

Gıda Kökenli Patojen Olmayan ve Patojenik *Salmonella enterica* Suşlarının Antitümörijenik Etkilerinin MEF, DU145 ve HeLa Hücre Kültürlerinde İncelenmesi*

Investigation of Antitumorigenic Effects of Food-Borne Non-Pathogenic and Pathogenic *Salmonella enterica* Strains on MEF, DU145 and HeLa Cell Lines

Gamze ALTINTAŞ KAZAR¹, Ece ŞEN^{2,3}

¹ Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

¹ Trakya University Faculty of Sciences, Department of Biology, Molecular Biology Section, Edirne, Turkey.

² Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

² Trakya University Faculty of Sciences, Department of Biology, Basic and Industrial Microbiology Section, Edirne, Turkey.

³ Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Edirne.

³ Trakya University, Institute of Natural Sciences, Biotechnology and Genetics Department, Edirne, Turkey.

* Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP) tarafından 2014-65 numaralı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Ayrıca ilk yazar TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 10.02.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.05.2016

ÖZ

Kanser tedavisinde kullanılan temel uygulamalar, tüm kanser hücrelerinin yok edilmesinde başarısız olabilir; sağlıklı hücrelere karşı toksisite gösterebilir ve anti-tümör ilaçlara karşı gelişen direnç metastaza yatkınlığı artırabilir. Bakteriyel terapilerin avantajı, seçici toksisite, dış sinyallere yanıt verebilme ve mikroçevreye duyarlılık sayesinde tümörlerin seçici bir şekilde yok edilmesidir. Kanser tedavisinde sıklıkla araştırılan bakteriler *Salmonella* türleri ve özellikle de *S.Typhimurium*'dur. Bu çalışmanın amacı, gıda kökenli patojen olan ve olmayan *Salmonella enterica* suşlarının, çeşitli hücre kültürleri üzerindeki antitümörijenik etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmada, Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilen patojen olmayan *Salmonella* Enteritidis (A17) ve patojenik *Salmonella* Telaviv (A22) suşları ile standart *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suşu kullanılmıştır. ATCC kökenli MEF (fare embriyonik fibroblast), DU145 (insan prostat kanseri) ve HeLa (insan servikal kanseri) hücre kültürleri, *Salmonella* suşları ile, MOI [Multiplicity of infection; Enfeksiyon çarpanı (bakteri sayısı:hücre sayısı)] 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 0.1:1

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ece Şen, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balkan Yerleşkesi, 22030, Edirne, Türkiye.
Tel (Phone): +90 284 236 3771, E-posta (E-mail): ecesen@trakya.edu.tr

oranlarında kokültüve edilmiş; hücre canlılıkları kolorimetrik MTT sitotoksitesite testi ile ölçülmüş; apoptoza giren hücre yüzdeleri "Tali® Apoptosis Kit - Annexin V Alexa Fluor® 488" kiti (Invitrogen, Molecular Probes, Life Technologies, ABD) ile değerlendirilmiş ve kaspaz-3 aktivite, kolorimetrik proteaz ApoTarget™ Kit (Invitrogen, BioSource International, ABD) ile belirlenmiştir. Çalışmada, patojen olmayan *S. Enteritidis* (A17) suşunun hücre canlılığını, hücre kültürleri için ortalama %70 civarına düşürürken, patojenik olan *S. Telaviv* (A22) ve standart *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşlarının ortalama %80'e kadar düşürebildiği gösterilmiştir. Bu bulgunun aksine, patojenik *S. Telaviv* (A22) suşunun, patojen olmayan *S. Enteritidis* (A17) ve *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşlarına göre apoptoza daha etkili bir biçimde tetiklediği saptanmıştır. Patojenik *S. Telaviv* (A22) suşu tarafından indüklenen apoptoza giren hücre yüzdesi %15 civarında olurken, patojen olmayan *S. Enteritidis* (A17) ve *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşları için %5 civarında kalmıştır. Benzer şekilde, kaspaz-3 aktivitesini gösteren ortalama OD₄₀₅ değerleri, patojen olmayan *S. Enteritidis* (A17) ve *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşları için 0.01 civarında kalırken, patojenik *S. Telaviv* (A22) suşu için 0.02'ye yaklaşmış ve kontrol grubuna göre iki kat artış göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları, gıda kökenli patojenik *S. Telaviv* (A22) suşunun kaspaz-3 aktivitesini artırdığını ve apoptoza tetiklediğini göstermesi ve ayrıca *S. Enteritidis* (A17) suşunun DU145 (insan prostat kanseri) hücreleri üzerinde seçici sitotoksitesite olduğunun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*; antitümör etki; bakteriyel terapi; apoptoz; sitotoksitesite.

ABSTRACT

Basic applications in cancer therapy may fail to eradicate cancer cells completely, they can show toxic affects to healthy cells and development of resistance to antitumor agents may increase tendency to metastasis. Bacterial therapies have the advantage of specific targetting of tumors by selective toxicity, responsiveness to external signals, self-propelling capacity, and the sense of microenvironment. The most interest on the bacterial cancer therapy is about *Salmonella* spp. with a special emphasis of *S. Typhimurium*. The aim of this study was to investigate the antitumorigenic effects of food-borne non-pathogenic and pathogenic *Salmonella enterica* strains on different cell cultures. Non-pathogenic *Salmonella* Enteritidis (A17) and pathogenic *Salmonella* Telaviv (A22) strains isolated from chicken carcasses which were put on the market in Edirne province (located at Thrace region of Turkey), and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 strain were used in the study. ATCC-derived MEF (mouse embryonic fibroblasts), DU145 (human prostate cancer cells), and HeLa (human cervical cancer cells) cell lines were cocultivated with *Salmonella* strains of MOI (Multiplicity of infection; number of bacteria:number of cell) of 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 0.1:1. The cell viability was measured by colorimetric MTT cytotoxicity assay, the percentage of apoptosis was assessed by Tali® Apoptosis Assay-Annexin V Alexa Fluor® 488 kit (Invitrogen, Molecular Probes, Life Technologies, USA), and the caspase-3 activity was determined by colorimetric protease ApoTarget™ kit (Invitrogen, BioSource International, USA). It was shown that non-pathogenic *S. Enteritidis* (A17) decreased cell viability approximately to 70%, whereas pathogenic *S. Telaviv* (A22) and standart *S. Typhimurium* ATCC 14028 strains reduced cell viability approximately to 80%. Adversely, it was also observed that pathogenic *S. Telaviv* (A22) strain induces apoptosis more effectively than non-pathogenic *S. Enteritidis* (A17) and *S. Typhimurium* ATCC 14028 strains. Apoptosis percentage induced by pathogenic *S. Telaviv* (A22) strain was approximately 15% while 5% for both non-pathogenic *S. Enteritidis* (A17) and *S. Typhimurium* ATCC 14028 strains. Similarly, average OD₄₀₅ values of caspase-3 activity was shown as 0.01 for both non-pathogenic *S. Enteritidis* (A17) and *S. Typhimurium* ATCC 14028 strains whereas average OD₄₀₅ value of caspase-3 activity for pathogenic *S. Telaviv* (A22) strain was very close to 0.02 and it doubled the value for negative control. Our data are important in terms of the indication of food-borne pathogenic *S. Telaviv* (A22) strain that enhanced caspase-3 activity and induced apoptosis, and *S. Enteritidis* (A17) strain that showed selective cytotoxicity on DU145 (human prostate cancer cells).

Keywords: *Salmonella*; antitumor effect; bacterial therapy; apoptosis; cytotoxicity.

GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin hızla ortaya çıkması, sınırlarının dışına yayılması ve yakınlarındaki dokuları istila etmesidir. 14.1 milyon yeni kanser olgusunun bildirildiği 2012 yılında, 8.2 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiş ve 32.6 milyon kişi kanser ile mücadele vermektedir¹. Radyoterapi, kemoterapi ve operasyon gibi geleneksel tedavi yöntemleri, modern teknikler ve teknolojiler ile hızlı bir biçimde ilerliyor olsa da, tümör hücrelerinin ilaçlara direnç kazanması ve metastaza eğilimli hale gelmesi; mikrometastazların tanımlanması ve engellenmesindeki yetersizlik; tedavilerin çoğunun terapötik indeksinin sınırlı olması, tümörleri tam olarak hedefleyememesi ve yetersiz doku penetrasyonu, kanser tedavilerinde başarıyı kısıtlayıcı faktörlerdir ve birçok kanser tedavisi sağlıklı dokulara da zarar vermektedir^{2,3}.

Kanser tedavisi için ideal bir ilaç, kanser hücrelerine seçici olarak sitotoksosite göstermeli, kanser hücrelerine kendiliğinden yönlenebilmeli, dış sinyaller tarafından yönlendirilebilmeli, kanser mikroçevresini algılayabilmeli ve dışarıdan saptanması kolay olmalıdır^{4,5}. Canlı bakteriler, zayıflatılmış bakteriler, genetiği değiştirilmiş bakteriler ve onların ürünleri olan toksin, protein ve ilaç türevlerinin kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek, kanseri tedavi etmek ya da metastazları önlemek için kullanılmasına "bakteriyel kanser tedavisi" adı verilir⁶. *Salmonella* Typhimurium'un tümörlü bir fareye sistemik olarak enjeksiyonu ile yapılan bir çalışmada, bakterilerin tümör dokusunda diğer sağlıklı organ ve dokulara göre 10.000 kat daha fazla bulunduğu gösterilmiştir⁷. Bu araştırmanın sonucuna göre bakteriler, kanser hücrelerine seçici bir biçimde ulaşabilmekte ve kendilerinden yönlenebilmektedirler⁷. Ayrıca bakteriler, kendilerinde bulunan kemotaktik reseptörler sayesinde tümör mikroçevresindeki değişimleri sezebilirler ve genetik olarak değiştirilmelerine imkan sağladıkları için dış sinyallere duyarlı ve/veya yanıt verebilir hale getirilebilirler⁸. Bu özellikleriyle bakteriler, ideal bir kanser tedavi ilacı gibi davranabilirler.

William B. Coley tarafından 1890 yılında fark edilen ve daha sonra Coley'nin toksini adını alan patojenik bakteri enfeksiyonu sonucu tümörlerde görülen küçülme, bakteriyel kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır⁹. Yapılan çalışmalarda, bazı *Salmonella* türlerinin ve genetik olarak modifiye edilmiş *Salmonella* spp. suşlarının, tümör gelişimini geriletmediği, metastazı önlediği ve deney hayvanlarının yaşam sürelerini artırdığı bildirilmektedir¹⁰⁻¹³. Bu kapsamda, sunulan çalışmanın amacı, *Salmonella* Enteritidis (A17), *Salmonella* Typhimurium (A22) ve *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suşlarının, çeşitli hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürleri

Çalışmamızda, ATCC'den temin edilen ve Trakya Üniversitesi (TÜ) Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonunda saklanan HeLa (insan servikal kanseri) ve DU145 (insan prostat kanseri) hücre dizileri ile İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden (Doç. Dr.

Elif Damla Arısan'ın izniyle) temin edilen, ATCC'ye ait MEF (fare embriyonik fibroblast) hücre dizileri kullanıldı. Tüm hücre kültürleri, T25 flasklarda, %10 fetal dana serumu (FCS), L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde çoğaltıldı ve idame ettirildi.

Bakteri Suşları

Bakteri suşu olarak, TÜ Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda saklanan ve daha önceki çalışmamızda¹⁴, Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilerek serotiplendirilen apatojenik *Salmonella* Enteritidis (A17) ve patojenik *Salmonella* Telaviv (A22) suşları ile standart *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suşu kullanıldı. Tüm suşlar, LB (Luria-Bertani) besiyerine ekilerek 37°C'de 12 saat inkübasyondan sonra kullanıldı.

Hücre Kültürlerinin Bakteriler ile Kokültivasyonu

Hücre kültürleri, uygun yoğunluğa ulaştıklarında vasatları döküldü, 10 ml fosfatlı tampon (1xPBS) ile yıkandı ve 3 ml tripsin-EDTA (%0.25 w/v) solüsyonu ile yüzeyden kaldırıldı. Hücre süspansiyonu 5 dakika 500g'de santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı ve 10³ hücre/ml içerecek şekilde DMEM-F12 besiyeri ile seyreltilti. Hücreler, 96 çukurlu mikropklara 200 µl/çukur (~5000 hücre) olacak şekilde eklendi ve 2 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilerek yüzeye yapışmaları sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine, MOI [Multiplicity of infection; Enfeksiyon çarpanı (bakteri sayısı:hücre sayısı)] 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 0.1:1 olacak şekilde bakteriler eklendi. Bakteriler ile birlikte 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 4 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, 200 µl 1xPBS ile 3 kere yıkandı ve üzerlerine %1 penisilin-streptomisin (PS) içeren DMEM-F12 besiyeri eklendi. 12 saat boyunca inkübe edilen hücreler, MTT sitotoksiste testi ile değerlendirildi. MTT sitotoksiste, apoptoz ve kaspaz-3 aktivite belirlenme analizlerinde MOI 100:1 oranı kullanılarak, kokültür süresi 4 saat olarak uygulandı.

MTT Sitotoksiste Testi

Sitotoksistenin saptanmasında, kolorimetrik MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) indirgenme testi uygulandı. Bu amaçla, MOI 100:1 olan bakteriler ile 96'lı mikropklarda 4 saat kokültürü yapılan hücreler kullanıldı.

MTT testi sırasında, bakteriler ile kokültüve edilmemiş hücreler içeren (MOI= 0) negatif kontrol ve hücre içermeyen boş örnekler de teste dahil edildi. MTT çözeltisi 1 mg/ml MTT içerecek şekilde PBS içerisinde hazırlandı ve 0.2 µm filtreden süzülerek steril edildi. 96'lık plaklarda inkübe edilmiş hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 50 µl MTT çözeltisi ve 200 µl FCS ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM eklendi ve nazikçe çalkalandı. Hücreler 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren karanlık ortamda inkübe edildikten sonra MTT çözeltisi uzaklaştırılıp kalan kristaller 200 µl DMSO ve 25 µl Sorenson glisin tamponu (glisin 0.1 M, NaCl 0.1 M, 0.1 NaOH ile pH: 10.5) ile çözüldü; 5 dakika oda sıcaklığında nazikçe çalkalanan plaklar, spektrofotometrede (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, ABD) 630 nm referans dalga boyuna karşı 570 nm dalga boyunda okundu¹⁵.

Hücre Canlılığı ve Apoptoza Giren Hücre Yüzdelерinin Belirlenmesi

Bu amaçla “Tali® Apoptosis Kit - Annexin V Alexa Fluor® 488” kiti (Invitrogen, Molecular Probes, Life Technologies, ABD) kullanıldı ve deneyler kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Mikroplaklarda bulunan hücreler 20 µl tripsin-EDTA ile deney ortamından kaldırılıp PBS ile yıkandı ve 10^5 - 10^7 hücre/ml olacak şekilde seyreltildi. Konsantre (5x) Annexin bağlama tamponu (ABB) deiyonize su ile seyreltilerek 1x ABB hazırlandı ve 100 µl ABB içerisine yaklaşık 5×10^5 ile 5×10^6 hücre eklendi. Hücreler karanlıkta oda ısında 20 dakika boyunca 5 µl “Annexin V Alexa Fluor 488” ile inkübe edildi ve daha sonra 800g’de 2 dakika santrifüj edilerek 100 µl ABB içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin üzerine 1 µl PI (propidium iodide) eklenerek oda sıcaklığı ve karanlıkta 5 dakika inkübe edildi; 25 µl örnek Tali® hücre analizi lamlarına yüklendi ve Tali® görüntü tabanlı sitometrede hücre sağlığı apoptoz olarak ölçülüp raporlandı.

Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

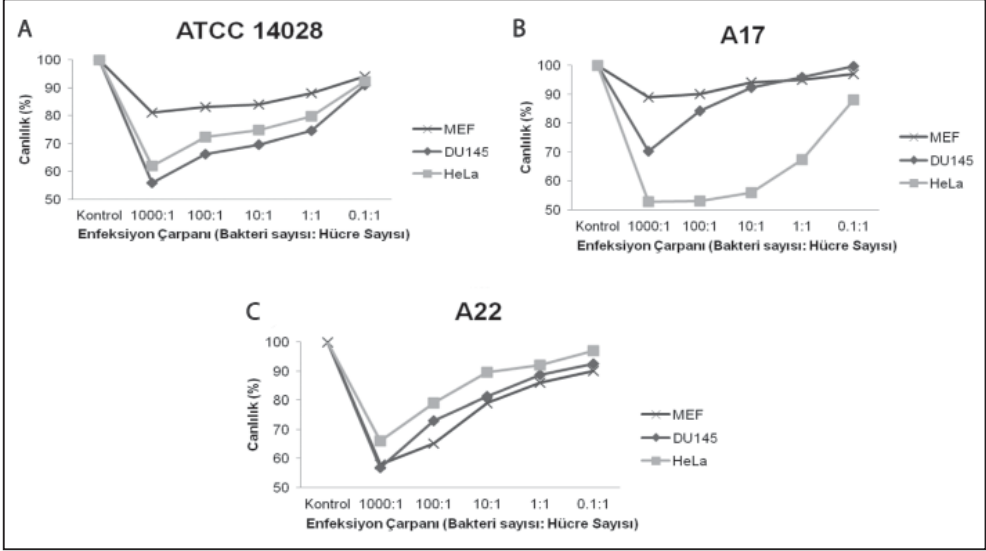
Kaspaz-3 aktivitesi, kolorimetrik proteaz ApoTarget™ Kit (Invitrogen, BioSource International, ABD) ile kit prosedürüne göre ölçüldü. Bakteriler ile kokültürü yapılan hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 50 µl hücre lizis tamponunda 3 - 5×10^6 hücre olacak şekilde süspanse edildi. Buzda 10 dakika bekletilen hücreler 10.000g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir tüpe alınarak buz içerisinde muhafaza edildi. Her 100 µl hücre lizis tamponu, 100 µg protein lizatı içerecek şekilde seyreltildi ve her bir hücre lizatının üzerine 50 µl reaksiyon tamponu [10 µM DTT (dithiothreitol) içeren] ve 5 µl DEVD-pNA (kaspaz-3 substratı) eklenerek 37°C’de 3 saat inkübe edildi. Her bir örnek spektrofotometrede (Multiskan™ FC, Thermo Scientific, ABD) 405 nm dalga boyunda kör hesabı yapılarak ölçüldü ve veriler raporlandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirmesi için “Prism 6 for Mac OS X version 6.0h (Trial)” programı kullanıldı ve deneylerden elde edilen tekerrürlü sonuçlara iki yönlü ANOVA testi $\alpha = 0.05$ olarak uygulandı.

BULGULAR

Çalışmamızda, MTT sitotoksik testi sonucunda belirlenen hücre canlılık yüzdeleri, her bir *Salmonella* suşu için Şekil 1’de sunulmuştur. Şekilde gösterilen canlılık yüzdelere göre, hücre kültürlerinde canlılığı en çok etkileyen MOI oranının 1000:1 olduğu ve 100:1’den 0.1:1’e doğru gidildikçe hücre canlılığının arttığı gözlemlenmiştir. *S.Telaviv* (A22) suşu, 1000:1 MOI oranında tüm hücre kültürlerinde de canlılığı yaklaşık %60’a düşürerek, çalışmada kullanılan bakteriler arasında hücre ayrımı yapmadan en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir (Şekil 1c). *S.Typhimurium* ATCC 14028 ve *S.Enteritidis* (A17) suşları, MEF hücrelerinin canlılık yüzdesini en az etkileyen suşlar olurken, *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşu DU145 ve HeLa hücre kültürleri üzerinde benzer sitotoksik etkiler göstermiştir (Şekil 1b ve 1c). *S.Enteritidis* (A17) suşunun sitotoksik etkisi ise, sırasıyla en fazla HeLa ve DU 145 hücreleri üzerinde olmuştur (Şekil 1c).

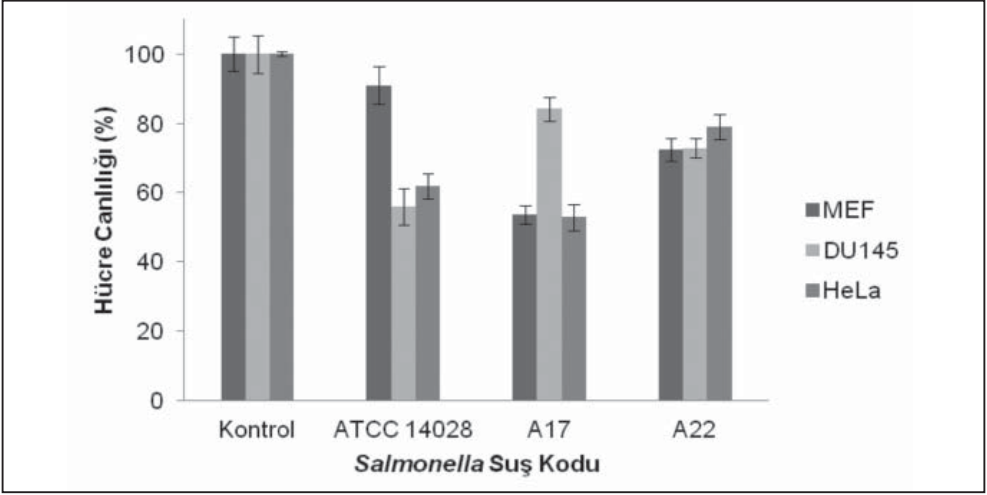


Şekil 1. *Salmonella* suşlarının farklı enfeksiyon çarpanı (MOI) oranları ile kokültüve edilen MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinin, MTT sitotoksosite testi ile belirlenen yüzde canlılık verilerini içeren çizgi grafikleri; (A) *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; (B) *Salmonella* Enteritidis (A17); (C) *Salmonella* Telaviv (A22).

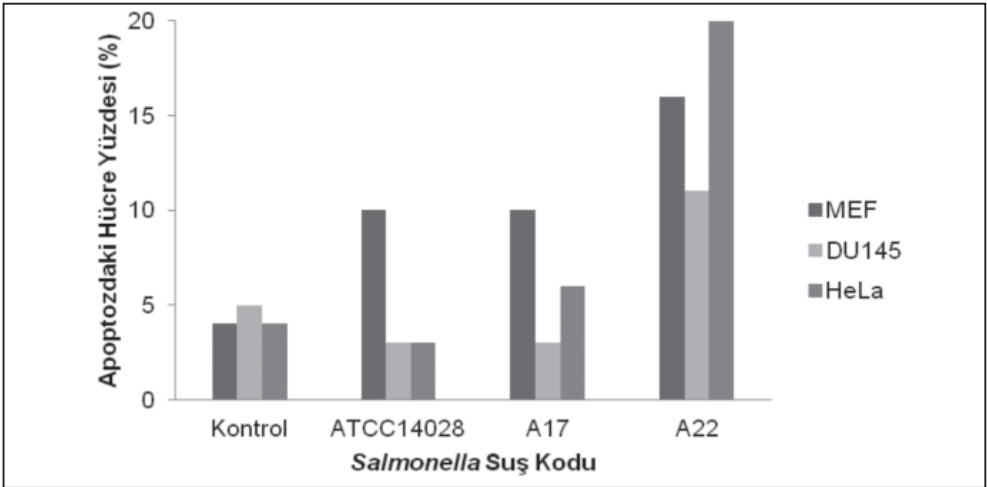
MEF, DU145 ve HeLa hücre kültürlerinin *Salmonella* suşları ile 100:1 MOI oranında 4 saat kokültürü sonucu, MTT sitotoksosite testinde saptanan hücre canlılığı yüzdeleri Şekil 2'de sütun grafiği halinde gösterilmiştir. Herhangi bir bakteri ile kokültüve edilmeyen kontrol gruplarının canlılık yüzdesi %100 olarak kabul edilerek yapılan grafiğe göre; *S.Telaviv* (A22) suşu her üç hücre kültüründe de benzer sitotoksik etki gösterirken, *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşu en az MEF hücre canlılığını (%91), *S.Enteritidis* (A17) suşu ise en az DU145 hücre canlılığını (%84.2) etkilemiştir (Şekil 2).

Salmonella suşları ile 100:1 MOI oranında 4 saat kokültüvasyon sonucu, MEF, DU145 ve HeLa hücre kültürlerinde apoptoza giren hücre yüzdeleri Şekil 3'te görülmektedir. *Salmonella* suşları ile kokültüve edilmeyen kontrol gruplarında apoptozdaki hücre yüzdesi %5 oranında kalırken, en fazla apoptotik etkiyi *S.Telaviv* (A22) suşu göstermiştir. *S.Typhimurium* ATCC 14028 ve *S.Enteritidis* (A17) suşları sırasıyla MEF hücrelerinde %10, DU145 hücrelerinde %3 apoptotik etkiye sebep olurken, HeLa hücreleri üzerinde *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşu %3, *S.Enteritidis* (A17) suşu %6 apoptotik etkiye sebep olmuştur (Şekil 3).

Salmonella suşlarının hücre kültürlerindeki apoptoza etkisinin kaspaz-3 aktivitesi ile değerlendirilmesi amacıyla yapılan deneyde, OD₄₀₅'de okunan değerler Şekil 4'de verilmiştir. Buna göre, hücre kültürlerinde kaspaz-3 aktivitesinde en çok artışa sebep olan suş *S.Telaviv* (A22)'dir. Kontrol grupları için hücre tipi ayırt etmeksizin kaspaz-3 aktivitesinin OD₄₀₅ değeri yaklaşık 0.01 değerinde kalırken, MEF hücrelerinde bu değer *S.Typhimurium* ATCC 14028 ve *S.Enteritidis* (A17) için 0.02'ye yaklaşmıştır.



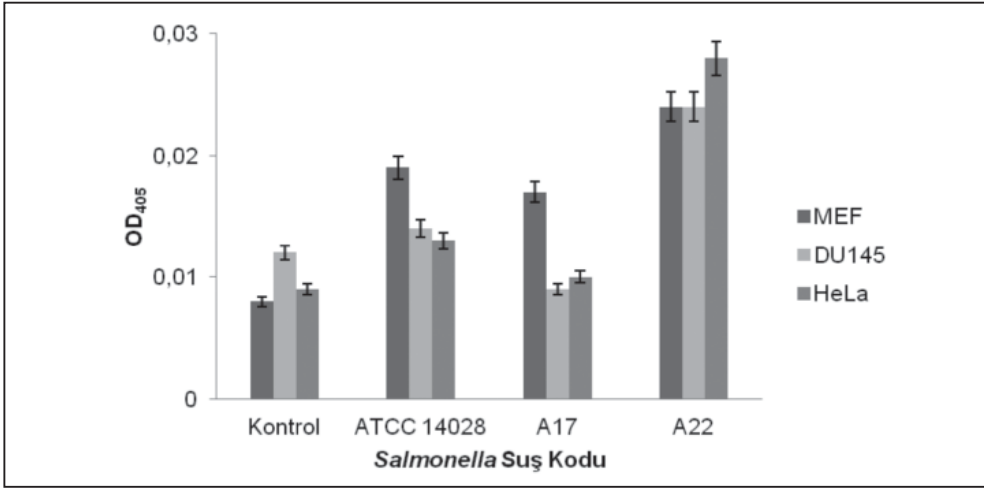
Şekil 2. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis (A17) ve *Salmonella* Telaviv (A22) suşları ile kokültüve edilen MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinin MTT sitotoksitesi testi ile belirlenen yüzde canlılık verilerini içeren sütun grafiği.



Şekil 3. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis (A17) ve *Salmonella* Telaviv (A22) suşları ile kokültüve edilen MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinden apoptoza giren hücre yüzdesini Tali® Apoptoz kitine göre gösteren sütun grafiği.

TARTIŞMA

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanımının araştırılması ile ilgili çalışmalar, gelişen moleküler mikrobiyolojik yöntemlere paralel olarak son yıllarda artış göstermektedir. Bakteriler, doğrudan anti-kanser etkenleri olarak kullanılmalarının yanı sıra, ilaçları istenilen bölgeye taşıyan ajanlar olarak da görev yaparlar. *Salmonella* türleri ve özellikle de *S.*Typhimurium, kanser tedavisinde sıklıkla araştırılan ve klinik çalışmalarda yerini almış



Şekil 4. *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella Enteritidis* (A17) ve *Salmonella Typhimurium* (A22) suşları ile kokültüve edilen MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesini gösteren sütun grafiği.

bakteriler olarak karşımıza çıkmaktadır¹⁶⁻¹⁸. Bu noktadan hareketle, sunulan bu çalışmada, Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilen *S. Enteritidis* (A17) ve *S. Typhimurium* (A22) suşları ile *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşunun, fare embriyonik fibroblast (MEF), insan servikal kanseri (HeLa) ve insan prostat kanseri (DU145) hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi ve kanser tedavisi çalışmalarındaki kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, bakterilerin farklı MOI oranları ile kokültüve edilen hücre kültürlerindeki hücre canlılık yüzdeleri MTT sitotoksikite testi ile değerlendirilmiş; *S. Typhimurium* ATCC 14028 ve *S. Typhimurium* (A22) suşlarının hücreler üzerindeki seçici etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunurken (sırasıyla, $p = 0.5706$ ve $p = 0.8661$), *S. Enteritidis* (A17) suşu için anlamlı ($p < 0.0001$) bulunmuştur (Şekil 1). MTT sitotoksikite testi, *S. Enteritidis* (A17) suşunun hücre kültürleri üzerinde seçici bir etkiye sahip olduğunu göstermiş; bu suş, MEF ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerini, 1000:1, 100:1 ve 10:1 MOI oranlarına göre ortalama %80'lere düşürürken, HeLa hücre canlılık yüzdeleri aynı koşullarda %60'ın altında kalmıştır. Ancak, 1000:1 MOI oranının yüksek ve bakteri-hücre inkübasyon süresinin 2 saat ile sınırlı olmasından dolayı, hücreler üzerindeki apoptotik etkinin daha iyi araştırılması amacıyla, MTT sitotoksikite testi 100:1 MOI oranı ve 4 saat inkübasyon süresiyle gerçekleştirilmiş, böylece bakterilerin hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri bu oran ve sürelerde araştırılmaya devam edilmiştir. Sonuçta, *Salmonella* suşlarının hücreler ile ilişkisi ve bakteriler arasındaki etkinin varyasyonu, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). İki yönlü ANOVA testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, çalışmada kullanılan *Salmonella* suşlarının, hücre kültürü canlılığına seçici bir şekilde etki ettiği belirlenmiştir. Nitekim, daha önce *C. elegans* modelinde yaptığımız sağkalım analizi çalışmasına göre de, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* (A17) ve *S. Typhimurium* (A22) suşları için TD50 değerlerinin sırasıyla 4.1, 6.8 ve 4.8 olduğu gösterilmiştir¹⁴.

Kanser tedavisinde kullanılmak amacıyla denenen birçok bakteri türünün apoptozu engellediği biliniyor olsa da, Srikanth ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında *S.Typhimurium*'un apoptotik enzimleri aktive ettiğini göstermiştir. Çalışmamızda, *Salmonella* suşları ile kokültüvasyon sonucu MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinden apoptoza giren hücre yüzdeleri ve kaspaz-3 kolorimetrik ölçümleri, *S.Telaviv* (A22) suşunun diğer iki *Salmonella* suşuna göre kanser hücrelerinde daha yüksek apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, *S.Typhimurium*'a ait efektör bir proteinin, kaspaz-3 aktivitesini yükselterek apoptozu aktive ettiği bildirilmiştir²⁰. *S.Typhimurium*'un hipoksik durumlarda tetiklenebilen sentez mekanizmalarını içermesinin yanı sıra, bakteriyel bir efektör protein tarafından gerçekleştirilen kaspaz-3 aktivasyonu etkisine sahip olması, bakteriyel terapide farklı bir yaklaşım olarak kullanılabilir^{21,22}.

Patojenik olmayan *S.Enteritidis* (A17) ve patojenik olan *S.Telaviv* (A22) ile *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşlarının MTT sitotoksisite testine göre hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, *S.Enteritidis* (A17) ve *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşlarının tüm hücre kültürlerinde hücre canlılığını ortalama %70 civarına düşürürken, *S.Telaviv* (A22) suşunun %80 civarına düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ancak, Tali® apoptoz kiti ile belirlenen apoptoza giren hücre yüzdesinde, patojenik olan *S.Telaviv* (A22) suşu apoptozu bütün hücre kültürlerinin ortalamasında %15 tetiklerken, patojen olmayan *S.Enteritidis* (A17) ve *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşlarının apoptozu %5 civarında tetiklediği görülmüştür. Ayrıca kaspaz-3 aktivitesinde de benzer sonuçlar saptanmıştır. Bu sonuçlar, patojen olmayan *S.Enteritidis* (A17) ve *S.Typhimurium* ATCC 14028 suşlarının, hücreleri daha ziyade apoptoz dışında yollarla öldürdüğünü, patojen olan *S.Telaviv* (A22) suşunun ise hücre canlılığını daha yüksek bir apoptoz yüzdesi ile azalttığını düşündürmektedir.

Coley'in toksini ile başlayan bakteriyel kanser tedavisi çalışmaları, günümüzde klinik araştırmalar safhasına gelmiştir²³. Bu konu kendi içerisinde lokalizasyon, toksisite ve bağışıklık ile ilgili sorunlar barındırıyor olsa da, tedavinin amaç ve kapsamı doğrultusunda genetik olarak değiştirilmiş *Salmonella* suşlarının iyi bir bakteriyel kanser tedavi adayı oldukları görülmektedir. Sonuç olarak, gıdalardan izole edilen *Salmonella* suşlarının kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyellerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, *S.Telaviv* (A22) suşunun kaspaz-3 aktivitesini artırdığını ve apoptozu tetiklediğini göstermesi ve ayrıca *S.Enteritidis* (A17) suşunun DU145 (insan prostat kanseri) hücreleri üzerinde seçici sitotoksitesi olduğunun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-86.
2. Morrissey D, O'Sullivan GC, Tangney M. Tumour targeting with systemically administered bacteria. *Curr Gene Ther* 2010; 10(1):3-14.
3. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1408-16.
4. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(11): 785-94.
5. Afsar I. Bakteriler ve kanser sağaltımı. *İnfeksiyon Derg* 2007; 21(2): 101-4.

6. Bernardes N, Chakrabarty AM, Fialho AM. Engineering of bacterial strains and their products for cancer therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(12): 5189-99.
7. Forbes NS, Munn LL, Fukumura D, Jain RK. Sparse initial entrapment of systemically injected *Salmonella* Typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5188-93.
8. Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, Hong Y, Choy HE, Min JJ. Genetically engineered *Salmonella* Typhimurium as an imageable therapeutic probe for cancer. *Cancer Res* 2010; 70(1): 18-23.
9. Chakrabarty AM. Microorganisms and cancer: quest for a therapy. *J Bacteriol* 2003; 185(9):2683-6.
10. Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anne J. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett* 2008; 259(1): 16-27.
11. Lee CH, Wu CL, Shiao AL. Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thymospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer Gene Ther* 2005; 12(2): 175-84.
12. Zhao M, Yang M, Ma H, et al. Targeted therapy with a *Salmonella* Typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7647-52.
13. Mengesha A, Dubois L, Lambin P, et al. Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated *Salmonella*. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(9): 1120-8.
14. Aksoy D, Sen E. Investigation of pathogenic phenotypes and virulence determinants of food-borne *Salmonella enterica* strains in *Caenorhabditis elegans* animal model. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(4): 513-24.
15. Ahmadian S, Barar J, Saei AA, Fakhree MA, Omid Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. *J Vis Exp* 2009; (26). pii:1191.
16. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E.coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(10): 737-44.
17. Heimann DM, Rosenberg SA. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella* Typhimurium in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2003; (26): 179-80.
18. Toso JF, Gill VJ, Hwu P, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella* Typhimurium to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002; 20(1): 142-52.
19. Srikanth CV, Wall DM, Maldonado-Contreras A, et al. *Salmonella* pathogenesis and processing of secreted effectors by caspase-3. *Science* 2010; 330(6002): 390-3.
20. Wall DM, Nadeau WJ, Pazos MA, Shi HN, Galyov EE, McCormick BA. Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cell Microbiol* 2007; 9(9): 2299-313.
21. Wall DM, Srikanth CV, McCormick BA. Targeting tumors with *Salmonella* Typhimurium- potential for therapy. *Oncotarget* 2010; 1(8): 721-8.
22. Aydin S, Geckil H, Caylak E, Kilic N. Mikroorganizmaların kanser tedavisinde kullanımı. *Fırat Tıp Derg* 2004; 9(2): 30-4.
22. Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci* 2010; 17(1): 21.