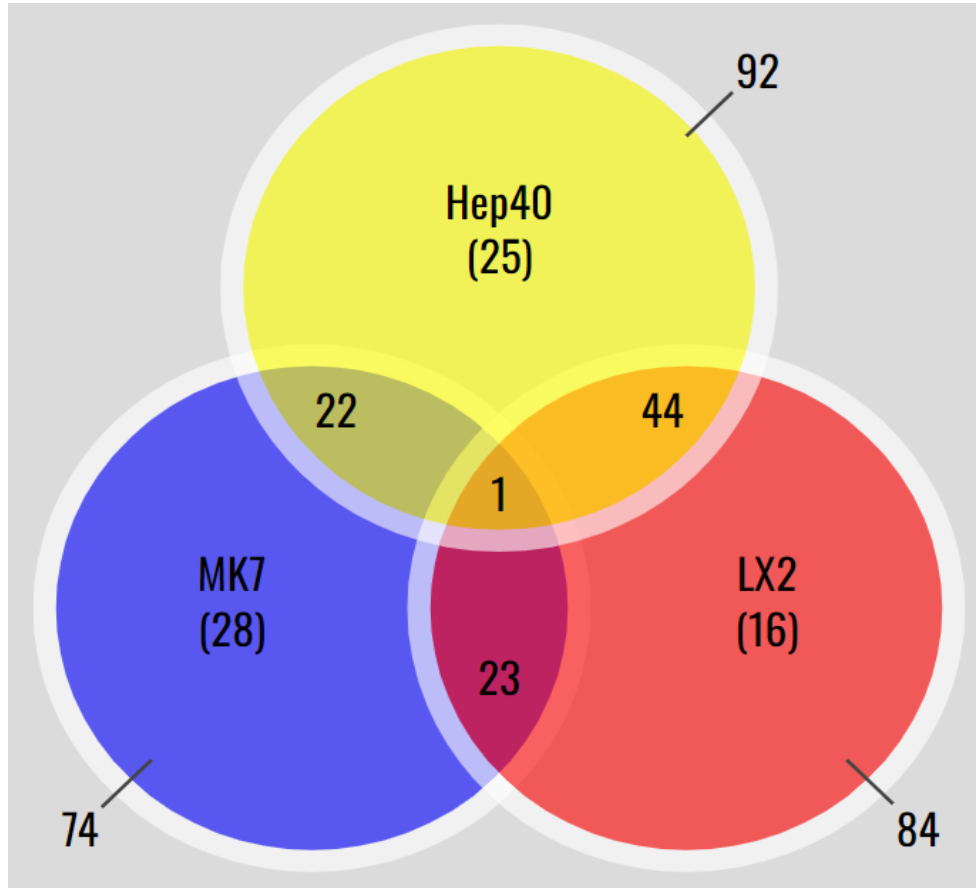
Çizelge 4.7 Postbiyotiklerde tespit edilen metabolitler

10-Ethyl-4-propyl-5,9,10,11-tetrahydro-1H-furo[3',4':5,6]cyclonona[1,2-c]furan-1,3,6,8(4H)-tetrone	Histidine	Pyocin G
2-aminoisobutyric acid	Hydroxyphenyllactic acid	Saccharose
2-methyl-1-propanol	Isoleucine	Serine
2-methyl-2-butanol	Isomaltulose	Sorbose 1-phosphate
3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	Lactic Acid	Succinic Acid
Acetic Acid	Leucine	Syringic Acid
Alanine	Lysine	Tetraxetan
Aspartic acid	Lysostaphin	Threonine
Cyclohexanol	Maleic Acid	Tryptophyl-tyrosine
Cystine	Malic Acid	Tryptophan
Dehydroalanine	Maltose	Tyrosine
Desaminotyrosine	Mannitol 1-phosphate	Tyrosol
D-Galactose	Mersacidin	Valine
D-Glutamate	N-Acetylpuromycin	Vitamin B1
D-Glutamic acid	n-Butanol	Vitamin B12
D-Lactic acid	Oxalic acid	Vitamin B2
Epidermin	Penthanol	Vitamin B3
Ethanol	Phenylalanine	Vitamin B5
Formic Acid	Phenylalanylproline	Vitamin D2
Gallidermin	Phenylethylamine	Vitamin K3
gamma-Aminobutyric acid	Phenyllactic acid	α -D-glucose
Glucose	Potassium cations linkend met.	α -ketoglutaric acid
Glycine	Primidone	β -D-fructose
Haloduracin	Propyl Gallate	Citric Acid
Hemicellulose	Pyocin AP41	

*sarı renk ile işaretlenenler fazla miktarda tespit edilen metabolitleri temsil etmektedir.

4.3.2 Hücre sekretomlarına ait metabolit profili

Metabolit analizi neticesinde tüm numunelerde tespit edilen metabolit sayılarını içeren venn diyagramı hazırlanmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde, postbiyotiklerle muamele edilmiş Hep-40 hücre sekretomunun 25 adet özgül metabolit içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.36). Sekretomlarda tespit edilen metabolitler besiyeri ve postbiyotiklerde bulunan metabolitlere karşı filtrelenmiş (Fold Change abs > log of 2) ve sadece postbiyotiğin Hep-40 hücrelerinde üretimini teşvik ettiği metabolitler Metabolom-Discoverer (ThermoScientific, ABD) yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Biyolojik yolları ise kegg.jp metabolit veri bankası kullanılarak belirlenmiştir. Anti-kanser ilişkili yollar ise şekil 4.37-4.44’de sunulmuştur.



Şekil 4.36 Tespit edilen metabolit sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı

Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları

Metabolit ismi	Biyolojik Yolak
2-Oxobutanoate	map00260 Glisin, serin ve treonin metabolizması map00270 Sistein ve metiyonin metabolizması map00290 Valin, lösin ve izolösin biyosentezi map00640 Propanoat metabolizması map00660 C5-Dallı dibazik asit metabolizması map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01210 Oksokarboksilik asit metabolizması map01230 Amino asitlerin biyosentezi
3-Methoxy-16-octylestra-1,3,5(10)-triene-16beta,17beta-diol	map01100 Metabolik yollar
4-hydroxy-2-nonenal	map05200 Kanser ilişkili yollar map05225 Hepatoselüler karsinom
5,10-methenyltetrahydrofolate	map00670 Folat ilişkili karbon havuzu map00720 Karbon fiksasyon yolları map01100 Metabolik yollar map01200 Karbon metabolizması map01240 Kofaktörlerin biyosentezi
Agmatine	map00330 Arginin ve prolin metabolizması map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi
Arginine	map00220 Arjinin biyosentezi map00261 Monobaktam biyosentezi map00330 Arginin ve prolin metabolizması map00331 Klavulanik asit biyosentezi map00470 D-Amino asit metabolizması map00970 Aminoasil-tRNA biyosentezi map00998 Çeşitli antibiyotiklerin biyosentezi map01064 Ornitin, lizin ve nikotinik asitten türetilen alkaloidlerin biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01230 Amino asitlerin biyosentezi map02010 ABC taşıyıcıları map04148 Efferositoz map04150 mTOR sinyal yolu map04974 Protein sindirimi ve emilimi map05014 Amyotrofik lateral skleroz map05022 Nörodejenerasyon yolları - çoklu hastalıklar map05142 Chagas hastalığı map05146 Amoebiasis map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması

Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları (devam)

“””CMP-2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononate	map00520 Amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması map01100 Metabolik yollar map01250 Nükleotid şekerlerin biyosentezi
Cysteine	map00260 Glisin, serin ve treonin metabolizması map00270 Sistein ve metiyonin metabolizması map00311 Penisilin ve sefalosporin biyosentezi map00332 Karbapenem biyosentezi map00430 Taurin ve hipotaurin metabolizması map00460 Siyanoamino asit metabolizması map00470 D-Amino asit metabolizması map00480 Glutasyon metabolizması map00730 Tiamin metabolizması map00770 Pantotenat ve CoA biyosentezi map00920 Sülfür metabolizması map00970 Aminoasil-tRNA biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01200 Karbon metabolizması map01230 Amino asitlerin biyosentezi map01240 Kofaktörlerin biyosentezi map04122 Sülfür röle sistemi map04216 Ferroptoz map04974 Protein sindirimi ve Emilimi map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması
D-myo-inositol (1,4,5,6)-tetrakisphosphate	Keşfedilememiştir
Etoposide	map04976 Safra salgısı
fructose 2,6-bisphosphate	map00051 Fruktoz ve mannoz metabolizması map01100 Metabolik yollar map04152 AMPK sinyal yolu map04922 Glukagon sinyal yolu map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması
Glutamine	map00220 Arjinin biyosentezi map00230 Pürin metabolizması map00240 Pirimidin metabolizması map00250 Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması map00470 D-Amino asit metabolizması map00630 Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması map00750 B6 vitamini metabolizması map00910 Azot metabolizması map00970 Aminoasil-tRNA biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01120 Farklı ortamlarda mikrobiyal metabolizma

Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları (devam)

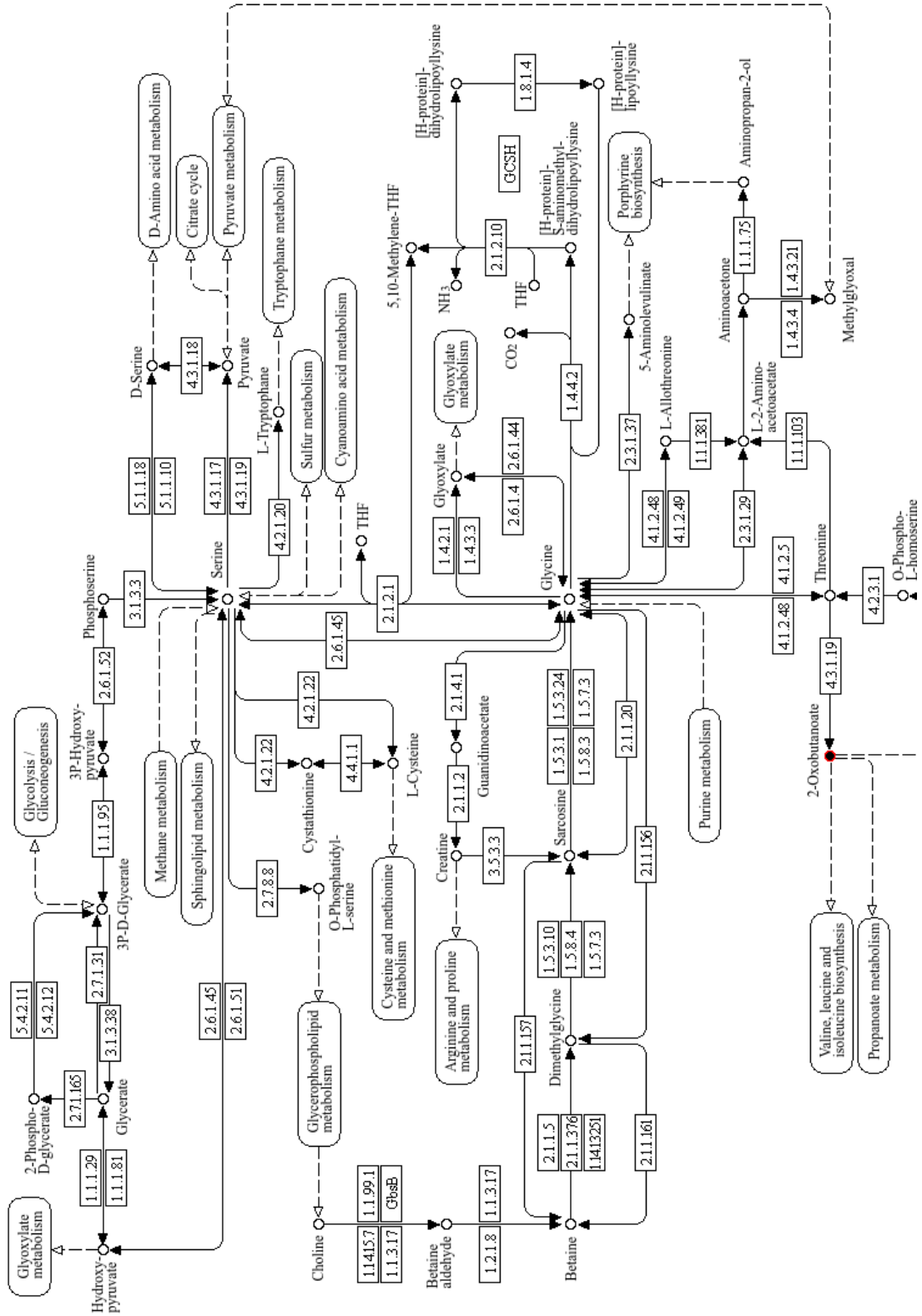
	<p>map01230 Amino asitlerin biyosentezi map01232 Nükleotid metabolizması map01240 Kofaktörlerin biyosentezi map02010 ABC taşıyıcıları map02020 İki bileşenli sistem map04724 Glutamaterjik sinaps map04727 GABAerjik sinaps map04964 Proksimal tübül bikarbonat ıslahı map04974 Protein sindirimi ve emilimi map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması</p>
Histamine	<p>map00340 Histidin metabolizması map01065 Histidin ve pürinden türetilen alkaloidlerin biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map04080 Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi map04664 Fc epsilon RI sinyal yolu map04721 Sinaptik vezikül döngüsü</p> <hr/> <p>map04750 TRP kanallarının enflamatuar aracı düzenlemesi map04971 Gastrik asit salgısı map04974 Protein sindirimi ve emilimi</p> <hr/> <p>map05310 Astım map07227 Histamin H2/H3 reseptör agonistleri/antagonistleri</p>
L-Citrulline	<p>map00220 Arjinin biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01230 Amino asitlerin biyosentezi</p>
L-Ornithine	<p>map00220 Arjinin biyosentezi map00330 Arginin ve prolin metabolizması map00470 D-Amino asit metabolizması map00480 Glutatyon metabolizması map00997 Diğer çeşitli ikincil metabolitlerin biyosentezi map00998 Çeşitli antibiyotiklerin biyosentezi map01060 Bitki sekonder metabolitlerinin biyosentezi map01064 Ornitin, lizin ve nikotinik asitten türetilen alkaloidlerin biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01210 2-Oksokarboksilik asit metabolizması map01230 Amino asitlerin biyosentezi map02010 ABC taşıyıcıları map04148 Efferositoz</p>

Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları (devam)

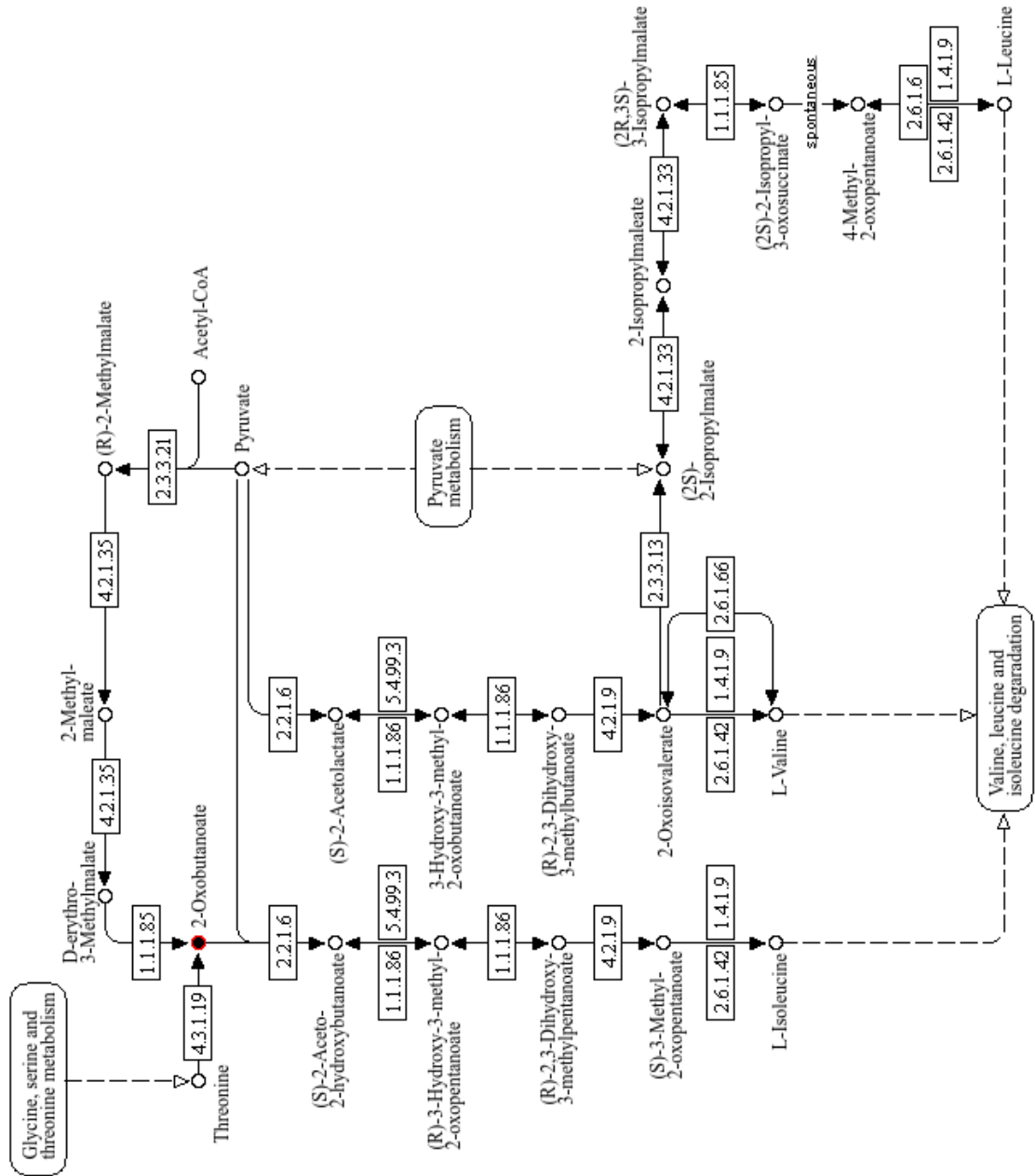
L-Proline	<p>map00330 Arginin ve prolin metabolizması map00332 Karbapenem biyosentezi map00333 Prodigiosin biyosentezi map00401 Novobiyosin biyosentezi map00404 Staurosporin biyosentezi map00470 D-Amino asit metabolizması map00970 Aminoasil-tRNA biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01230 Amino asitlerin biyosentezi map02010 ABC taşıyıcıları map04974 Protein sindirimi ve Emilimi map04978 Mineral Emilimi map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması</p>
L-Selenomethionine	<p>map00450 Selenokomponent metabolizması map01100 Metabolik yollar</p>
L-Serine	<p>map00260 Glisin, serin ve treonin metabolizması map00261 Monobaktam biyosentezi map00270 Sistein ve metiyonin metabolizması map00460 Siyanoamino asit metabolizması map00470 D-Amino asit metabolizması map00564 Gliserofosfolipid metabolizması map00600 Sfingolipid metabolizması map00630 Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması map00680 Metan metabolizması map00920 Sülfür metabolizması map00970 Aminoasil-tRNA biyosentezi map00997 Diğer çeşitli ikincil metabolitlerin biyosentezi map00998 Çeşitli antibiyotiklerin biyosentezi map01054 Nonribozomal peptid yapıları map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01120 Farklı ortamlarda mikrobiyal metabolizma map01200 Karbon metabolizması map01230 Amino asitlerin biyosentezi map01240 Kofaktörlerin biyosentezi map01502 Vankomisin direnci map02010 ABC taşıyıcıları map04071 Sfingolipid sinyal yolu map04974 Protein sindirimi ve Emilimi map04978 Mineral Emilimi map05230 Kanserde merkezi karbon metabolizması</p>
Maculosin	Map00996 Çeşitli aklaloidlerin biyosentezi
S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate	Keşfedilememiştir

Çizelge 4.8 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan özgül metabolitlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları (devam)

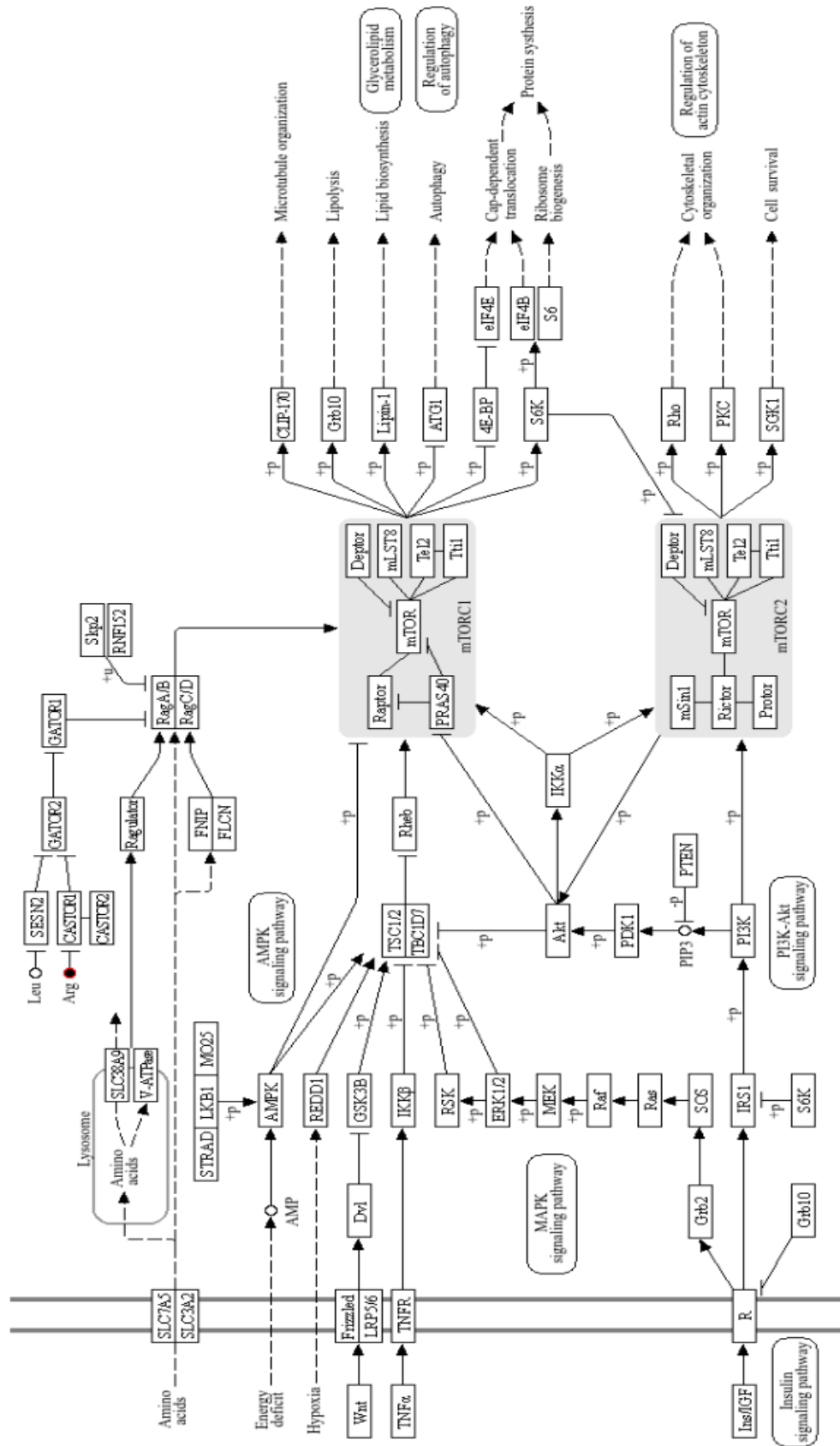
Spermidine	<p>map00330 Arginin ve prolin metabolizması map00410 beta-Alanin metabolizması map00480 Glutasyon metabolizması map00940 Fenilpropanoid biyosentezi map01053 Siderofor grubu nonribozomal peptitlerin biyosentezi map01100 Metabolik yollar map02010 ABC taşıyıcıları map04976 Safra salgısı</p>
UDP-N-acetyl-D-galactosamine	<p>map00512 Müsin tipi O-glikan biyosentezi map00520 Amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması map00541 O-Antigen nükleotid şeker biyosentezi map00552 Teikoik asit biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01250 Nükleotid şekerlerin biyosentezi</p>
Vitamin B6	<p>map00750 B6 vitamini metabolizması</p>
Vitamin D3	<p>map00100 Steroid biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map04977 Vitamin sindirimi ve emilimi</p>
Vitamin E	<p>map00130 Ubikinon ve diğer terpenoid-kinon biyosentezi map01100 Metabolik yollar map01110 İkincil metabolitlerin biyosentezi map01240 Kofaktörlerin biyosentezi map04216 Ferroptoz map04977 Vitamin sindirimi ve emilimi</p>



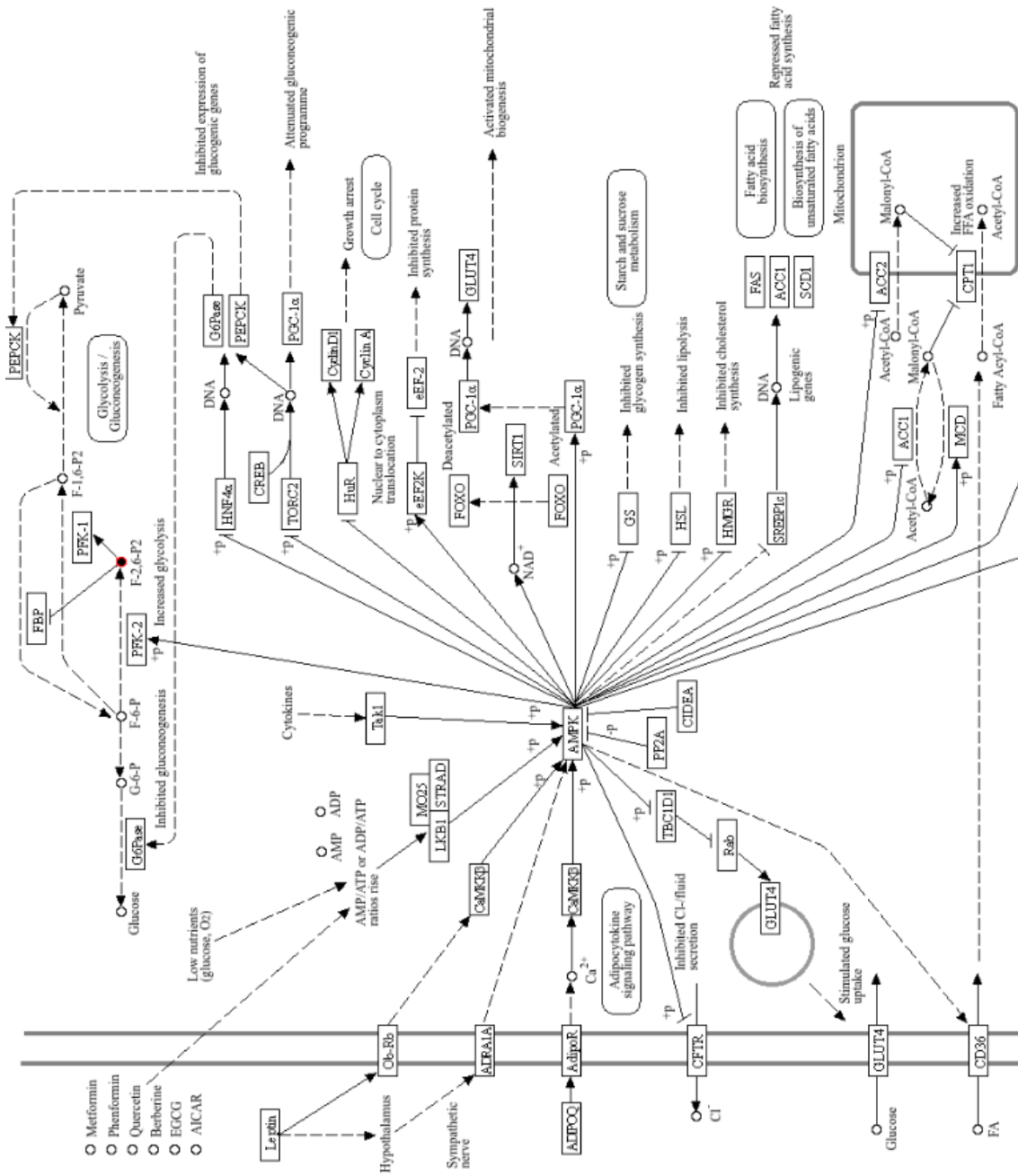
Şekil 4.37 Gliserin, serin ve treonin metabolizması ilişkili biyoyolak



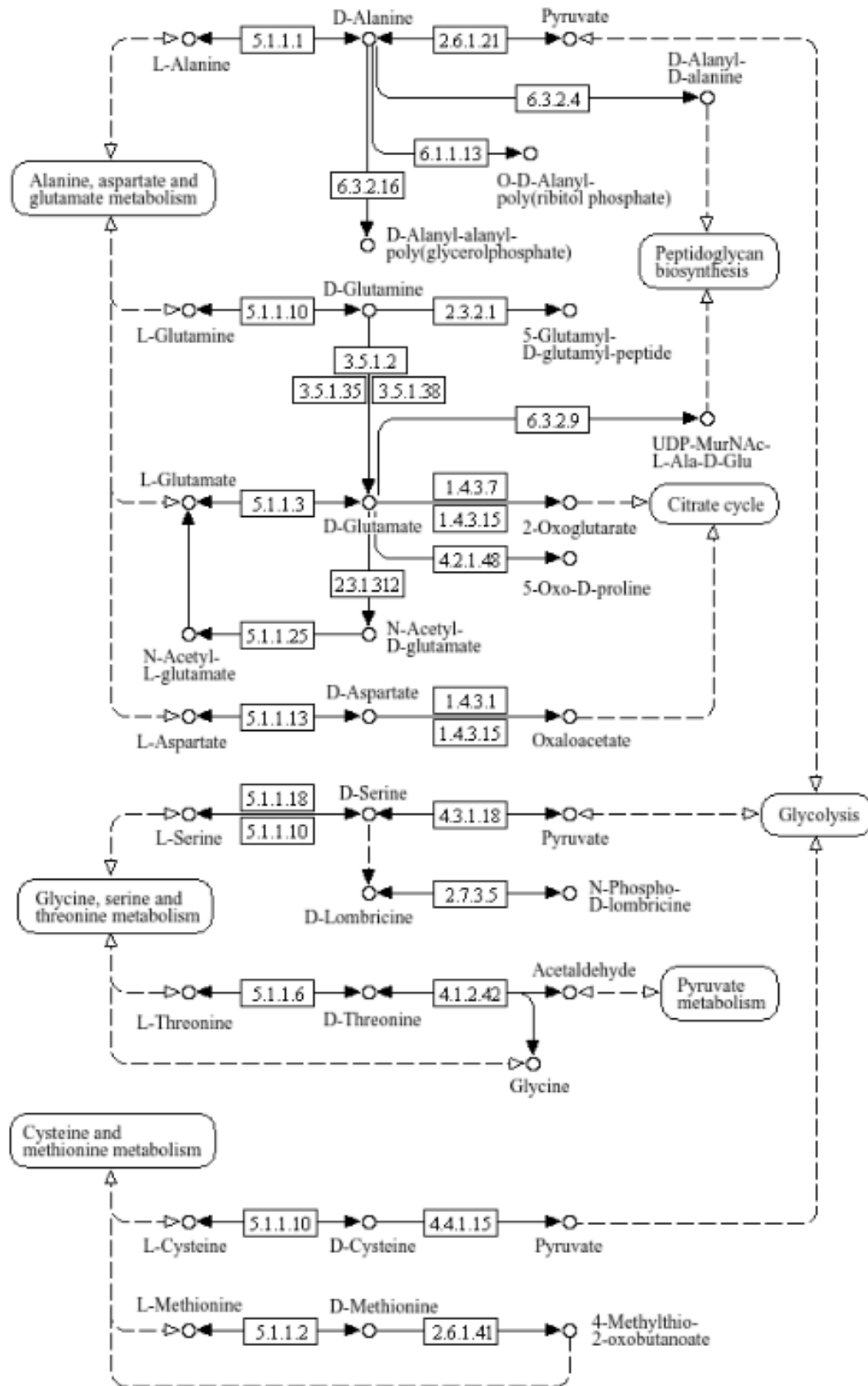
Şekil 4.39 Valin, lösin ve izolösin metabolizması ilişkili biyoyolak



Şekil 4.41 mTOR sinyal ilişkili biyoyolak



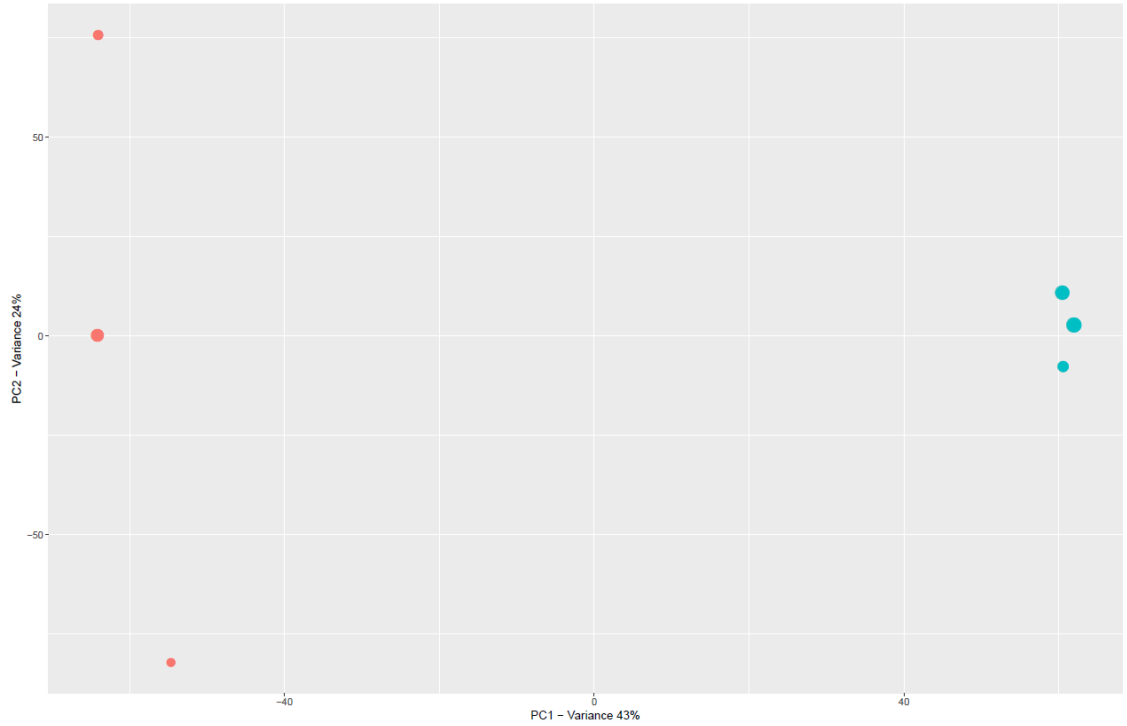
Şekil 4.42 AMPK sinyal ilişkili biyoyolak



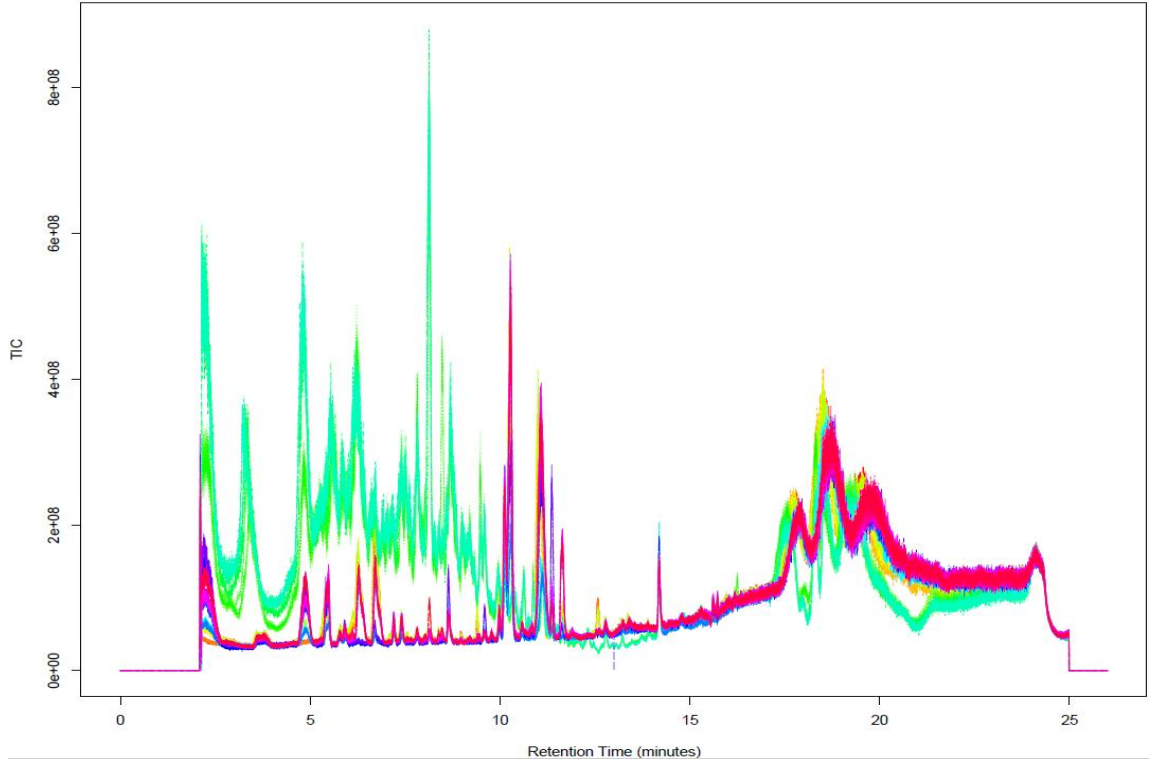
Şekil 4.44 D-amino asit metabolizması ilişkili biyoyolak

4.4 Lipidomiks Analizi Neticesinde Elde Edilen Genel Sonuçlar

Postbiyotiklerin, postbiyotiklerin elde edildiği ticari besiyerinin, postbiyotiklerle 48 saat muamele edilen ve edilmeyen hücrelere ait sekretomlar ile hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinin lipid profilleri kromatografi ve kütle spektroskopisi temelli hedeflenmemiş lipidomiks çalışmaları neticesinde değerlendirilmiştir. Her bir lipidin tanımlamaları Exploris 480 Orbitrap LC-MS/MS (ThermoScientific, ABD) cihazındaki sadece pozitif moddaki enjeksiyonların ardından yapılmıştır. Lipid içeriği belirlenen numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği şekil 4.45’de, toplam iyon kromatogramı karşılaştırması ise şekil 4.46’da sunulmuştur.



şekil 4.45 Lipid içeriği belirlenen numunelerin non-metrik çoklu boyutsal dağılım grafiği



Şekil 4.46 Lidip özellikli metabolitlerin toplam iyon kromatogramı karşılaştırması

Her bir numune grubu için 3 tekrarlı yapılan analizler neticesinde tespit edilen lipid sayıları çizelge 4.9’da sunulmuştur. Elde edilen veriler neticesinde en yüksek lipid sayısı, postbiyotik ile muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9 Numunelerde tespit edilen lipid sayıları (3 tekrar)

Numunenin İsmi	Tanımlanan Lipid Sayısı	Ortalama Lipid Sayısı
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (1. tekrar)	3	4
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (2. tekrar)	4	
Postbiyotik (MK-7) besiyeri: MRS-B (3. tekrar)	4	
Postbiyotik (MK-7) (1. tekrar)	35	35
Postbiyotik (MK-7) (2. tekrar)	35	
Postbiyotik (MK-7) (3. tekrar)	35	
Lx-2 kültür besiyeri (1. tekrar)	19	19
Lx-2 kültür besiyeri (2. tekrar)	18	
Lx-2 kültür besiyeri (3. tekrar)	20	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	21	22
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	22	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	22	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (1. tekrar)	38	36
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (2. tekrar)	35	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Lx-2 sekretomu (3. tekrar)	34	
Hep-40 kültür besiyeri (1. tekrar)	20	21
Hep-40 kültür besiyeri (2. tekrar)	21	
Hep-40 kültür besiyeri (3. tekrar)	22	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	25	26
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	25	
Postbiyotik (MK-7) ile muamele edilmemiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	27	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (1. tekrar)	58	59
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (2. tekrar)	59	
Postbiyotik (MK-7) ile 48 saat muamele edilmiş Hep-40 sekretomu (3. tekrar)	59	

4.4.1 Postbiyotiklere ait lipid profili

Postbiyotiklerde tespit edilen 35 adet lipidin listesi çizelge 4.10'da sunulmuştur.

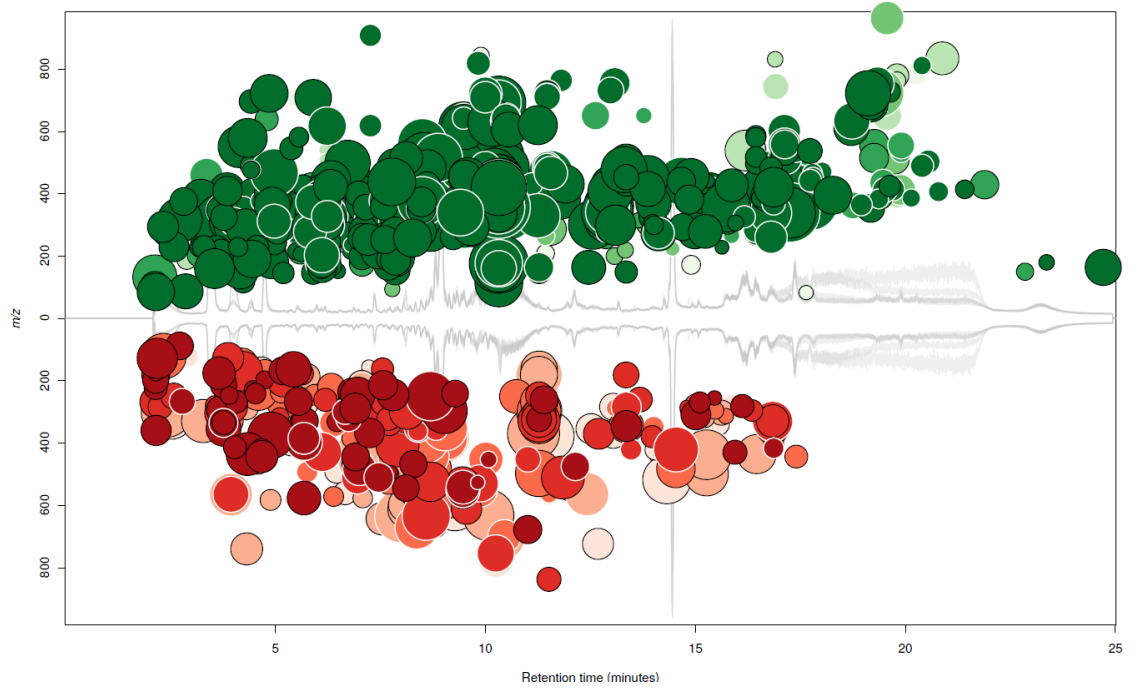
Çizelge 4.10 Postbiyotiklerde tespit edilen lipidler

alpha-Linolenic acid
Behenic acid
3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
Arachidionate ethyl ester
Butyric acid
Cephalin
Ceramide phosphoryllipid
Ceramide-1-phosphate
Dihydrosphingosine
Eicosanate
Galactosylceramides
Globoside-s
Glucosylceramides
Glycerol
Heptadecanoic acid
Lecithin
Lignocerate
Linolelaidate
Octadecanoic acid
Palmitic acid
Palmitin
Palmitoyl-CoA
Pentadecenoic acid
Phosphatidic acid
L- α -Phosphatidylcholine
Phosphatidylcholine
Phosphatidylinositol
Phosphatidylinositol 3-phosphate
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
Phosphatidylinositol trisphosphate
Phosphorylethanolamine
Propylene oxide
Sialic acid
Sulfated galactocerebroside
Tricosanate

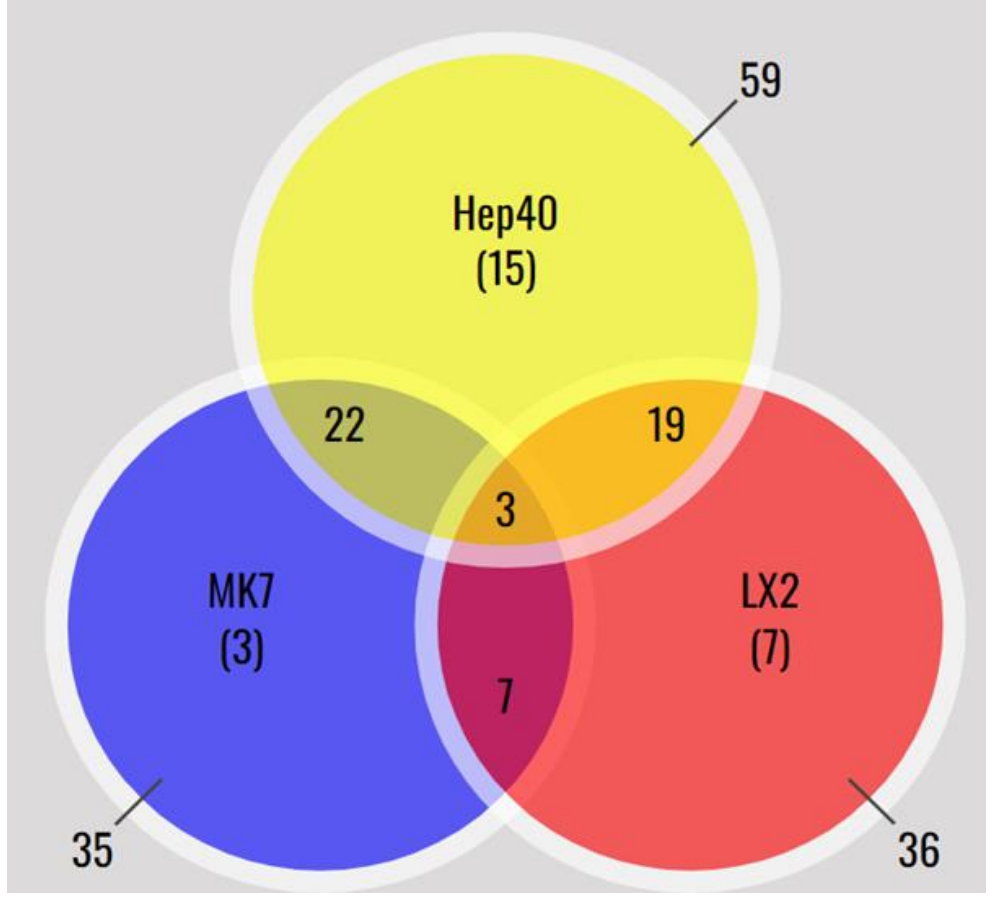
*pembe renk ile işaretlenenler fazla miktarda tespit edilen lipidleri temsil etmektedir.

4.4.2 Hücre sekretomlarına ait lipid profili

Postbiyotiklerle muamele edilen hücre sekretomlarına ait lipid metabolit dağılımları şekil 4.47’de sunulmuştur. Tüm muameleler neticesinde elde edilen veriler venn diyagramı olarak düzenlenmiş ve postbiyotiklerle muamele edilmiş Hep-40 hücre sekretomununun 15 adet farklı lipid içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.48). Sekretomlarda tespit edilen lipidler besiyeri ve postbiyotiklerde bulunan lipidlere karşı filtrelenmiş ($Fold\ Change\ abs > \log\ of\ 2$) ve sadece postbiyotiğin Hep-40 hücrelerinde üretimini teşvik ettiği lipidler Metabolom-Discoverer (ThermoScientific, ABD) yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Anti-kanser ilişkili yollar ise şekil 4.49-4.65’de sunulmuştur.



Şekil 4.47 Lipid metabolit dağılımları (yeşil renk: Hep-40+postbiyotik muamelesi; kırmızı: Lx-2+postbiyotik muamelesi)

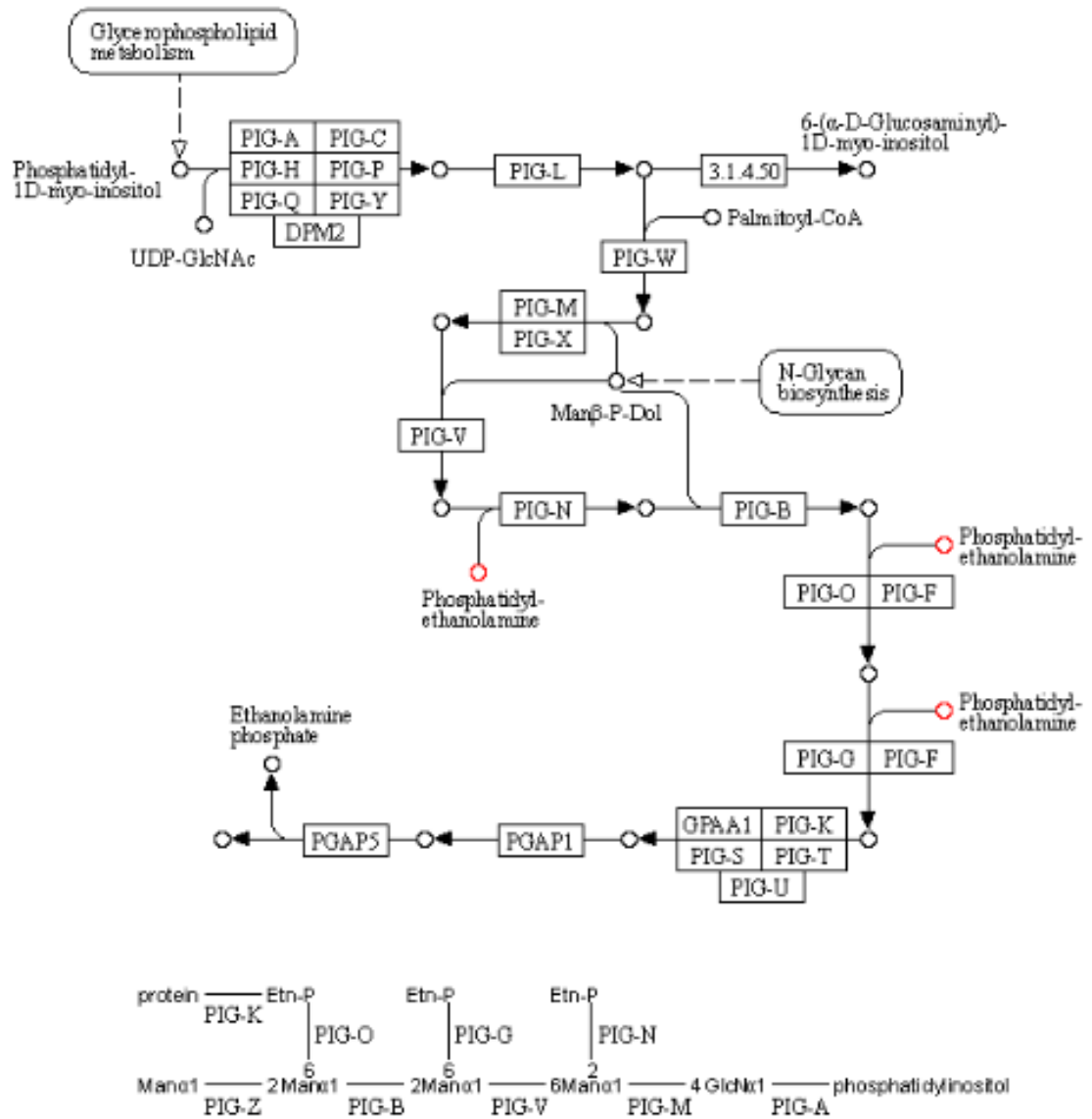


Şekil 4.48 Tespit edilen lipid sayılarının genel dağılımını gösteren venn diyagramı

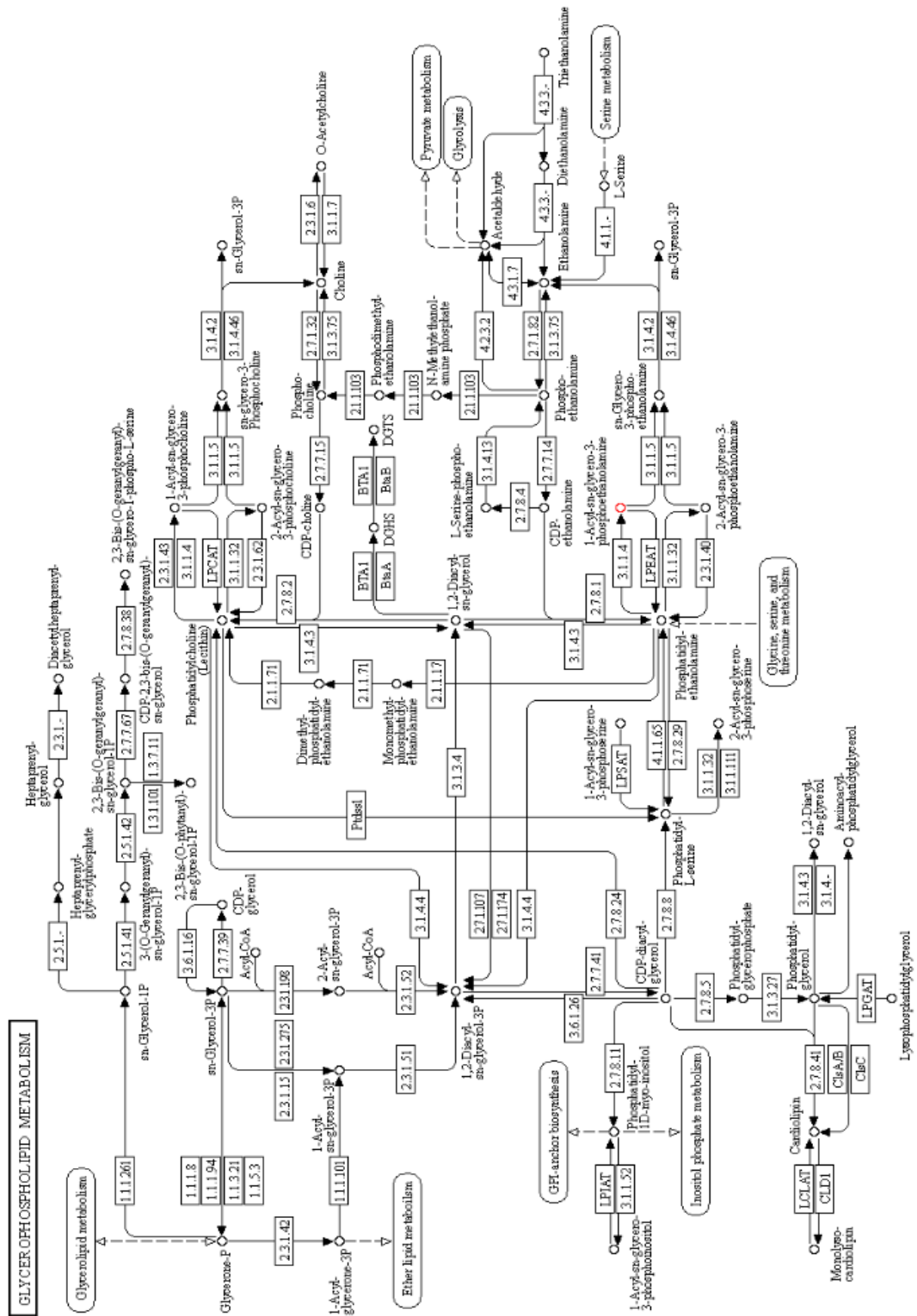
Çizelge 4.11 Posbiyotiklerle muamele edilen Hep-40 hücre sekretomunlarında bulunan lipidlerin isimleri ve kegg.jp metabolit veri bankasında tespit edilen ilişkili biyolojik yolları

	Molekül İsmi	ID Numarası	Etki Mekanizmaları ve kegg kodları
1	Phosphatidylcholine	C00157	Gliserofosfolipit metabolizması (map00564), Arachidonic asit metabolizması (map00590), Linoleik asit metabolizması (map00591), alfa-Linoleik asit (map00592), Metabolik yolak (map01100), İkincil metabolitlerin yolağı (map01110), Retrograd endokannabinoid sinyali (map04723)
2	Phosphatidylethanolamine	C00350	Glikozilfosfatidilinositol (GPI)- destek biyosentezi (map00563), Gliserofosfolipid metabolizması (map00564), Metabolik yolak (map01100), İkincil metabolitlerin yolağı (map01110), Retrograd endokannabinoid sinyali (map04723)
3	1-Phosphatidyl-D-myo-inositol	C01194	Inositol Fosfat metabolizması (map00562), Glikozilfosfatidilinositol (GPI)- destek biyosentezi (map00563), Gliserofosfolipid metabolizması (map00564), Metabolik yolak (map01100), Lipoarabinomannan (LAM) biyosentezi (map00571), Fosfatidilinositol sinyal sistemi (map04070)
4	1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	C04438	Gliserofosfolipid metabolizması (map 00564)
5	Phosphatidic acid	C00416	Yağ sindirimi ve absorpsiyonu (map 04975) , cAMP sinyal yolağı (map04024), Gliserofosfolipid metabolizması (map 00564), Gliserolipid metabolizması (map00561), Metabolik yolak (map01100), İkincil metabolitlerin yolağı (map01110), Fosfatidilinositol sinyal sistemi (map 04070), Fosfolipaz D sinyal yolağı (map04072), Fc gamma R aracılı fagositoz (map04666)
6	1-Acyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00681	Yağ sindirimi ve absorpsiyonu (map 04975) , Nöroaktif ligand-reseptör ilişkisi (map04080), Gliserofosfolipid metabolizması (map 00564), Gliserolipid metabolizması (map00561), Metabolik yolak (map01100), İkincil metabolitlerin yolağı (map01110), Vitamin sindirimi ve adsorpsiyonu (map 04977), Fosfolipaz D sinyal yolağı (map04072), Aktin sitozkeleton regülasyonu (map04810)
7	Sphingomyelin	C00550	Spingolipid metabolizması (map00600), Metabolik yolak (map01100), Sfingolipid sinyal yolağı (map04071), Nekrotozis (map04217)
8	Sphingosine	C00319	Spingolipid metabolizması (map00600), Metabolik yolak (map01100), Sfingolipid sinyal yolağı (map04071), Nekrotozis (map04217), Apoptozis (map04210)
9	GM2	C04884	Glikosfingolipid biyosentezi (map00604), Spingolipid metabolizması (map00600), Metabolik yolak (map01100)
10	Glycosylphosphatidylinositol phospholipase D	K01127	Glikozilfosfatidilinositol (GPI)- destek biyosentezi (map00563), Metabolik yolak (map01100)
11	Arachionate	C00219	Araşyonidik asit metabolizması (map00590), Linoleic asit metabolizması (map00591), Doymamış yağ asitleri biyosentezi (map01040), Metabolik yolak (map01100), Nekrotozis (map04217), Ferroptosis (map04216), Adipositlerde lipolizin düzenlenmesi (map04923), Eicosanoidler (map07034), Oksitosin sinyal yolağı (map04921), GnRH sinyal yolağı (map04912), TRP kanallarında inflamatuar mediatör regülasyonu (map04750)
12	Eicosapentaenoic acid	C06428	Doymamış yağ asitleri biyosentezi (map01040)
13	Linoleic acid	C01595	Linoleic asit metabolizması (map00591), Doymamış yağ asitleri biyosentezi (map01040), Metabolik yolak (map01100)
14	Myristoleic acid	C01530	Doymamış yağ asitleri biyosentezi (map01040)
15	Prostaglandin D2	C00696	Araşyonidik Asit metabolizması (map00590), Nöroaktif ligand-reseptör ilişkisi (map04080), Metabolik yolak (map01100)

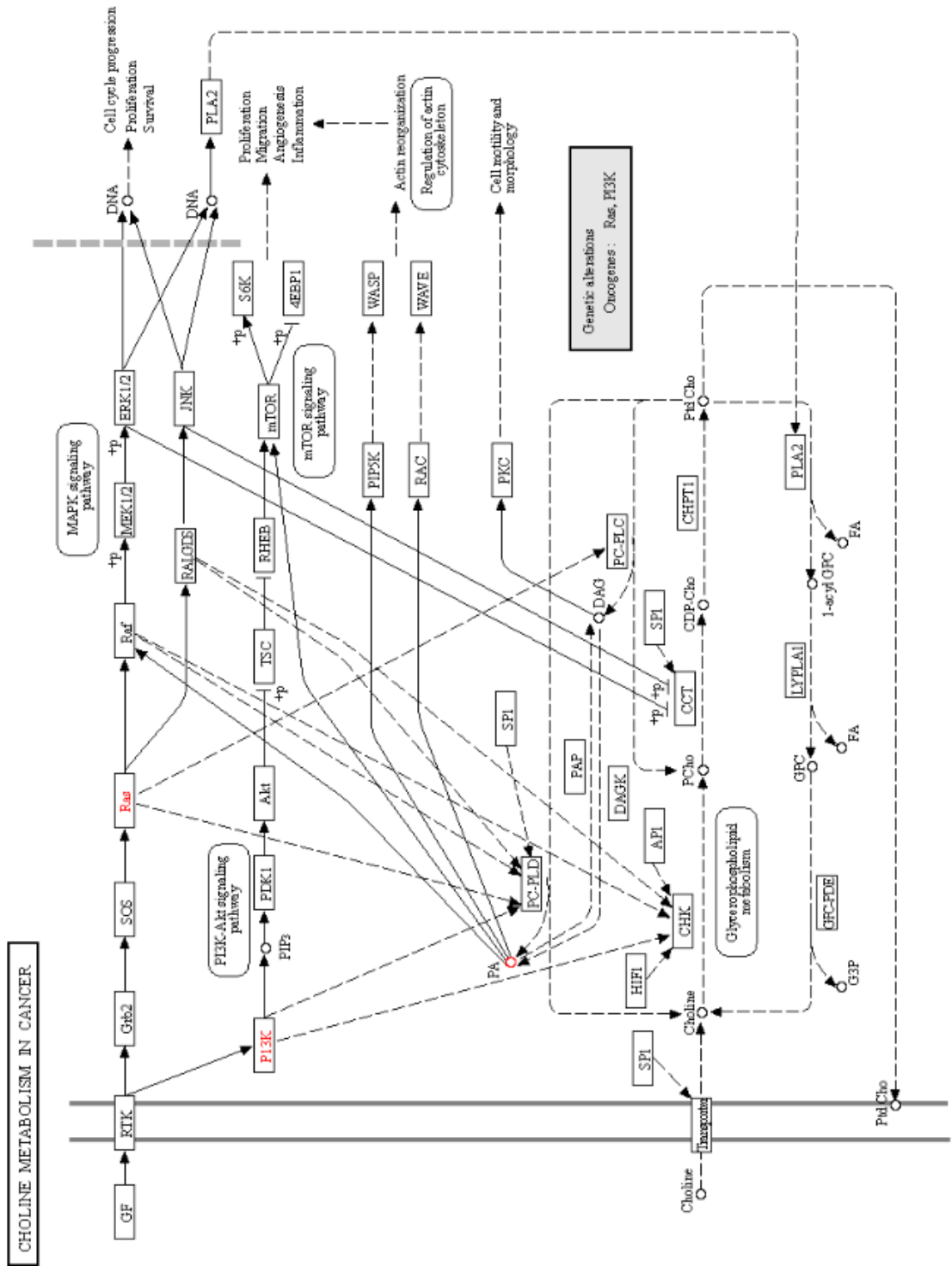
GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI) - ANCHOR BIOSYNTHESIS



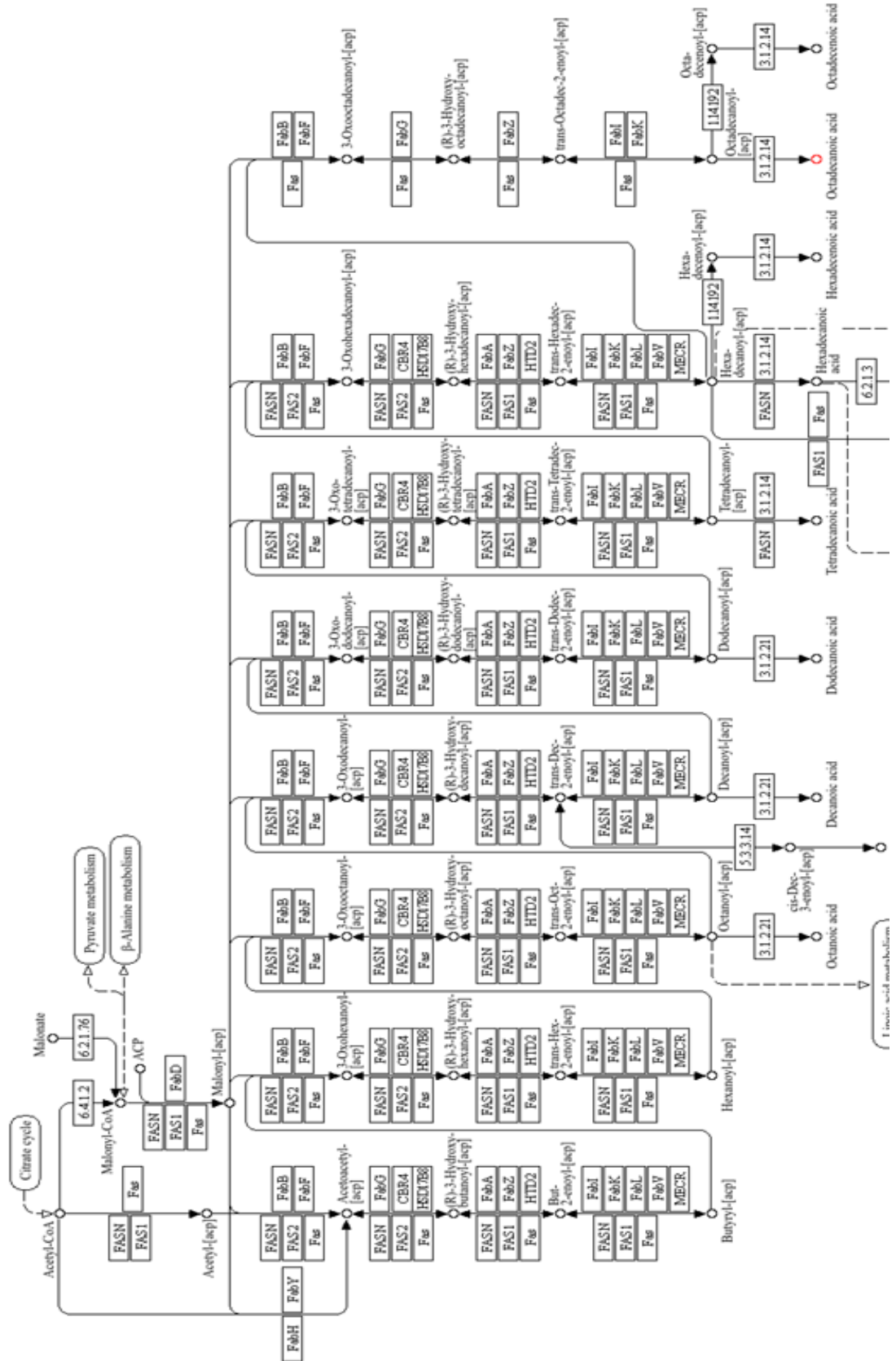
Şekil 4.50 Fosfotidiletanolamin ilişkili biyoyolak



Şekil 4.52 1-Açıl-sn-glysero-3-fosfatidiletanolamin ilişkili biyoyolak

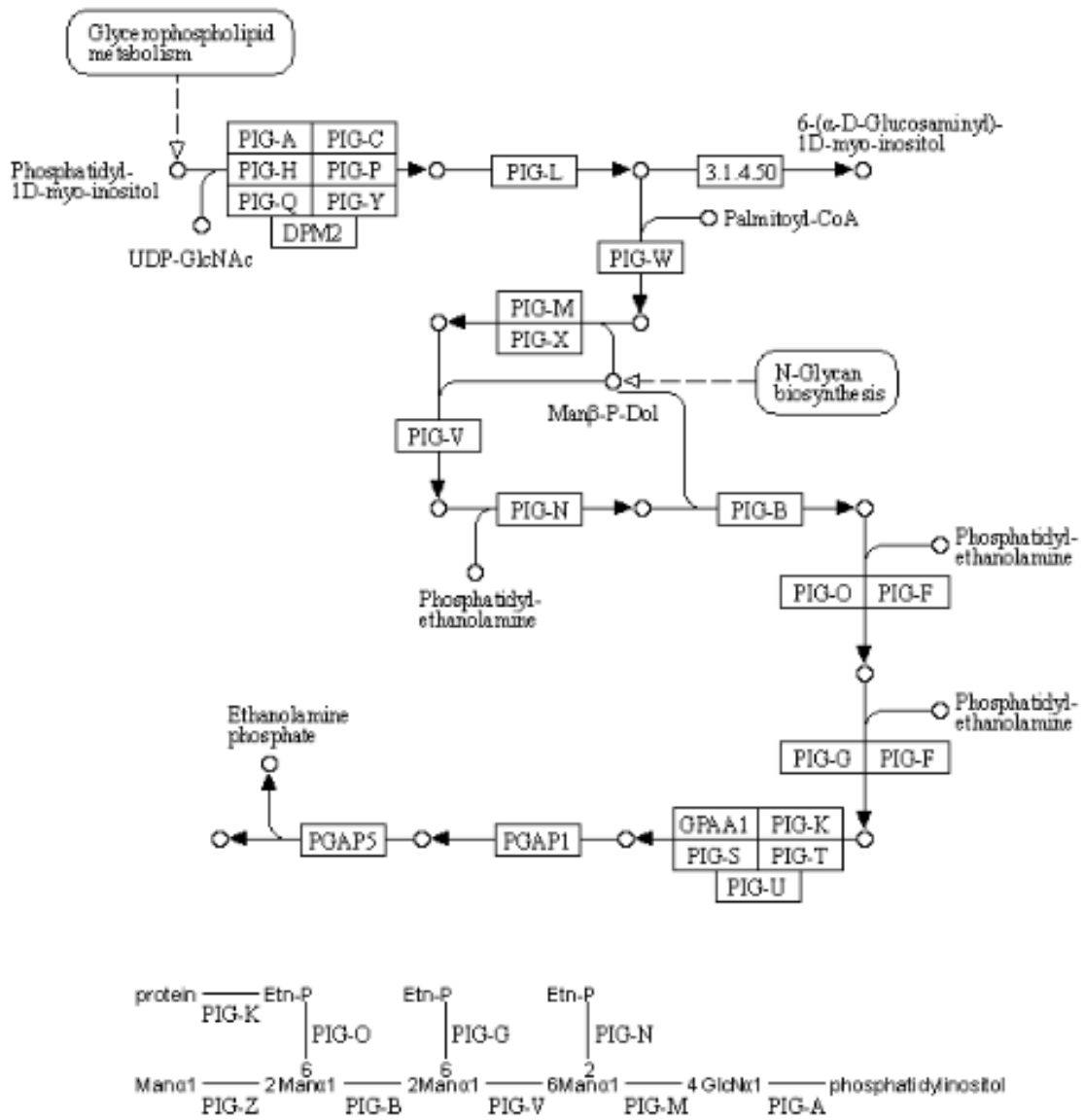


Şekil 4.53 Fosfatidik asit ilişkili biyoyolak



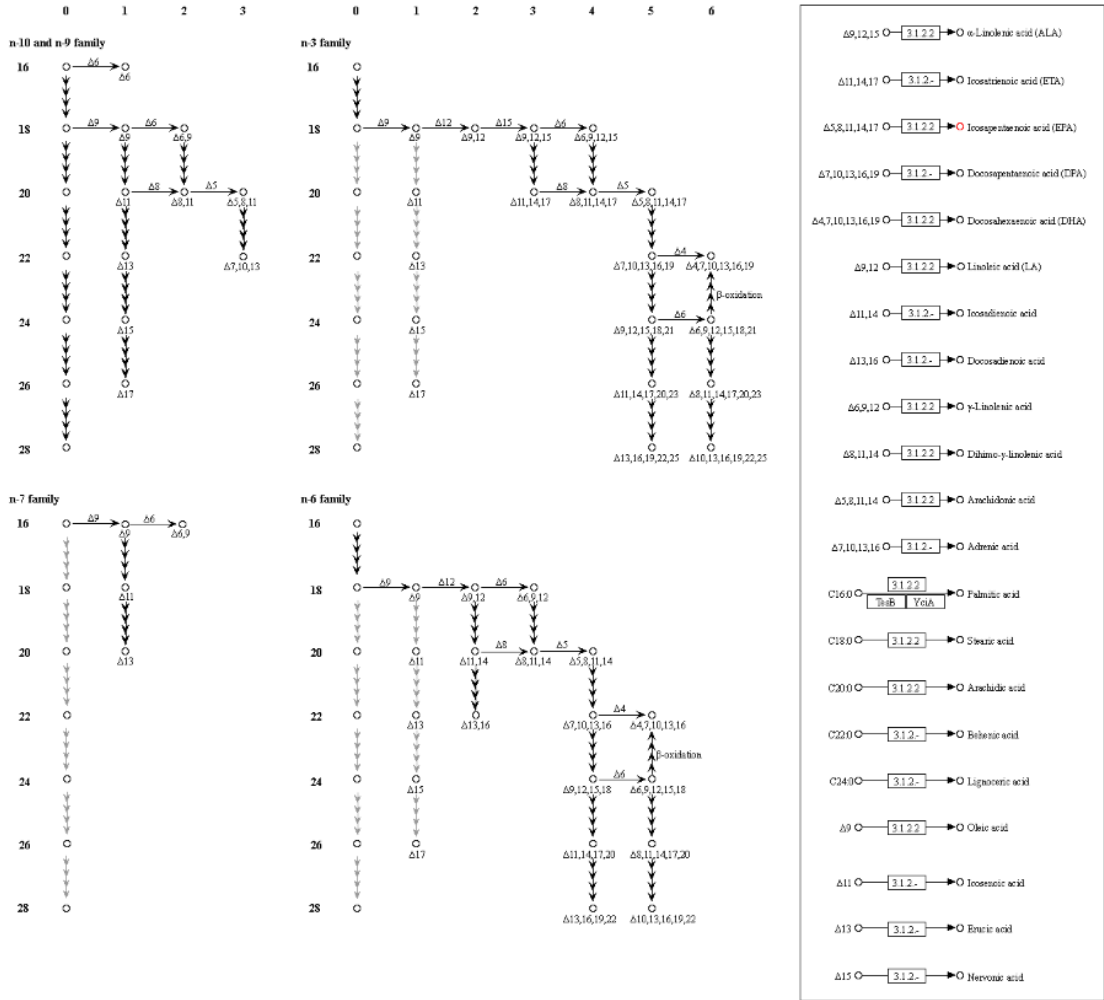
Şekil 4.57 Miristoleik asit ilişkili biyoyolak

GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI) - ANCHOR BIOSYNTHESIS

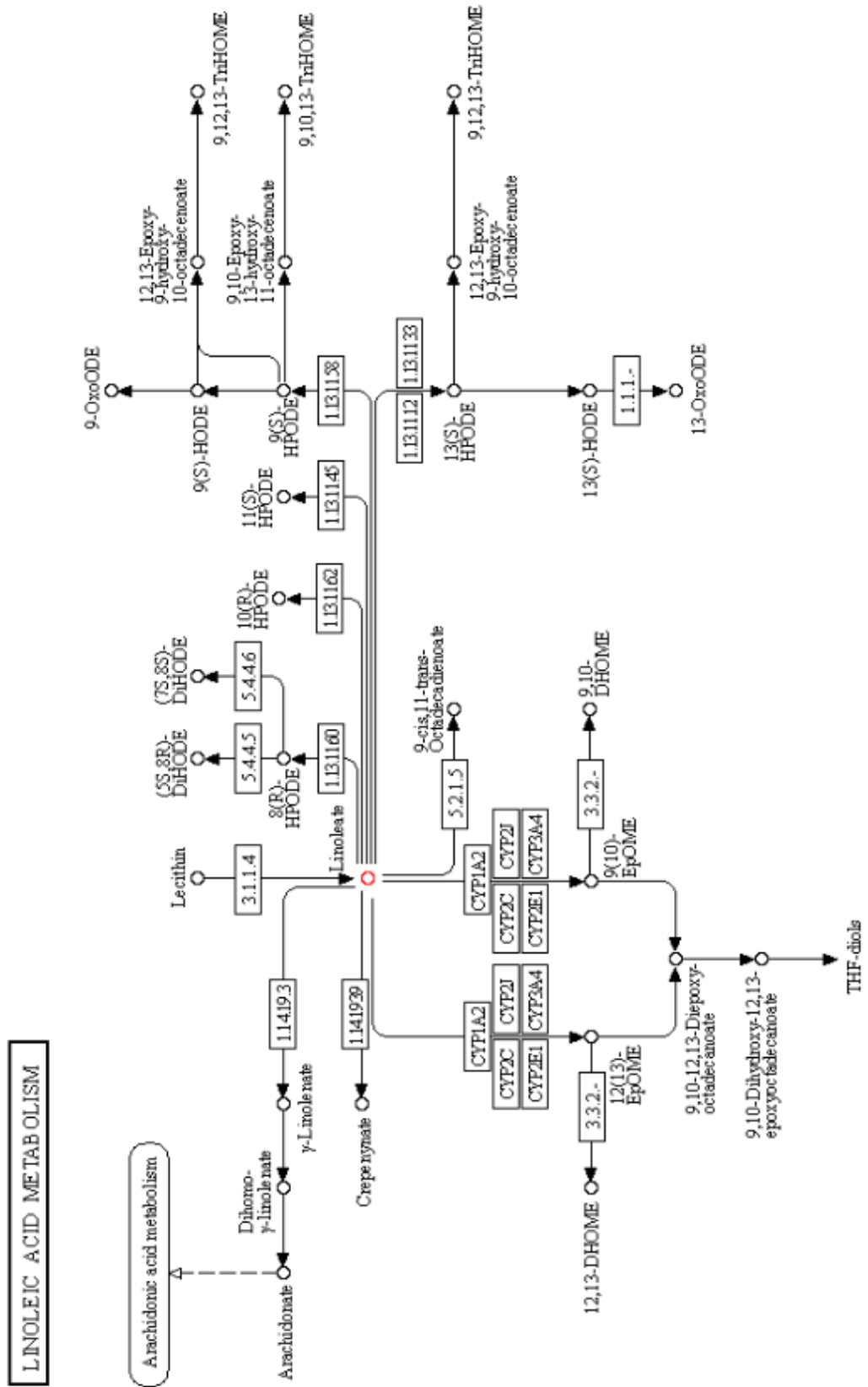


Şekil 4.59 Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) ilişkili biyoyolak

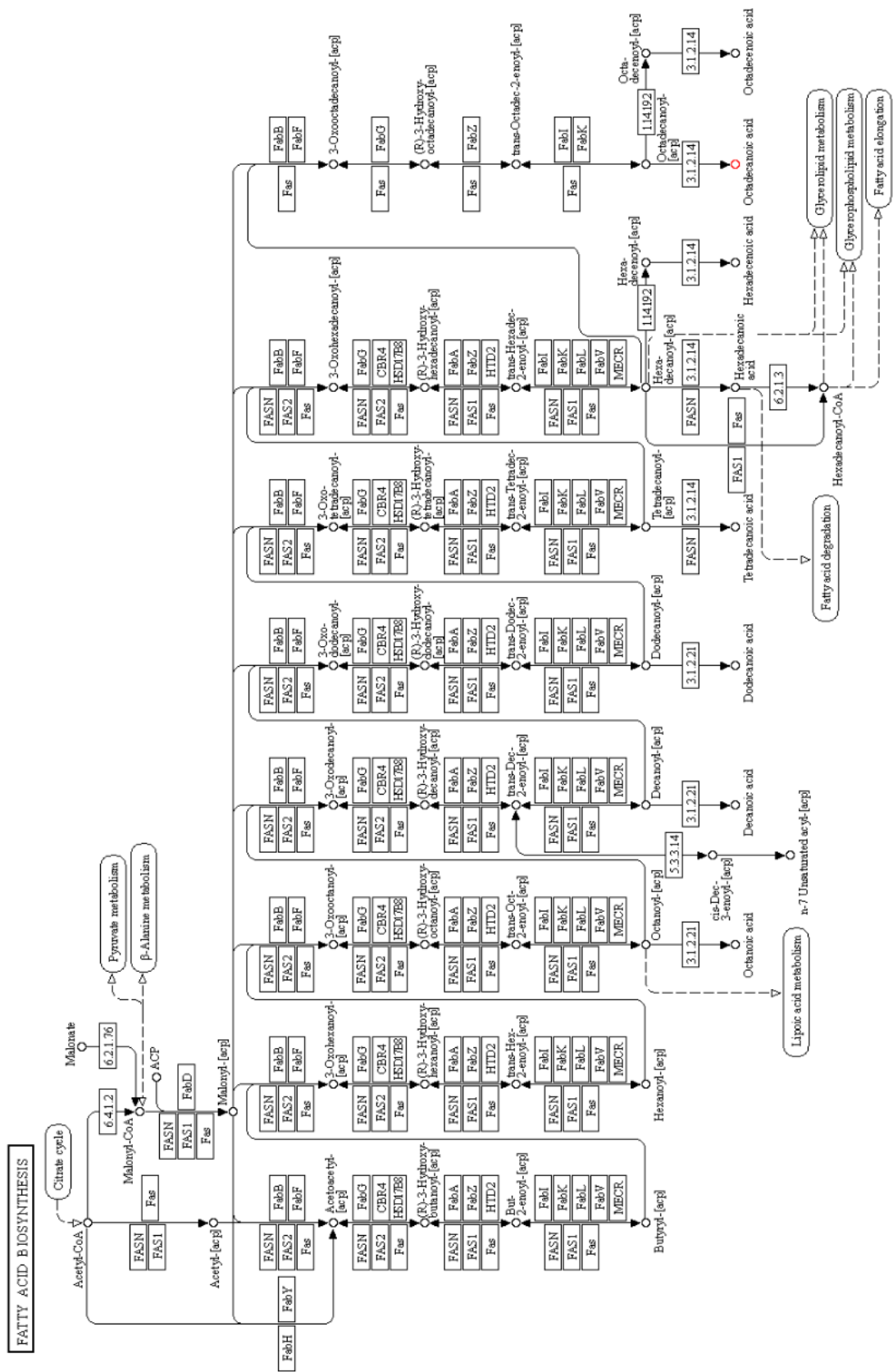
BIOSYNTHESIS OF UNSATURATED FATTY ACIDS



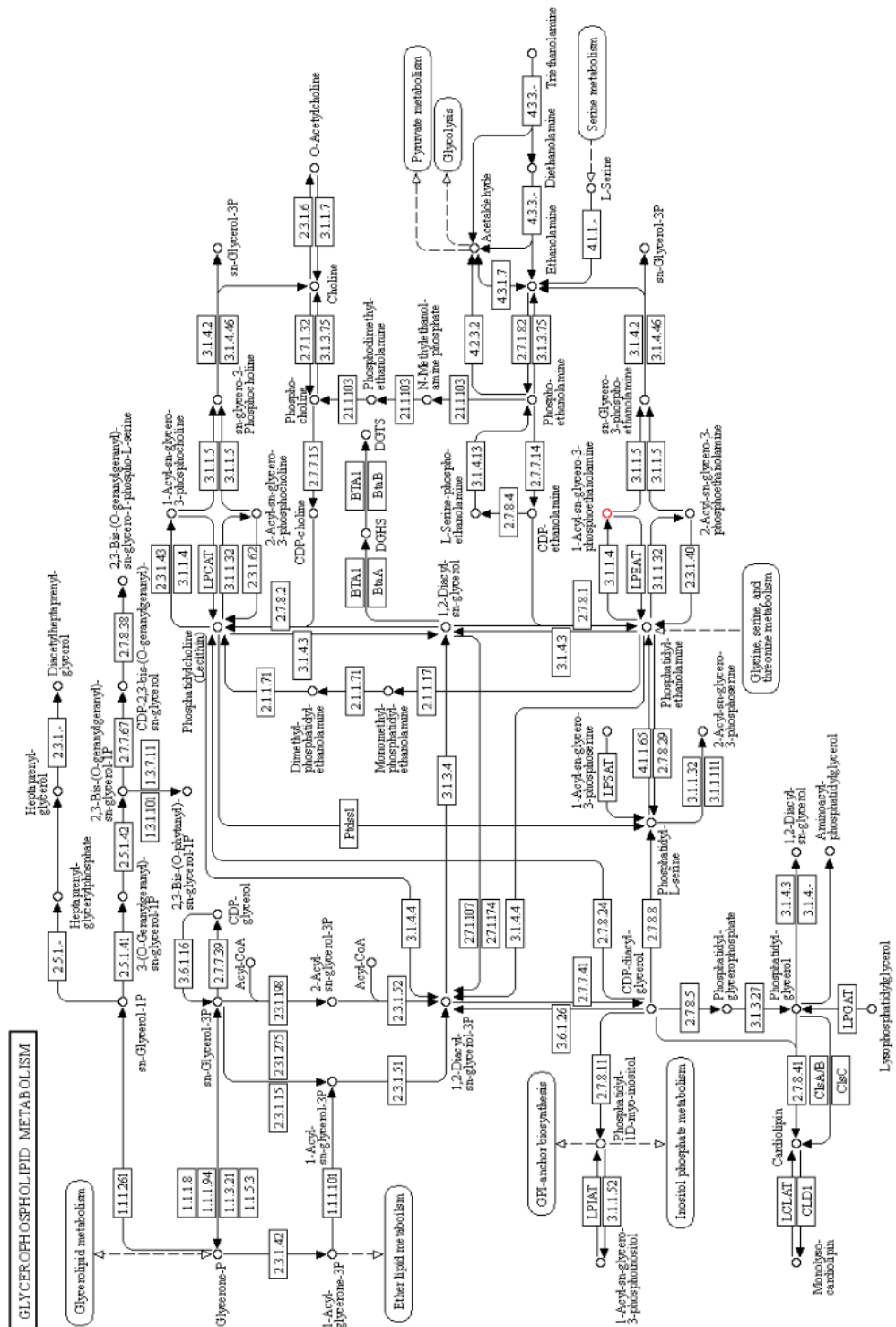
Şekil 4.61 Eikosapentaenoik asit ilişkili biyoyolak



Şekil 4.62 Linoleik asit ilişkili biyoyolak



Şekil 4.63 Stearik asit ilişkili biyoyolak



Şekil 4.64 L-2-Lizofosfatidiletanolamin ilişkili biyoyolak

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer kanseri, 2025 yılına kadar tahmini 1 milyondan fazla vaka insidansı ile küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Karaciğerin birincil kanseri olan HSK ise, genel olarak kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmekte olup karaciğerin primer bir tümörü olarak tanımlanmaktadır. Kronik hepatit B ve C virüsü enfeksiyonu, karaciğer sirozu, gıda ile alınan aflatoksin B1, doğum kontrol hapı, sigara ve alkol kullanımı ile bazı nadir görülen genetik geçişli hastalıklar (hemokromositozis, alfa1 antitripsin eksikliği, ataksi-telenjiyektazi, tirozinemi vb.) HSK gelişimi için risk oluşturmaktadır (Forner vd. 2012). Erken dönemlerde fark edilmesi zor bir olgu olan HSK'nın tespiti genellikle rutin kontroller sırasında istenen incelemeler (ultrasonografik incelemeler gibi) sırasında olmaktadır (Kumar vd. 2015). Tedavide başarı tümörün büyüklüğü, yayılımı, beraberinde eşlik eden siroz-karaciğer yetmezliği derecesine bağlı olmaktadır. HSK'nın tam anlamıyla tedavisi tümörün çıkarılması veya karaciğer nakli ile olabilmektedir (Michelakos vd. 2019). Kemoembolizasyon veya kemoterapi ise uygulanabilecek diğer tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (Cillo vd. 2004). Ancak, tüm bu tedaviler hastaların yaşam kalitesini etkileyebilen yan etkileride beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle, kanser hücreleri üzerinde seçici toksik etki sergileyen yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ve anti-kanser mekanizmalarının aydınlatılmasına halen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda araştırmacılar, gelişmiş hassasiyet ve güvenilirliğe sahip yeni terapötik moleküller ve biyobelirteçlerin keşfine yönelik çalışmalarına devam etmektedir. Bu biyobelirteçlerin daha iyi anlaşılması ve yeni terapötiklerin keşfedilmesi ise iyileşme oranında artış sağlayarak önemli faydalar sağlayabilecektir.

Mikrobiyota; konakçının içinde veya üzerinde yaşayan, birbirleriyle ve aynı zamanda konakçı ile etkileşime giren, karmaşık, dinamik ve heterojen özellikteki mikrobiyal topluluklar için kullanılan kolektif bir terimdir (Chen vd. 2021). 2008 yılında İnsan Genom Projesinin bir uzantısı olarak başlayan "İnsan Mikrobiyom Projesi", insan mikrobiyota üyelerini tanımlamayı ve metatranskriptomik, metabolomik/lipidomik ve immünoproteomik araçları kullanarak mikrobiyota bileşenlerinin insan sağlığı ve hastalıklarındaki rolünü analiz etmeyi hedeflemiştir. Elde edilen veriler kapsamında

bilimsel arenaya sunulan muazzam sonuçlar; mikrobiyotanın ve konak üzerinde önemli rollere sahip olduğuna, mikrobiyotayı oluşturan kommensal ve fırsatçı patojenler arasında bir denge olduğuna, yaşam süresince birçok faktöre bağlı olarak meydana gelebilecek mikrobiyal dengesizliklerin (disbiyoz) ise çeşitli hastalıkların başlangıcı veya ilerlemesi arasında kritik bağlantılara sahip olabileceğine işaret etmektedir (Rizzoli 2018, Ogunrinola vd. 2020). Son yıllarda hızla gelişmekte olan yeni bir stratejik yaklaşım ise kanser hastalarında tekrarlanabilir şekilde değişen onkojenik bir mikrobiyotanın ya da mikrobiyota kaynaklı metabolit/lerin biyo-belirteç veya ilaç adayı olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceği yönündedir (Janney vd. 2020).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar; mikrobiyota üyelerinin ürettiği oldukları benzersiz metabolitler aracılığıyla konak fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde kilit rol oynayabileceğini göstermektedir (Schroeder ve Backhed, 2016). Mikrobiyota-kanser ilişkisi konusunda ivme kazanan araştırmalar ise bağırsak mikrobiyotasında bulunan bazı mikroorganizmaların ve bunlar tarafından üretilen metabolitlerin özellikle kanser altında yatan moleküler mekanizmalarla ilişkili olabileceklerine dikkat çekmektedir (Gagniere vd. 2016, Kostic vd. 2013, Wang vd. 2012, Weir vd. 2013). Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında omiks analizler önem kazanmaya başlamıştır. Mikrobiyota aynı zamanda, tümör mikro çevresinin ortak metabolit rezervuarını besleyen ve etkileyen geniş bir protein salgısı (sekretom) ve metabolit (metabolom) kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu metabolik havuz; büyüme faktörlerini, sitokinleri, proteazları (Barderas vd. 2013) ve aynı zamanda kanserin ilerlemesinde rol oynayan onko-metabolitleri içerebilmektedir (Collins vd. 2017). Doğal mikrobiyota veya disbiyozis sonucu oluşan mikrobiyota ise, bu tür metabolitler için temel bir kaynak oluşturabilmektedir. Bazı dışkı metabolitleri (asetat ve bütirat, fruktoz, linoleik asit ve nikotinik asit gibi metabolitler) sağlıklı bireylere kıyasla kanser hastalarının dışkı metabolomunda daha düşük seviyelerde buldukları için kanserin potansiyel tanılabilir belirteçleri olarak önerilmektedir (Monleon vd. 2009, Phua vd. 2014).

Genel olarak mikroorganizmalar tarafından fermentasyon sürecinde üretilen veya salgılanan maddelere atıfta bulunan şemsiye bir terim olan “postbiyotik”, Yunanca’da

sonra anlamına gelen “post” ve yaşam anlamına gelen “bios” kelimelerinden türetilmiş bir terim olup “biyotik” terimler ailesinin (probiyotikler, prebiyotikler, sinbiyotikler) en yeni üyesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Vinderola vd. 2022). Metabiyotikler, biyojenikler veya basitçe metabolitler olarak konakçıya fizyolojik faydalar sağlayan postbiyotikler arasında bakteriyosinler, enzimler, vitaminler, amino asitler, nörotransmitterler, kısa zincirli yağ asitleri, nitrik oksit, organik asitler, ekzopolisakkaritler, hücre lizatları, teikoik ve lipoteikoik asitler ve peptidoglikan türevli muropeptidler gibi maddeler yer almaktadır (Nataraj vd. 2020). Son yıllarda gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, postbiyotiklerin önemli anti-kanser etkileri olduğunu rapor etmektedir. Özellikle komşu hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini seçici apoptoza yönlendirdikleri için bilim insanlarının büyük ilgisini çeken postbiyotikler, bu etkilerini sinyal yollarını düzenleyerek sergilemektedir (Kim vd. 2021). Probiyotik türevli p8 proteininin anti-proliferasyon aktivitesi, insan kolorektal DLD hücrelerinde analiz edilmiş ve hücre döngüsünün G2 fazında büyümenin durmasıyla sonuçlanan p53-p21-Siklin B1/Cdk1 sinyal yolunun inhibisyonuna aracılık ettiği tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp.’nin hücre içermeyen pentasakkaritinin apoptoza teşvik ederek insan kolorektal kanseri HT-29 hücresinde S-faz hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Elfahri vd. 2016). Hosseini ve arkadaşları (2020), *Lactococcus lactis* kaynaklı nisin insan kolorektal SW480 kanser hücrelerinde *in vitro* siklin D1 ifadesini azalttığını ve antiproliferatif etki sergilediğini rapor etmiştir. Özellikle kolon kanserinde; asetat, bütirat ve propiyonat gibi artan kısa zincirli yağ asitleri seviyelerinin tedavi ile bağlantılı olabileceğine dair ön veriler bulunmaktadır (Kostantinov vd. 2013). Mikrobiyal kaynaklı bütiratın ise onkojenik sinyal yollarını düzenlediği, proinflamatuvar genlerin regülasyonu ve histon deasetilaz inhibisyonu yoluyla tümör büyümesini baskıladığı belirtilmiştir (Chriett vd. 2019, Wu vd. 2018). Elde edilen ön veriler, postbiyotiklerin kanser üzerinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceğine ve tedaviye yönelik doğal yaklaşımlar olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar dahilinde kullanılan postbiyotik üreticileri çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olmalarına rağmen, Spalacidae familyası içerisinde yer alan *Nannospalax* cinsine ait kör fareler mikrobiyotası kaynaklı bir postbiyotik; konak-

mikrobiyota etkileşimlerinin çoklu dinamiklerini araştırmak amacıyla bu çalışma kapsamında ilk kez kullanılmıştır. *Nannospalax* cinsine ait kör fare türleri; olağanüstü uzun yaşam sürelerine rağmen yaşa bağlı açık fenotipik değişiklikler göstermemesi ve spontan tümörler geliştirmemesi nedeniyle yaşlanma ve ayrıca kanser araştırmaları için mükemmel bir model olarak kabul edilmektedir. Son 50 yıldır kör fareler üzerine gerçekleştirilen araştırmalar neticesinde, bugüne kadar tek bir spontan tümör gelişimi vakası kaydedilmemiş olup, bu türlerin deneysel olarak indüklenen karsinogeneze dirençli oldukları belirtilmektedir (Altwasser vd. 2019, Domankevich vd. 2018, Lagunas-Rangel 2018).

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı; kansere dirençli *Nannospalax xanthodon* türünün bağırsak mikrobiyotasından izole edilen ve *Lactiplantibacillus animalis* olarak tanımlanan bakteriden fermantasyon neticesinde elde edilen postbiyotiklerin içeriklerini ve karaciğer kanser hücre hattında sergilemiş oldukları seçici-anti kanser etkinin mekanizmasını küresel OMİKS yaklaşımları kullanarak ortaya koymaktır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle postbiyotiklerin içerdiği proteinler, metabolitler ve lipidler analiz edilmiştir. Proteomiks analizler sonucunda, postbiyotiklerin 123 adet protein içerdiği belirlenmiştir. Ancak, gerçekleştirilen biyoinformatik analizler neticesinde veri bankalarıyla eşleşen proteinlerin anti-kanser ilişkili yollarla bağlantısı tespit edilememiştir. Metabolomiks analizler neticesinde, postbiyotikler içerisinde 74 adet metabolit tespit edilmiş olup bunların 12 tanesinin (2-aminoisobutirik asit, laktik asit, sorboz 1-fosfat, triptofil tirozin, D-galaktoz, vitamin B12, vitamin B5, vitamin D2, vitamin K3, α -D-glukoz, gama aminobutirik asit, β -D-fruktoz) yüksek miktarda üretilen metabolitler olduğu ortaya konulmuştur. Gerçekleştirilen lipidomiks analizler neticesinde ise 59 adet lipid tespit edilmiştir. Bunlardan 10 tanesinin (alfa-linolenik asit, behenik asit, araşidonat etil ester, butirat, eikosanoid, gliserol, oktadekanoik asit, pentadekanoik asit, fosfatidil 3-fosfat, fosfatidylinositol 3-fosfat) yüksek miktarda üretilen lipidler olduğu ortaya konulmuştur. Literatür çalışmaları, özellikle mikrobiyal türevli butirik asitin onkojenik sinyal yollarını düzenlediğini, proinflamatuvar genlerin regülasyonu ve histon deasetilaz inhibisyonu yoluyla tümör

büyümesini baskıladığını rapor etmektedir (Wu vd. 2018, Chriett vd. 2019, Foglietta vd. 2014). A, C, E ve D vitaminleri ise çeşitli kanser türlerine karşı koruyucu aktiviteleri nedeniyle insan metabolik koenzimleri olarak önemli kabul edilmektedir. Vitaminlerin bağışıklık fonksiyonunu, antioksidan savunmayı, inflamasyonu, epigenetik düzenlemeyi, hücre davranışını etkileyerek ve DNA hasarına karşı koruma sağlayarak potansiyel etkiler sergiledikleri belirtilmektedir (Talib vd. 2023). B1, B2, B3, B5, B6, B9 ve B12'yi içeren B vitamini bileşiklerinin tümünün ise kanserin önlenmesi ve tedavisinin yanı sıra yan etki yönetiminde de potansiyel olarak faydalı olduğu öne sürülmektedir (Van de Roovaart vd. 2023). Alfa-linolenik asitin yağ asidi sentezini inhibe ederek insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği, invazyon ve metastazı inhibe ederek hücre döngüsünü durdurduğu rapor edilmektedir (Huang vd. 2022). Sitozolik fosfolipaz A2- α 'nın etkisiyle araşidonik asitten türetilen bir aktif biyolipid ailesini temsil eden eikosanoidler, özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri gibi yeni immünoterapilerle birlikte terapötik denemeler için cazip adaylar olarak sunulmaktadır (Johnson vd. 2020). Manivannan ve arkadaşları (2017) oktadekanoik asit metil esterinin diaçilgliserol sentezini durdurarak insan meme kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediğini rapor etmektedir. Gliserolün ise G1/S faz geçişinin inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu aracılığıyla anti-kanser etki sergilediği belirtilmektedir (Sakurai vd. 2011).

Postbiyotiklerin detaylı içerik analizini takiben, postbiyotiklerin seçici anti-kanser etki mekanizmalarını anlayabilmek amacıyla postbiyotiklerle 48 saat birlikte kültüre edilen Hep-40 hücrelerinin sekretomunda bulunan özgül proteinler, metabolitler ve lipidler OMİKS yaklaşımları kullanılarak tespit edilmiştir. Proteomiks analizler neticesinde, Hep-40 hücrelerinin postbiyotiklerle muamelesinden sonra elde edilen sekretomlara özgü 172 adet protein tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler neticesinde, veri bankalarıyla eşleşen proteinlerin 9 tanesinin anti-kanser ilişkili yolaklarla bağlantısı olduğu tespit edilmiştir (Gen isimleri: *YWHAG*, *OGN*, *TPM4*, *Robo4*, *PTPRK*, *GSR*, *ApoA-I*, *ALB*, *BRCA-2*). *BRCA-2* hücre döngüsü düzenlenmesi, DNA onarım mekanizması ve diğer metabolik süreçlerde işlev gören tümör baskılayıcı bir gen olarak tanımlanmaktadır. *BRCA-2* proteinleri ise çift sarmallı DNA kırıklarını onarmak için gerekli diğer temel proteinlerle etkileşime giren 1863 amino asit kalıntısı içeren bir proteindir (Balogun vd. 2021). Xu ve arkadaşları (2019) tarafından gerçekleştirilen bir

çalışmada, aşırı ifade edilen *OGN*'nin kanser hücre hatlarının hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu, migrasyonunu ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmektedir. Elde edilen veriler, *OGN*'nin tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. Mao ve arkadaşları (2022), *YWHAG* gen ürününün servikal kanser hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını etkilemek için HIF-1 α ile etkileşime girebildiğini belirtmektedir. Robo-4 proteini ise anti-kanser etkinliği rapor edilen bir diğer proteindir (Pircher vd. 2019). Cho ve arkadaşları (2022), *ALB* gen ürününün (Albumin), tümör hedefli dağıtım için anti-kanser ilaçların farmakokinetik profillerini iyileştirerek doğal bir ilaç taşıyıcısı olarak dikkate değer bir umut vaat ettiğini belirtmektedir. Eksojen veya endojen albümin uygulaması anti-kanser ilaçların dolaşımdaki yarı ömürlerini artırmakta ve gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi ile tümörleri pasif olarak hedefleyebilmektedir.

Bu nedenle, albümin bazlı ilaç dağıtımını çeşitli klinik öncesi modellerde güçlü bir anti-tümör etkinliğine yol açmaktadır. Georgila ve arkadaşları (2019) ise, *ApoA-I*'in kanser patogeneğinde anti-inflamatuvar ve immün-modülatör mekanizmaları içeren daha doğrudan bir tümör baskılayıcı role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Metabolomiks analizler neticesinde, Hep-40 hücrelerinin postbiyotiklerle muamelesinden sonra elde edilen sekretomlara özgü 25 adet metabolit tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler neticesinde, veri bankalarıyla eşleşen metabolitlerin 9 tanesinin anti-kanser ilişkili yollarla bağlantısı olduğu tespit edilmiştir (agmatine, sistein, histamin, L-sitrulin, L-ornithin, spermedin, vitamin B6, vitamin D3, vitamin E-alfa tokoferol formu). E vitamininin alfa tokoferol izoformları üzerine yapılan klinik öncesi araştırmalar, anti-kanser etkileri konusunda umut verici veriler ortaya koymaktadır (Abraham vd. 2019). *İn vitro* ve *in vivo* hayvan modeli çalışmaları D vitamininin anti-tümör etkilerini açıkça göstermektedir (Matsuo ve Sadzuka 2019). Spermedinin spesifik olarak tümör hücre döngüsüne müdahale ederek tümör hücre çoğalmasını engellediği ve tümör büyümesi baskıladığı belirtilmektedir. Ayrıca, temel onkolojik yolları düzenleyerek otofajiyi tetiklediği rapor edilmektedir. Spermidin gibi poliaminlerin alımının artması, anti-kanser immün gözetim ve poliamin metabolizmasının düzenlenmesindeki rolü nedeniyle onkogenezi baskılayabilmekte ve tümörlerin büyümesini yavaşlatabilmektedir (Prasher vd. 2023). Histamin üreten bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresindeki önemli eylemleri göz önüne alındığında

ise kanser gelişimi ve ilerlemesi bağlamında histamin ve histamin reseptörlerinin önemli immünomodülatör rolleri olabileceğine dikkat çekilmektedir (Saralosa vd. 2021). Sisteinin ise redoks düzenlemesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Min vd. 2023). Wang ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise agmatin nakledilen melanom tümör modelinde hücre içi poliamin içeriğinin azalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinin proliferasyonunun önemli oranda inhibe edildiği rapor edilmektedir.

Lipidomiks analizler neticesinde, Hep-40 hücrelerinin postbiyotiklerle muamelesinden sonra elde edilen sekretomlara özgü 15 adet lipid tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler neticesinde, veri bankalarıyla eşleşen bu lipidlerin tamamının anti-kanser ilişkili yollarla bağlantısı olduğu tespit edilmiştir (Fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, 1-Fosfatidil-D-miyo-inositol, 1-Asil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin, fosfatidik asit, 1-Asil-sn-glisero-3-fosfat, sfingomiyelin, sfingozin, GM2, glikozilfosfatidilinositol fosfolipaz D, araşidonik asit, eikosapentaenoik asit, linoleik asit, miristoleik asit, prostaglandin D2). Wang ve arkadaşları (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada fosfatidilkolinin, apoptoz indüksiyonu ve ardından kaspaz-8 ve -3 indüksiyonları ile hepatik karsinogenezi azalttığı belirtilmektedir. Bizzarri ve arkadaşları (2016) ise, inositollerin PI3K seviyelerini düşürdüğünü, böylece PI3K aktivasyonunun aşağı akışında PKC/RAS/ERK yolunun aktivasyonuna karşı koyduğunu bildirmişlerdir. Bu yolun yukarısında, inositoller FGF ve reseptörü arasındaki ligand etkileşimini ve IGF-II reseptörü ve AP-1 komplekslerini içeren EGF-transdüksiyon süreçlerini bozmaktadır. Bu etki, metaloproteinazlar ve ROCK1/2 salınımı üzerinde inositol kaynaklı inhibisyon ile pekiştirilmektedir. Genel olarak, bu etkiler inositollerin hücre iskeleti mimarisini yeniden şekillendirmesini sağlamaktadır. Li ve arkadaşları (2022) sfingolipidlerin genellikle kanser hücresi büyümesini ve göçünü inhibe etmenin yanı sıra otofaji ve apoptozu indükleyerek antiproliferatif tepkilere aracılık ettiklerini belirtmektedir. Literatür araştırmaları; GM2'nin hem terapötik hem de biyobelirteç olarak kullanılabilir iki yönlü bir lipid olduğunu bildirilmektedir (Nakamura vd.1999). Kanser hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar ise dokosaheksaenoik asitin ve araşidonik asitin anti-tümörijenik etkilerini ortaya koymaktadır (Bae vd. 2020). Lu ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, linoleik asitin yüksek

konsantrasyonlarda (300 μ M'nin üzerinde) tümör hücre büyümesini inhibe ettiği, düşük konsantrasyonların (100-200 μ M) ise proliferasyonu desteklediği belirtilmektedir.

Sonuç olarak, yüksek teknoloji ve yüksek hassasiyet gösteren küresel OMİKS yaklaşımlarının kullanımını neticesinde, kansere dirençli *Nannospalax xanthodon* türünün bağırsak mikrobiyotasından izole edilen ve *Lactiplantibacillus animalis* olarak tanımlanan bakteriden fermantasyon neticesinde elde edilen postbiyotiklerin karaciğer kanseri hücrelerine karşı sergilemiş oldukları seçici anti-kanser etki protein, metabolit ve lipid temelinde ilk kez aydınlatılmıştır. Elde edilen veriler, postbiyotiklerin kontrol hücrelerine kıyasla kanser hücrelerini farklı yollar üzerinden uyardığını ve lipid metabolizmasının etkili olduğunu göstermektedir. Kümülatif olarak değerlendirilen tüm sonuçlar ise, postbiyotiklerin özgün içerikleri ile anti-kanser özellikli terapötik bir ajan olarak kullanım potansiyeli olduğuna dikkat çekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hamid, N.M., Abass, S. A., Mohamed, A.A. and Muneam-Hamid, D. 2018. Herbal management of hepatocellular carcinoma through cutting the pathways of the common risk factors. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107, 1246–1258.
- Abraham, A., Kattoor, A.J., Saldeen, T. and Mehta, J.L. 2019. Vitamin E and its anticancer effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2831–2838.
- Alarcon-Barrera, J.C., Kostidis, S., Ondo-Mendez, A. and Giera, M. 2022. Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1763–1773.
- Altwasser, R., Paz, A. and Korol, A. 2019. The transcriptome landscape of the carcinogenic treatment response in the blind mole rat: insights into cancer resistance mechanisms. *BMC Genomics*, 20, 17–32.
- Aramaki, O., Takayama, T., Matsuyama, Y., Kubo, S., Kokudo, N., Kurosaki, M. and Makuuchi, M. 2023. Reevaluation of Makuuchi's criteria for resecting hepatocellular carcinoma: A Japanese nationwide survey. *Hepatology Research*, 53(2), 127–134.
- Avivi, A., Nevo, E., Cohen, K., Sotnichenko, N., Hercbergs, A., Band, M. and Ashur-Fabian, O. 2014. They live in the land down under: thyroid function and basal metabolic rate in the Blind Mole Rat, *Spalax*. *Endocrine Research*, 39(2), 80–85.
- Bae, S., Kim, M. K., Kim, H.S. and Moon, Y.A. 2020. Arachidonic acid induces ER stress and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Animal Cells and Systems*, 24(5), 260–266.
- Baindara, P., Gautam, A. and Raghava, G. 2017. Anticancer properties of a defensin like class IId bacteriocin Laterosporulin10. *Scientific Reports*, 7, 46541.
- Balogh, J., Victor, D., Asham, E., Burroughs, S., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, M. and Monsour, H. 2016. Hepatocellular carcinoma: A review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3, 41–53.
- Balogun, T.A., Buliaminu, K.D., Chukwudozie, O.S., Tihamiyu, Z.A. and Idowu, T.J. 2021. Anticancer potential of *Moringa oleifera* on BRCA-1 gene: Systems biology. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 11779322211010703.
- Barupal, D.K., Ramos, M.L., Florio, A.A., Wheeler, W.A., Weinstein, S.J., Albanes, D. and McGlynn, K.A. 2024. Identification of pre-diagnostic lipid sets associated with liver cancer risk using untargeted lipidomics and chemical set analysis: A nested case-control study within the ATBC cohort. *International Journal of Cancer*, 154(3), 454–464.

- Birkbak, N.J. and McGranahan, N. 2020. Cancer genome evolutionary trajectories in metastasis. *Cancer Cell*, 37(1), 8–19.
- Bizzarri, M., Dinicola, S., Bevilacqua, A. and Cucina, A. 2016. Broad spectrum anticancer activity of myo-inositol and inositol hexakisphosphate. *International Journal of Endocrinology*, 5616807.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bonini, P., Roupheal, Y., Miras-Moreno, B., Lee, B., Cardarelli, M., Erice, G. and Colla, G. 2020. A microbial-based biostimulant enhances sweet pepper performance by metabolic reprogramming of phytohormone profile and secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 11, 567388.
- Bravi, F., Bosetti, C., Tavani, A., Gallus, S. and La Vecchia, C. 2013. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clinical Gastroenterology, Hepatology*, 11, 1413–1421.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer Clinic*, 68, 394–424.
- Broeckling, C.D., Beger, R., Cheng, L.L., Cumeras, R., Cuthbertson, D., Dasari, S., Davis, W.C., Dunn, W.B., Evans, A., Fernández-Ochoa, A., Gika, H., Goodacre, R., Goodman, K.D., Gouveia, G.J., Hsu, P.C., Kirwan, J.A., Kodra, D., Kuligowski, J., Lan, R.S., Monge, M.E., Moussa, L.W., Nair, S., Reisdorph, N., Sherrod, S.D., Ulmer, C.Z., Vuckovic, D., Yu, L.R., Zhang, B. and Theodoridis, G. 2018. Current practices in LC-MS untargeted metabolomics: A scoping review on the use of pooled quality control samples. *Analytical Chemistry*, 59, 235–240.
- Brooks, G.A. 2020. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biology*, 35, 101454.
- Bujold, A., Massey, C. A., Kim, J. J., Brierley, J., Cho, C., Wong, R. K. and Dawson, L. A. 2013. Sequential phase I and II trials of stereotactic body radiotherapy for locally advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31, 1631–1639.
- Cao, X., Xie, Z., Yang, Y., Whiteman, M., Moore, P.K. and Bian, J. 2019. A review of hydrogen sulfide synthesis, metabolism, and measurement: Is modulation of hydrogen sulfide a novel therapeutic for cancer? *Antioxidant Redox Signal*, 31, 1–38.
- Casanova, M.R., Azevedo-Silva, J., Rodrigues, L.R. and Preto, A. 2018. Colorectal cancer cells increase the production of short-chain fatty acids by *Propionibacterium freudenreichii* impacting on cancer cells survival. *Frontiers in Nutrition*, 25(5), 44.

- Cavicchioli, M.V., Santorsola, M., Balboni, N., Mercatelli, D. and Giorgi, F.M. 2022. Prediction of metabolic profiles from transcriptomics data in human cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3867.
- Chakraborty, U., Dinh, T.A. and Alani, E. 2018. Genomic instability promoted by overexpression of mismatch repair factors in yeast: A model for understanding cancer progression. *Genetics*, 209(2), 439–456.
- Chen, P.G., Lee, S.Y., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., Saxton, J.P., Fleming, P.A. and Suh, J.H. 2005. Use of the Radiation Therapy Oncology Group recursive partitioning analysis classification system and predictors of survival in 19 women with brain metastases from ovarian carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(10), 2174–2180.
- Chen, Y., Wong, P.P., Sjeklocha, L., Steer, C.J. and Sahin, M.B. 2012. Mature hepatocytes exhibit unexpected plasticity by direct dedifferentiation into liver progenitor cells in culture. *Hepatology*, 55(2), 563–574.
- Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. 2021. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Frontiers in Cellular Infection and Microbiology*, 11, 625913.
- Chen, Z.P., Wang, S., Zhao, X., Fang, W., Wang, Z., Ye, H. and Yan, C. 2023. Lipid-accumulated reactions in astrocytes promote disease progression in epilepsy. *Nature Neuroscience*, 26(4), 542–554.
- Cheng, A.L., Kang, Y.K., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J.S. and Guan, Z. 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, 10(1), 25–34.
- Chernykh, A., Kawahara, R. and Thaysen-Veersen, M. 2021. Towards structure-focused glycoproteomics. *Biochemistry Society Transformation*, 49, 161–186.
- Cheung, N.K., Modak, S., Vickers, A. and Knuckles, B. 2012. Orally administered beta-glucans enhance the anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunology. Immunotherapy*, 51, 557–564.
- Chiang, K. C., Chen, S. C., Yeh, C. N., Pang, J. H. S., Shen, S. C., Hsu, J. T. and Chen, T. C. 2014. MART-10, a less calcemic vitamin D analog, is more potent than $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ in inhibiting the metastatic potential of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139, 54–60.
- Chriett, S., Dabek, A. and Wojtala, M. 2019. Prominent action of butyrate over β -hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Scientific Reports*, 9, 742.

- Cho, H., Jeon, S.I., Ahn, C.H., Shim, M.K. and Kim, K. 2022. Emerging albumin-binding anticancer drugs for tumor-targeted drug delivery: Current understandings and clinical translation. *Pharmaceutics*, 14(4), 728.
- Civelek, İ., Kankılıç, T. and Akın, F. 2023. Investigation of clock gene variations in *Nannospalax* cytotypes. *International Conference on Pioneer and Innovative Studies*, 1, 425–430
- Cobbaert, C.M., Althaus, H., Begcevic Brkovic, I., Ceglarek, U., Coassin, S., Delatour, V. and IFCC Working Group for Standardization of Apolipoproteins by Mass Spectrometry. 2021. Towards an SI-traceable reference measurement system for seven serum apolipoproteins using bottom-up quantitation proteomics: Conceptual approach enabled by cross-disciplinary/cross-sector collaboration. *Clinical Chemistry*, 67(3), 478–489.
- Collins, R.R.J., Patel, K., Putnam, W.C., Kapur, P. and Rakheja, D. 2017. Oncometabolites: A new paradigm for oncology, metabolism, and the clinical laboratory. *Clinical Chemotherapy*, 63(12), 1812–1820.
- Cong, J., Wang, X., Zheng, X., Wang, D., Fu, B., Sun, R. and Wei, H. 2018. Dysfunction of natural killer cells by FBP1-induced inhibition of glycolysis during lung cancer progression. *Cell Metabolism*, 28(2), 243–255.
- Costantini, S., Di Gennaro, E., Capone, F., De Stefano, A., Nasti, G., Vitagliano, C. and Budillon, A. 2023. Plasma metabolomics, lipidomics and cytokinomics profiling predict disease recurrence in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *Frontiers in Oncology*, 12, 1110104.
- Cords, L., Tietscher, S., Anzeneder, T., Langwieder, C., Rees, M., de Souza, N. and Bodenmiller, B. 2023. Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data. *Nature Communications*, 14(1), 4294.
- Cox, C.R., Lynch, S., Goldring, C. and Sharma, P. 2020. Current perspective: 3D spheroid models utilizing human-based cells for investigating metabolism-dependent drug-induced liver injury. *Frontier Medicine Technology*, 2, 611913.
- Domankevich, V., Eddini, H., Odeh, A. and Shams, I. 2018. Resistance to DNA damage and enhanced DNA repair capacity in the hypoxia-tolerant blind mole rat *Spalax carmeli*. *Journal of Experimental Biology*, 221.
- Das, T., Verieux, G., Ahmed, M. and Chakraborty, S. 2020. Integration of online omics-data resources for cancer research. *Frontiers in Genetic*, 11, 578345.
- Daviss, B. 2005. Growing pains for metabolomics: the newest omic science is producing results and more data than researchers know what to do with. *The Scientist*, 19(8), 25–29.

- Debebe, T., Biagi, E., Soverini, M., Holtze, S., Hildebrvet, T.B., Birkemeyer, C. and Birkenmeier, G. 2017. Unraveling the gut microbiome of the long-lived naked mole-rat. *Scientific Reports*, 7(1), 9590.
- Deepak, V., Ramachveran, S., Balahmar, R.M., Pveian, S.R.K., Sivasubramaniam, S.D., Nellaiah, H. and Sundar, K. 2016. *In vitro* evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 52, 163–173.
- De la Fouchardiere, C. 2018. Regorafenib in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Future Oncology*, 14, 2239–2246,
- Dun, Y., Li, Y., Xu, J., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y. and Zhao, S. 2019. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 420–426.
- Dettmer, K., Aronov, P.A. and Hammock, B.D. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51–78.
- Doll, S., Gnad, F. and Mann, M. 2019. The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine. *Proteomics–Clinica Applications*, 13(2), 1800113.
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T.M., Bunger, M.K. and Bultman, S.J. 2011 The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolom*, 13, 517–526.
- Donohoe, D.R., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W. and Bultman, S.J. 2012. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell*, 48, 612–626.
- Dos Santos Cotrim, G., da Silva, D.M., da Graça, J.P., de Oliveira Junior, A., de Castro, C., Zocolo, G.J. and Hoffmann-Campo, C.B. 2023. Glycine max (L.) Merr. metabolome responses to potassium availability. *Phytochemistry*, 205, 113472.
- Dun, Y., Li, Y., Xu, J., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y. and Zhao, S. 2019. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 420–426.
- Dupree, E.J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B.A. and Darie, C.C. 2020. A critical review of bottom-up proteomics: the good, the bad, and the future of this field. *Proteomes*, 8(3), 14.
- European Association for the Study of the Liver. 2018. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69, 182–236
- Eckert, M.A., Coscia, F., Chryplewicz, A., Chang, J.W., Hernveez, K.M., Pan, S. and Lengyel, E. 2019. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature*, 569(7758), 7232018.728.

- Elfahri, K.R., Vasiljevic, T., Yeager, T. and Donkor, O.N. 2018. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal Dairy Science*, 99(1), 31–40.
- Elmas, A., Lujambio, A. and Huang, K.L. 2022. Proteomic analyses identify therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 814120.
- Far, F.B., Rabie, D., Hemati, P., Fooladpanjeh, P., Faal Hamedanchi, N., Broomand L.N., Karimi Rouzbahani, A. and Naimi-Jamal, M.R. 2023. Unresectable hepatocellular carcinoma: A review of new advances with a focus on targeted therapy and immunotherapy. *Livers*, 3, 1212018.160.
- Fay, J.R., Steele, V. and Crowell, J.A. 2009. Energy homeostasis and cancer prevention: The AMP-activated protein kinase. *Cancer Preview*, 2, 301–309.
- Far, F.B., Rabie, D., Hemati, P., Fooladpanjeh, P., Faal Hamedanchi, N., Broomand Lomer, N., Karimi Rouzbahani, A. and Naimi-Jamal, A. 2023. Unresectable hepatocellular carcinoma: a review of new advances with focus on targeted therapy and immunotherapy, *MDPI Livers*, 3, 121–160.
- Faubert, B., Solmonson, A. and DeBerardinis, R.J. 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487), 5473.
- Fernandez, J., Kimberly J., Harmon C. and O'Farrelly C. 2019. Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4131.
- Ferreira, R.G., Cardoso, M.V., de Souza Furtado, K.M., Espíndola, K.M.M., Amorim, R.P. and Monteiro, M. C. 2019. Epigenetic alterations caused by aflatoxin b1: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma. *Translational Research*, 204, 51–71.
- Ferraro, D. and Zalcborg, J. 2014. Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors: Clinical evidence and place in therapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6, 222–228.
- Florin, T., Neale, G., Gibson, G.R., Christl, S.U. and Cummings, J.H. 1991. Metabolism of dietary sulphate: Absorption and Excretion in Humans, 32, 766–773.
- Foglietta, F., Serpe, L., Canaparo, R., Vivenza, N., Riccio, G., Imbalzano, E., and Zara, G. P. 2014. Modulation of butyrate anticancer activity by solid lipid nanoparticle delivery: an in vitro investigation on human breast cancer and leukemia cell lines. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 231–247.
- Fong, W., Li, Q. and Yu, J. 2020. Gut microbiota modulation: A novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*, 39, 4925–4943.
- Forner, A., Vilana, R., Ayuso, C., Bianchi, L., Solé, M., Ayuso, J. R. and Bruix, J. 2008. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: prospective

- validation of the noninvasive and diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47(1), 97–104.
- Forner, A., Llovet, J.M. and Bruix, J. 2012. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 379 (9822), 1245–1255
- Fu, X. and Calin, G.A. 2018. miR-122 and hepatocellular carcinoma: from Molecular biology to therapeutics. *EBioMedicine*, 37,17–28.
- Garcia-Aloy, M., Ulaszewska, M., Franceschi, P., Estruel-Amades, S., Weinert, C.H., Tor-Roca, A. and Veres-Lacueva, C. 2020. Discovery of intake biomarkers of lentils, chickpeas, and white beans by untargeted LC–MS metabolomics in serum and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 64(13), 1901137.
- Gagnieere, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.A., Pezet, D. And Bonnet, M. 2016. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 22(2), 501–518.
- Georgila, K., Vyrla, D. and Drakos, E. 2019. Apolipoprotein AI (ApoA-I), immunity, inflammation and cancer. *Cancers*, 11(8), 1097.
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A. and Wilson, I.D. 2012. Application of UHPLC-MS to Metabolomic/metabonomic Studies in Man. *UHPLC in Life Sciences*, (16), 387.
- Globocan. 2022. Web Sitesi: <https://gco.iarc.fr/>, Erişim Tarihi: 28.02.2024
- Guglielmi, A., Ruzzenente, A., Valdegamberi, A., Pachera, S., Campagnaro, T., D’Onofrio, M. and Iacono, C. 2008. Radiofrequency ablation versus surgical resection for the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12, 192–198.
- Goodacre R. 2005. Metabolomics a way forward. *Metabolomics*, 1(1), 1–2.
- Gonçalves, P. and Martel, F. 2018. Butyrate and colorectal cancer: The role of butyrate transport. *Current Drug Metabolism*, 14, 994–1008
- György, M.V. 2004. Proteomics principles and challenges. *Pure Applicable Chemistry*, 76(4), 829–837.
- Han, X. and Gross, R.W. 2003. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 44 (6), 1071–1079.
- Han, X. 2007. Neurolipidomics: challenges and developments. *Frontier in Bioscience*, 12(2), 2601–2615.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K. and Brooks, G.A. 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(10), 2602–2612.

- Holman, J.D., Tabb, D.L. and Mallick, P. 2014. Employing ProteoWizard to convert raw mass spectrometry data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 46(1), 1324.
- Hosseini S.S., Goudarzi H., Ghalavand Z., Hajikhani B., Rafeieiatani Z. and Hakemi-Vala M. 2018. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of *Lactococcus lactis* and nisin through down-regulation of cyclin D1 on SW480 colorectal cancer cell line. *Iran Journal of Microbiology*, 12(5), 424–430.
- Hosseini, S.S., Goudarzi, H., Ghalavand, Z., Hajikhani, B., Rafeieiatani, Z. and Hakemi-Vala, M. 2020. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of *Lactococcus lactis* and nisin through down-regulation of cyclin D1 on SW480 colorectal cancer cell line. *Iranian Journal of microbiology*, 12(5), 424-430.
- Huang, A., Yang, X.R., Chung, W.Y., Dennison, A.R. and Zhou, J. 2008. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Signal Transduction Target*, 5, 1–13.
- Huang, W., Guo, X., Wang, C., Alzhan, A., Liu, Z., Ma, X. and Shu, Q. 2022. α -Linolenic acid induces apoptosis, inhibits the invasion and metastasis, and arrests cell cycle in human breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase. *Journal of Functional Foods*, 92, 105041.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F. and Mehal, W.Z. 2014. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*, 146, 1763–1774
- Hong, F., Hansen, R.D., Yan, J., Allendorf, D.J., Baran, J.T., Ostroff, G.R. and Ross, G.D. 2003. Glucan Functions as an Adjuvant for Monoclonal Antibody Immunotherapy by Recruiting Tumorcidal Granulocytes as Killer Cells. *Cancer*, 63, 9023–9031.
- Janney, A., Powrie, F., Mann, E.H. 2020. Host–microbiota maladaptation in colorectal cancer. *Nature*, 585, 509–517.
- Jepsen, P., Ott, P., Veersen, P.K., Sørensen, H.T. and Vilstrup, 2013. H. Risk for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Annals of Internal Medicine*, 156, 841.
- Jin, M.Z., and Jin W.L. 2005. The updated livescape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Therapy*, 5, 166.
- Johnson, A.M., Kleczko, E.K. and Nemenoff, R.A. 2020. Eicosanoids in cancer: new roles in immunoregulation. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 595498.
- Jordan, K.W., Nordenstam, J., Lauwers, G.Y., Rothenberger, D.A., Alavi, K., Garwood, M. and Cheng, L.L. 2009. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Diseases of the Colon and Rectum*, 52(3), 520.

- Kalra, A., Yetiskul E., Chase, J. and Wehrle, T. 2024. Physiology, Liver. Stat Pearls Publishing, 1(1), 13–16.
- Kanwal, F., Kramer, J., Asch, S. M., Chayanupatkul, M., Cao, Y. and El-Serag, H.B. 2017. Risk of hepatocellular cancer in HCV patients treated with direct-acting antiviral agents. *Gastroenterology*, 153(4), 996–1005.
- Kanwal, F., Kramer, J.R., Mapakshi, S., Natarajan, Y., Chayanupatkul, M., Richardson, P.A. and El-Serag, H.B. 2018. Risk of hepatocellular cancer in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 155(6), 1828–1837.
- Karademir, S. 2018. Staging of hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Resudials*, 4, 58.
- Katajamaa, M., Miettinen, J. and Oresic, M. 2006. MZmine: A toolbox for processing and visualization of mass spectrometry-based molecular profile data. *Bioinformatics*, 22(5), 634–636.
- Kawai, T. and Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373–384.
- Kawai-Kitahata, F., Asahina, Y., Tanaka, S., Kakinuma, S., Murakawa, M., Nitta, S. and Watanabe, M. 2016. Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. *Journal of Gastroenterology*, 51, 473–486.
- Kew, M.C. 2013. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Liver Diseases*, 22, 305–10.
- Kim, Y., Lee, D., Kim, D., Cho, J., Yang, J., Chung, M., Kim, K. and Ha, N. 2008. Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. *Archives in Pharmacology*, 31, 468–473.
- Kim, M.H., Kwon, S.Y., Woo, S.Y., Seo, W.D. and Kim, D.Y. 2021. Antioxidant effects of chrysoeriol via activation of the Nrf2 signaling pathway and modulation of mitochondrial function. *Molecules*, 26(2), 313.
- Kim, S., Kim, S.A., Han, J. and Kim, I. 2021. Rho-Kinase as a target for cancer therapy and its immunotherapeutic potential. *International Journal of Molecular Science*, 22(23), 12916.
- Klose, C., Surma, M.A., Gerl, M.J., Meyenhofer, F., Shevchenko, A. and Simons, K. 2012. Flexibility of a eukaryotic lipidome—insights from yeast lipidomics. *PLoS One*, 7(4), e35063.
- Kohn, C.G., Singh, P., Korytowsky, B., Caranfa, J.T., Miller, J.D., Sill, B.E. and Parikh, N.D. 2019. Humanistic and economic burden of hepatocellular carcinoma: systematic literature review. *The American Journal of Managed Care*, 25(2), 61–73.

- Kojro, M., Wanless, I. R., Alves, V., Badve, S., Balabaud, C. and Bedossa, P. 2009. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*, 49(658), 64
- Konishi, H., Fujiya, M., Tanaka, H., Ueno, N., Moriichi, K., Sasajima, J. and Kohgo, Y. 2016. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nature Communications*, 7(1), 12365.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S.C., Singh, S.K. and Valence, F. 2008. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Natural of Science USA*, 105, 19474–19479.
- Konstantinov, S.R., Kuipers, E.J. and Peppelenbosch, M.P. 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10, 741–745.
- Konturek, P.C., Harsch, I.A., Konturek, K., Schink, M., Konturek, T., Neurath, M.F. and Zopf, Y. 2018. Gut–liver axis: how do gut bacteria influence the liver? *Medical Sciences*, 6(3), 79.
- Kostic, A.D., Chun, E., Meyerson, M. Adn Garrett, W.S. 2013. Microbes and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Immunology Researches*, 1(3), 150–157.
- Kostidis, S., Sanchez-Lopez, E. and Giera, M. 2023. Lipidomics analysis in drug discovery and development. *Current Opinion in Chemical Biology*, 72, 102256.
- Kudra A., Kazalmierczak-Siedlecka K., Sobocki B.K., Muszynalski D., Polom J., Carbone L., Marano L., Roviello F., Kalinowski L. and Stachowska E. 2023. Postbiotics in oncology: science or science fiction? *Frontiers in Microbiology*, 14, 1182547.
- Lagunas-Rangel, F.A. 2018. Antimicrobial susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infections in Mexico: Single-centre experience with 10 years of results. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 90–94.
- Le Gouellec, A., Plazy, C. and Toussaint, B. 2023. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow? *Frontier in Analytical Science*, 3, 1142606.
- Lee, Y. C. A., Cohet, C., Yang, Y. C., Stayner, L., Hashibe, M. and Straif, K. 2009. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *International Journal of Epidemiology*, 38(6), 1497–1511.
- Lee, Y. S., Kim, T.Y., Kim, Y., Lee, S. H., Kim, S., Kang, S.W. and Kweon, M.N. 2018. Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development. *Cell Host and Microbe*, 24(6), 833–846.

- Li, J., Wang, J., Yang, Y., Cai, P., Cao, J., Cai, X. and Zhang, Y. 2020. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1–7.
- Li, R.Z., Wang, X.R., Wang, J., Xie, C., Wang, X.X., Pan, H.D. and Leung, E.L.H. 2022. The key role of sphingolipid metabolism in cancer: New therapeutic targets, diagnostic and prognostic values, and anti-tumor immunotherapy resistance. *Frontiers in Oncology*, 12, 941643.
- Liang, L., Zhao, L., Wang, Y. and Wang, Y. 2013. Treatment for hepatocellular carcinoma is enhanced when norcantharidin is encapsulated in exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular Pharmacology*, 18, 1003–1013.
- Lin, C.W., Lin, C.C., Mo, L.R., Chang, C.Y., Perng, D.S., Hsu, C.C. and Yang, S.S. 2013. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 58(4), 730–735.
- Liu, B., Allendorf, D.J., Hansen, R., Marroquin, J., Ding, C., Cramer, D.E. and Yan, J. 2006. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Immunology*, 177, 1661–1669.
- Liu, C.X., Guo, S.K., Nan, F., Xu, Y.F., Yang, L. and Chen, L.L. 2022. RNA circles with minimized immunogenicity as potent PKR inhibitors. *Molecular Cell*, 82(2), 420–434.
- Liu, E.Y. and Ryan, K.M. 2012. Autophagy and cancer—issues we need to digest. *Journal of Cell Science*, 125, 2349–2358.
- Liu, J., Gunn, L., Hansen, R. and Yan, J. 2009. Combined yeast-derived beta-glucan with anti-tumor monoclonal antibody for cancer immunotherapy. *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 208–214.
- Liu, Y., Zhang, L., Chang, R. and Yan, X. 2022. Supramolecular cancer photoimmunotherapy based on precise peptide self-assembly design. *Chemical Communication*, 58, 2247–2258.
- Llovet, J.M., Bru, C. and Bruix, J. 2008. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in Liver Diseases*, 19, 329–338.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F. and Bruix, J. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390.
- Llovet, J. M., De Baere T., Kulik L., Haber P.K., Greten T.F., Meyer, T. and Lencioni R. 2020. Locoregional therapies in the era of Molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. *National Review Gastroenterology*, 75(2), 56–79.

- Lu, X., Yu, H., Ma, Q., Shen, S. and Das, U.N. 2010. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids in Health and Disease*, 9, 1–11.
- Luo, S., Li, Z., Mao, L., Chen, S. and Sun, S. 2019. Sodium butyrate induces autophagy in colorectal cancer cells through LKB1/AMPK signaling. *Journal Physiology Biochemistry*, 75, 53–63.
- Macklin, A., Khan, S. and Kislinger, T. 2020. Recent advances in mass spectrometry-based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clinical Proteomics*, 17, 1–25.
- Mahn, R., Vogt, A., Kupczyk, P., Sadeghlar, F., van Beekum, K., Hüneburg, R., Meyer, C., Toma, M., Ahmadzadehfar, H. and Essler, M. 2020. Programmed cell death protein 1 (PD-1)-inhibition in hepatocellular carcinoma (HCC): A single-center experience. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 55, 1057–1062.
- Malavolta, M., Bocci, F., Boselli, E. and Frega, N.G. 2008. Normal phase liquid chromatography–electrospray ionization the mass spectrometry analysis of phospholipid Molecular species in blood mononuclear cells: application to cystic fibrosis. *Journal of Chromatography*, 810(2), 173–186.
- Malik, A. N., Czajka, A. and Cunningham, P. 2016. Accurate quantification of mouse mitochondrial DNA without co-amplification of nuclear mitochondrial insertion sequences. *Mitochondrion*, 29, 59–64.
- Manivannan, P., Muralitharan, G., and Balaji, N.P. 2017. Prediction aided in vitro analysis of octa-decanoic acid from *Cyanobacterium lyngbya* sp. as a proapoptotic factor in eliciting anti-inflammatory properties. *Bioinformatics*, 13(9), 301.
- Mansouri, V., Razzaghi, M., Nikzamir, A., Ahmadzadeh, A., Iranshahi, M., Haghazali, M. and Hamdieh, M. 2020. Assessment of liver cancer biomarkers. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(11), 29–39.
- Martín-Saiz, L., Abad-Garcia, B., Solano-Iturri, J.D., Mosteiro, L., Martin-Allende, J., Rueda, Y. and Fernández, J. A. 2023. Using the synergy between HPLC-MS and MALDI-MS imaging to explore the lipidomics of clear cell renal cell carcinoma. *Analytical Chemistry*, 95(4), 22852293.
- Marrero, J. A., Kulik, L. M., Sirlin, C. B., Zhu, A. X., Finn, R. S., Abecassis, M. M. and Heimbach, J. K. 2018. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 68(2), 723–750.
- Marzin, K., Kretschmar, G., Luedtke, D., Kraemer, S., Kuelzer, R., Schlenker-Herceg, R., Schmid, U., Schnell, D. and Dallinger, C. 2018. Pharmacokinetics of nintedanib in subjects with hepatic impairment. *Journal of Clinical Pharmacology*, 58, 357–363.

- Mao, Z., Zhong, L., Zhuang, X., Liu, H. and Peng, Y. 2022. Curcumenol targeting YWHAG inhibits the pentose phosphate pathway and enhances antitumor effects of cisplatin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 37(1), 15–16.
- Matsuo, T. and Sadzuka, Y. 2019. In vitro anticancer activities of B6 vitamers: A mini-review. *Anticancer Research*, 39(7), 3429–3432.
- Maucort-Boulch, D., de Martel, C., Franceschi, S. and Plummer, M. 2018. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *International Journal of Cancer*, 142, 2471–2477.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Vereola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F. and Gennari, L. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 693–700.
- McCullough, A.K. and Lloyd, R.S. 1997. Mechanisms underlying aflatoxin-associated mutagenesis - Implications in carcinogenesis. *DNA Repair*, 77, 76–86.
- Mei, L., Du, W., Idowu, M., von Mehren, M. and Boikos, S.A. 2018. Advances and Challenges on Management of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Frontiers in Oncology*, 8, 135.
- Mendez-Sanchez, N., Valencia-Rodriguez, A., Coronel-Castillo, C., Vera-Barajas, A., Contreras-Carmona, J., Ponciano-Rodríguez, G. and Zamora-Valdés, D. 2020. The cellular pathways of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Annals of Translational Medicine*, 8(6), 400.
- Meng X., Li S., Li Y., Gan R. and Li H.B. 2020. Gut microbiota's relationship with liver disease and role in hepatoprotection by dietary natural products and probiotics. *Nutrients*, 10, 1457.
- Meyer, T., Fox, R., Ma, Y.T., Ross, P.J., James, M.W., Sturgess, R. and Palmer, D. H. 2017. Sorafenib in combination with transarterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (TACE 2): A randomized placebo-controlled, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 2(8), 565–575.
- Min, J. Y., Chun, K.S. and Kim, D.H. 2023. The versatile utility of cysteine as a target for cancer treatment. *Frontiers in Oncology*, 12, 997919.
- Michelakos, T., Xourafas, D., Qadan, M., Pieretti-Vanmarcke, R., Cai, L., Patel, M.S., Adler, J.T., Fontan, F., Basit, U., Vagefi, P.A., Elias, N., Tanabe, K.K., Berger, D., Yeh, H., Markmann, J.F., Chang, D.C. and Ferrone, C.R. 2019. Hepatocellular Carcinoma in Transplantable Child-Pugh A Cirrhotics: Should Cost Affect Resection vs Transplantation? *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 23(6), 1135–1142.

- Mohamed, A.A., Zaghloul, R.A., Abdelghany, A.M. and El Gayar, A.M. 2018. Selenium nanoparticles and quercetin suppress thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma in rats: Attenuation of inflammation involvement. *Journal Biochemistry Molecular Toxicology*, 36, e22989.
- Moreno-Torres, M., Quintás, G. and Castell, J.V. 2022. The potential role of metabolomics in drug-induced liver injury (DILI) assessment. *Metabolites*, 12(6), 564.
- Motola-Kuba, D., Zamora-Valdes, D., Uribe, M. and Mendez-Sanchez, N. 2006. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Annals of Hepatology*, 5(1), 16–24.
- Mukherjee, A.G., Wanjari, U.R., Bradu, P., Murali, R., Kannampuzha, S., Loganathan, T. and Gopalakrishnan, A.V. 2022. The crosstalk of the human microbiome in breast and colon cancer: a metabolomics analysis. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 176, 103757.
- Nakamura, K., Tanaka, Y., Fujino, I., Hirayama, N., Shitara, K. and Hanai, N. 2000. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Molecular immunology*, 37(17), 1035–1046.
- Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P.V. and Yadav, H. 2020. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–22.
- Nault, J.C. and Villanueva, A. 2015. Intratumor molecular and phenotypic diversity in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer*, 21,1786–1788.
- Nie L., Cai S.Y., Shao J.Z. and Chen J. 2018. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in Immunology*, 9, 1523.
- Novikova, M.V., Khromova, N.V. and Kopnin, P.B. 2018. Components of the hepatocellular carcinoma microenvironment and their role in tumor progression. *Biochemistry*, 82, 861–873.
- Odeh, A., Eddini, H., Shawasha, L., Chaban, A., Avivi, A., Shams, I., and Manov, I. 2023. Senescent Secretome of Blind Mole Rat *Spalax* Inhibits Malignant Behavior of Human Breast Cancer Cells Triggering Bystander Senescence and Targeting Inflammatory Response. *International Journal of Molecular Science*, 24, 5132.
- Ogunrinola, G.A., John O.O., Oshamika, O.O. and Olasehinde, G.I. 2020. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International Journal of Microbiology*, 8045646.
- Ohtani, N. and Kawada, N. 2018. Role of the Gut-liver axis in liver inflammation, fibrosis, and cancer: A special focus on the gut microbiota relationship. *Hepatology Community*, 3, 456–470.

- Oleksiewicz, U. and Machnik, M. 2022. Causes, effects, and clinical implications of perturbed patterns within the cancer epigenome. *Seminars in Cancer Biology*, 83, 15–35.
- Orlveo, A., Refolo, M.G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V. and Russo, F. 2012. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2. 1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1103–1111.
- Özcan, S., Levent, S. and Can, N.Ö. 2021. Challenges, progress, and promises of impurities annotation for LC/MSI-TOF. *Current Pharmaceutical Analysis*, 17(3), 437–449.
- Qiu, L., Wang, T., Ge, Q., Xu, H., Wu, Y., Tang, Q. and Chen, K. 2019. Circular RNA signature in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer*, 10(15), 3361.
- Paik, J.M., Golabi, P., Younossi, Y., Mishra, A. and Younossi, Z.M. 2020. Changes in the global burden of chronic liver diseases from 2012 to 2017: The growing impact of NAFLD. *Hepatology*, 72(5), 1605–1616.
- Pan, M., Lu, C., Zhang, W., Huang, H., Shi, X., Tang, S. and Liu, D. 2023. Poly (l-Ornithine)-Based Polymeric Micelles as pH-Responsive Macromolecular Anticancer Agents. *Pharmaceutics*, 15(4), 1307.
- Pan, Y., Ji, T., Li, Y. and Ma, L. 2020. Omics biomarkers for frailty in older adults. *Clinica Chimica Acta*, 510, 363–372.
- Piñeiro Fernandez J., Luddy K.A., Harmon C. and O’Farrelly C. 2018. Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4131.
- Pircher, A., Schäfer, G., Eigentler, A., Pichler, R., Pühr, M., Steiner, E. and Heidegger, I. 2019. Robo 4-the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. *International Journal of Medical Sciences*, 16(1), 115.
- Plaz Torres, M.C., Bodini, G., Furnari, M., Marabotto, E., Zentilin, P., Strazzabosco, M. and Giannini, E.G. 2020. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Universal or Selective*, 12, 1422.
- Prasher, P., Sharma, M., Singh, S.K., Gulati, M., Chellappan, D.K., Rajput, R. and Dua, K. 2023. Spermidine as a promising anticancer agent: Recent advances and newer insights on its molecular mechanisms. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1164477.
- Poetsch, G., Jelacic, L., Bicker, A., Balling, M., Hellmann, L., Dammer, L., and Hankeln, T. 2023. Adaptation of the *Spalax galili* transcriptome to life under hypoxia may hold a key to a complex phenotype including longevity and cancer resistance. *bioRxiv*. 2023-08.

- Ponziani, F.R., Nicoletti, A., Gasbarrini, A. and Pompili, M. 2019. Diagnostic and therapeutic potential of the gut microbiota in patients with early hepatocellular carcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11:1758835919848184.
- Pranneshraj, V., Sangha, M.K., Djalovic, I., Miladinovic, J. and Djanaguiraman, M. 2022. Lipidomics-assisted GWAS (LGWAS) approach for improving high-temperature stress tolerance of crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9389.
- Puigvehí, M., Moctezuma-Velazquez, C., Villanueva, A. and Llovet, J.M. 2019. The oncogenic role of *Hepatitis deltavirus* in hepatocellular carcinoma, *JHEP Reports* 1, 120130.
- Riaz Rajoka, M.S., Zhao, L., Mehwish, H.M., Wu, Y. and Mahmood, S. 2019. Chitosan and its derivatives: Synthesis, biotechnological applications, and future challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1557–1571.
- Rich, N. E., Hester, C., Odewole, M., Murphy, C. C., Parikh, N. D., Marrero, J. A. and Singal, A. G. 2019. Racial and ethnic differences in presentation and outcomes of hepatocellular carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(3), 551–559.
- Rich, N.E., Yopp, A.C., Singal, A.G. and Murphy, C.C. 2018. Hepatocellular carcinoma incidence is decreasing among younger adults in the United States. *Clinical Gastroenterology Hepatology*, 18, 242–248.
- Rizzoli, R. 2018. Microbiota and bone health: The gut-musculoskeletal axis. *Calcified Tissue International*, 102, 385–386.
- Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C. P., Alou, M.T., Daillere, R. and Zitvogel, L. 2018. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*, 359(6371), 91–97.
- Sakurai, S., Okada, Y. and Mataga, I. 2011. Inhibitory effects of glycerol on growth and invasion of human oral cancer cell lines. *Journal of Hard Tissue Biology*, 20(1), 37–46.
- Sarasola, M.D.L.P., Taquez Delgado, M.A., Nicoud, M.B. and Medina, V.A. 2021. Histamine in cancer immunology and immunotherapy. Current status and new perspectives. *Pharmacology Research and Perspectives*, 9(5), e00778.
- Schwabe, R.F., Jobin, C. 2013. The microbiome and cancer. *Nature Reviews of Cancer*, 13(11), 800–812.
- Serhan, C.N., Jain, A., Marleau, S., Clish, C., Kantarci, A., Behbehani, B. and Van Dyke, T.E. 2003. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6856–6865.

- Serper, M., Parikh, N.D., Thiele, G., Ovchinsky, N., Mehta, S., Kuo, A., Ho, C., Kanwal, F., Volk, M. and Asrani, S.K. 2022. Patient-reported outcomes in HCC: A scoping review by the practice metrics committee of the american association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 76, 251–274.
- Shams, L., Ma, W.J. and Beierholm, U. 2005. Sound-induced flash illusion as an optimal percept. *Neuroreport*, 16(17), 1923–1927
- Smith, C.A., Want, E.J., O' Maille, G., Abagyan, R. and Siuzdak, G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–87.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. and Duncan, S.A. 2019. Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189.
- Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S.L. and Llovet, J.M. 2017. Liver cancer cell of origin, Molecular class, and effects on patient prognosis. *Gastroenterology*, 152(4), 745–761.
- Sobsey, C.A., Ibrahim, S., Richard, V.R., Gaspar, V., Mitsa, G., Lacasse, V. and Borchers, C.H. 2020. Targeted and untargeted proteomics approaches in biomarker development. *Proteomics*, 20(9), 1900029.
- Solak, H.M., Yanchukov, A., Çolak, F., Matur, F., Sözen, M., Ayanoğlu, İ.C. and Winternitz, J. C. 2020. Altitudinal effects on innate immune response of a subterranean rodent. *Zoological Science*, 37(1), 31–41.
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M. and Nishioka, T. 2003. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2(5), 488–494.
- Stein, A., Moehler, M., Trojan, J., Goekkurt, E. and Vogel, A. 2018. Immuno-oncology in GI tumors: Clinical evidence and emerging trials of PD-1/PD-L1 antagonists. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 130, 13–26.
- Stine, Z.E., Schug, Z.T., Salvino, J.M. and Dang, C.V. 2022. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(2), 141–162.
- Subramaniam, S., Fahy, E., Gupta, S., Sud, M., Byrnes, R.W., Cotter, D. and Maurya, M. R. 2011. Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chemical Reviews*, 111(10), 6452–6490.
- Sullards, M.C., Allegood, J.C., Kelly, S., Wang, E., Haynes, C.A., Park, H., Chen, Y. and Merrill, A.H. 2007. Structure-specific, quantitative methods for analysis of sphingolipids by liquid chromatography-team mass spectrometry: "Inside-out" sphingolipidomics. *Methods in Enzymology*, 432, 83–115.

- Suresh, D., Srinivas, A.N. and Prashant, A. 2023. Therapeutic options in hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. *Clinical Expired Medicine*, 23, 1901–1916.
- Świerczewska, M., Sterzyńska, K., Wojtowicz, K., Kaźmierczak, D., Iżycki, D., Nowicki, M. and Januchowski, R. 2019. PTPRK expression is downregulated in drug resistant ovarian cancer cell lines, and especially in ALDH1A1 positive CSCs-like populations. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 2053.
- Sysi-Aho, M., Katajamaa, M., Yetukuri, L. and Oresic, M. 2007. Normalization method for metabolomics data using an optimal selection of multiple internal standards. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1–17.
- Szabo, C. 2007. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *National Revision Drug Discovery*, 6, 917–935.
- Tabrizian, P., Holzner M., Halazun, K., Agopian, V.G., Busuttill, R.W., Yao, F. and Mehta, N. 2019. A US multicenter analysis of 2529 HCC patients undergoing liver transplantation: 10-year outcome assessing the role of down-staging to within Milan criteria. In *Hepatology*, 70, 10–11.
- Takai, A., Dang, H.T. and Wang, X.W. 2014. Identification of drivers from cancer genome diversity in hepatocellular carcinoma. *International Molecular Science*, 15(11), 142–60.
- Talib, W.H., Jum’AH, D.A.A., Attallah, Z.S., Jallad, M.S., Al Kury, L.T., Hadi, R.W., and Mahmood, A.I. 2023. Role of vitamins A, C, D, E in cancer prevention and therapy: therapeutic potentials and mechanisms of action. *Frontiers in Nutrition*, 10.
- Tanaka, M., Katayama, F., Kato, H., Tanaka, H., Wang, J., Qiao, Y.L. and Inoue, M. 2011. Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China: A review of epidemiology and control measures. *Journal of Epidemiology*, 21(6), 401–416.
- Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler W.E., Wakefield L., Wilson, E.M., Finegold M. J. and Grompe M. 2014. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell stem cell*, 15(5), 605–618.
- To, N. B., Nguyen, Y. T. K., Moon, J. Y., Ediriweera, M. K., and Cho, S. K. 2020. Pentadecanoic acid, an odd-chain fatty acid, suppresses the stemness of MCF-7/SC human breast cancer stem-like cells through JAK2/STAT3 signaling. *Nutrients*, 12(6), 1663.
- Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B. and Knight, R. 2018. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(7), 397–411.

- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H. and Arita, M. 2020. A lipidome atlas in MS-DIAL. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1159–1163.
- Wang, J. F., Su, R. B., Wu, N., Xu, B., Lu, X. Q., Liu, Y. and Li, J. 2005. Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(5), 616–622.
- Wang L. and Wan Y.J.Y. 2019 The role of gut microbiota in liver disease development and treatment. *Liver Residual*, 3, 3–18.
- Wang, L., Du, F. and Wang, X. 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133(4), 693–703.
- Wang X., Fu X., Van Ness C., Meng Z., Ma X. and Huang W. 2013. Bile acid receptors and liver cancer. *Current Pathobiology Reports*, 1, 29–35.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S. and Zhao, L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME Journals*, 6(2), 320–329.
- Wang, Y., Wang, Q., Zhou, L., Zeng, Z., Zhao, C., You, L. and Xu, G. 2022. Metabolomics insights into the prenatal exposure effects of polybrominated diphenyl ethers on neonatal birth outcomes. *Science of The Total Environment*, 836, 155601.
- Ward, A.V., Veerson, S.M. and Sartorius, C.A. 2017. Advances in Analyzing the Breast Cancer Lipidome and Its Relevance to Disease Progression and Treatment. *JOURNAL Mammary Gland Biol Neoplasia*, 26(4), 399–417.
- Ward, A., Steven, V. and Sartorius, C. 2021. Advances in analyzing the breast cancer lipidome and its relevance to disease progression and treatment. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 26, 1–19.
- Watson, A.D. 2006. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 47(10), 2101–2011.
- Weir, T.L., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Barnett, B.A., Heuberger, A.L. and Ryan, E.P. 2013. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS One*, 6, 8(8), e70803.
- Wen, Y., Jeong, S. and Xia, Q. 2016 Role of osteopontin in liver diseases. *International Journal of Biology Science*, 12(1), 121–28.
- Wenk, M.R. 2005. The emerging field of lipidomics. *National Drug Discovery*, 4(7), 594–610.
- Whalen, E.D., Grvey, A.S., Sokol, N.W., Keiluweit, M., Ernakovich, J., Smith, R.G. and Frey, S. D. 2022. Clarifying the evidence for microbial and plant-derived soil

- organic matter, and the path toward a more quantitative understanding. *Global Change Biology*, 28(24), 7167–7185.
- Wilm, M., Neubauer, G. and Mann, M. 1996. Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. *Analytical Chemistry*, 68(3), 527–533.
- Wu, Y.C., Wang, X.J., Yu, L., Chan, F.K.L., Cheng, A.S.L., Yu, J., Sung, J.J.Y., Wu, W.K.K. and Cho, C.H. 2012. Hydrogen sulfide lowers proliferation and induces protection autophagy in colon epithelial cells. *PLoS One*, 7(5), e37572.
- Wu, X., Wu, Y., He, L., Wu, L., Wang, X. and Liu, Z. 2018. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 15, 9(14), 2510–2517.
- Van de Roovaart, H.J., Stevens, M.M., Goodridge, A.E., Baden, K.R., Sibbitt, B.G., Delaney, E. and Chen, A.M. 2023. Safety and efficacy of vitamin B in cancer treatments: A systematic review. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 10781552231178686.
- Villanueva, A. 2019. Hepatocellular carcinoma. *Engineering Journal Medicine*, 380,1450–1462.
- Villate A., San Nicolas M., Gallastegi M., Aulas, P.A., Olivares, M., Usobiaga, A. and Aizpurua-Olaizola, O. 2021. Metabolomics as a prediction tool for plants performance under environmental stress. *Plant Science*, 303, 110789.
- Vinderola, G., Sveers, M.E. and Salminen, S. 2022. The concept of postbiotics. *Food*, 11(8), 1077.
- Vrzackova, N., Ruml, T. and Zelenka, J. 2021. Postbiotics, metabolic signaling, and cancer. *Molecules*, 26, 1528.
- Xu, T., Zhang, R., Dong, M., Zhang, Z., Li, H., Zhan, C. and Li, X. 2019. Osteoglycin (OGN) inhibits cell proliferation and invasiveness in breast cancer via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *OncoTargets and Therapy*, 10639-10650.
- Yan, J., Vetvicka, V., Xia, Y., Coxon, A., Carroll, M.C., Mayadas, T.N. and Ross, G.D. 1999. Beta-glucan, a “specific” biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal Immunology*, 163, 3045–3052.
- Yanar, S., Kasap, M., Kanli, A., Akpınar, G. and Sarihan, M. 2023. Proteomics analysis of meclufenamic acid-treated small-cell lung carcinoma cells revealed changes in cellular energy metabolism for cancer cell survival. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(4), e23289.
- Yoon, J.H., Seo, Y., Jo, Y.S., Lee, S., Cho, E., Cazenave-Gassiot, A. and Suh, P.G. 2022. Brain lipidomics: From functional lvescape to clinical significance. *Science Advances*, 8(37), 9317.

- Zatari, D. Mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatörlerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi. 2022.
- Zelenka, J., Koncosova, M. and Ruml, T. 2018. Targeting of stress response pathways in the prevention and treatment of cancer. *Biotechnology Advance*, 583–602.
- Zhang, B.H., Yang, B.H. and Tang, Z.Y. 2018. Rveomized European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma, 69, 182–236.
- Zhang, C., Yang, M. and Ericsson, A.C. 2020 The potential gut microbiota-mediated treatment options for liver cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 524205.
- Zhang, W., He, H., Zang, M., Wu, Q., Zhao, H., Lu, L.L. and Jiao, Y. 2017. Genetic features of aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 153(1), 249–262.
- Zolkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M. and Feleszko, W. 2021. Postbiotics-A step beyond pre- and probiotics, 12, 2189.