



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KALSİYUM  
KONSANTRASYONLARININ  
ENTEROTOKSİJENİK *BACTEROIDES FRAGILIS*  
KÖKENLERİNİN ÜREMESİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Neşe BALKAN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Nurver ÜLGER

İSTANBUL-2012

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

20.03.2012

Neşe BALKAN

## TEZ ONAYI

Kurum: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( × )                      Doktora ( )

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Neşe BALKAN

Tez Başlığı : Farklı Kalsiyum Konsantrasyonlarının Enterotoksijenik *Bacteroides Fragilis* Kökenlerinin Üremesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Sınav Yeri : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 20.01.2012

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

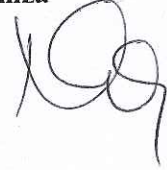
**Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)**

Doç.Dr.Nurver ÜLGER

**Kurumu**

M.Ü Tıp Fakültesi

**İmza**



**Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı,Soyadı)**

Prof.Dr.Ayşegül KARAHASAN

M.Ü Tıp Fakültesi

Doç.Dr.Hrisi BAHAR

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak

*A. Karahasen*

*Hrisi Bahar*  
Doç.Dr. Hrisi BAHAR  
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun .31../.01../.2012 tarih ve 53. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Gülden Z. OMURTAG

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## D) ÖNSÖZ

Çok severek sürdürdüğüm ve bir yüksek lisans tezi hazırlamak için oldukça uzun bir süre sayılabilecek bu 2 yıllık titiz ve yüksek tempolu çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Nurver ÜLGER'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimimde büyük emeği geçen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Güner SÖYLETİR , Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU ve Dr. Burak AKSU'ya,

İstatistiksel analiz değerlendirmelerinde yardımlarını benden esirgemeyen Prof.Dr. Nilüfer ÖZAYDIN hocama,

Birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum tüm yüksek lisans ve asistan arkadaşlarıma,

Canım aileme ve biricik eşim Mustafa SERBEST' e çok teşekkür ederim.

## II) İÇİNDEKİLER:

- I) Önsöz
- II) İçindekiler
- III) Kısaltmalar ve Simgeler
- IV) Şekil, Resim ve Tabloların Listesi

<b>Özet</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. <i>Bacteroides</i> Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	5
2.2. <i>Bacteroides fragilis</i> 'ın Virülans Özellikleri .....	6
2.2.1. Bakterinin Dış Yapısında Yer Alan Kolonizasyonu Sağlayan Oluşumlar .....	7
a. Kapsül Polisakkaridi	
b. Lipopolisakkarit Yapı	
c. Dış Zar Proteinleri	
d. Piluslar	

2.2.2. İnvazyon .....	9
2.2.3. İnfeksiyon alanında çoğalma ve konağın savunma sisteminden kaçma .....	10
2.2.4. Salgılanan Toksinler ve Enzimler .....	11
2.3. <i>Bacteroides fragilis</i> Toksini .....	11
2.3.1. <i>Bacteroides fragilis</i> Toksini'nin Yapısı.....	12
2.3.2. <i>Bacteroides fragilis</i> Toksini'nin Etki Mekanizması.....	13
2.4. Kolon Kanseri .....	14
2.4.1. Kolon Kanserinin Oluş Mekanizması.....	15
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
3.1. Gereçler .....	18
3.1.1 Besiyerleri.....	18
3.1.2. Standart Kökenler .....	18
3.1.3. PZR Malzemeleri .....	19
3.1.4. Hazırlanan Besiyerleri ve Solüsyonlar .....	19
3.2. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar.....	23
3.3. Yöntemler .....	25
3.3.1. Kökenlerin Seçimi.....	24
3.3.2. <i>Bacteroides fragilis</i> ve <i>bft</i> gen Bölgesinin Tespiti.....	24
3.3.2.1. DNA İzolasyonu.....	24
3.3.2.2. PZR Yöntemi .....	25
3.3.3. Kökenlerin Besiyerlerine Ekimi .....	26
3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme .....	27

<b>4. BULGULAR</b> .....	28
4.1. Sonuçların Grafik Üzerinde Gösterimi.....	30
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	33
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	37

Özgeçmiş

Etik Kurul Onayı

### III) KISALTMALAR VE SİMGELER

ETBF:.....	Enterotoksijenik <i>Bacteroides fragilis</i>
NTBF:.....	Nontoksijenik <i>Bacteroides fragilis</i>
BFT:.....	<i>Bacteroides fragilis</i> toksin
TCF:.....	T cell transcription factor
APC:.....	Adenomatous Poliposis Coli
NFK:.....	Nükleer Faktör Kappa $\beta$
IL:.....	İnterlökin
aa:.....	Amino Asit

#### IV) ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

##### i. Őekillerin Listesi

Şekil 1: *B. fragilis* 'in kapsül polisakkaritinin A ve B birimleri

Şekil 2: *B. fragilis* toksinin (BFT) Şematik yapısı

Şekil 3: BFT' nin hücre kültürlerinde yaptığı histolojik değişimin elektron mikroskopik görünümü

Şekil 4: *Bacteroides fragilis* toksinin patogenez modeli

Şekil 5: Bakteri süspansiyonlarının seri bir Şekilde dilüe edilmesi

##### ii. Resimlerin Listesi

Resim 1. *Bacteroides fragilis*'in zenginleştirilmiş %5 koyun kanlı agardaki görünümü

##### iii. Tabloların Listesi

Tablo 1. *Bacteroides fragilis* kökenlerinin virülans özellikleri

Tablo 2. PZR Koşulları

Tablo 3. Koloni Sayımlarının Ortalama Değerleri

Tablo 4. Kökenlerin, bazal besiyerine ve farklı oranda tuz bulunduran diğer besiyerlerindeki üreme oranlarının karşılaştırıldığı verilerin p değerleri

Grafik 1: *bft2* pozitif kökenlerin negatif kontrol kökenle karşılaştırıldığı veriler

Grafik 2: *bft1* pozitif kökenlerin negatif kontrol kökenle karşılaştırıldığı veriler

Grafik 3: Kökenlerin hepsinin verileri

## ÖZET:

Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) ishale neden olmaktadır. Son çalışmalar, ETBF ile inflamatuvar barsak hastalıkları ve kolon kanseri arasında bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir. Bakterinin toksik etkisi, salgıladığı, frajilizin adı verilen çinkoya bağımlı bir metalloenzimin, E-kaderin'i (zonula adherens proteini) parçalamasına bağlanmıştır. Frajilizin barsak epitel hücrelerinde farklılaşmaya, ardından hücre çekirdeği sinyal proteinlerinde uyarılmaya, proto-onkojen c-Myc' nin transkripsiyon ve translasyonunda artışa ve epitel hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. ETBF, *bft-1*, *bft-2* ve *bft-3* genleriyle kodlanan üç farklı enterotoksin izoformu üretebilmektedir.

Bazı araştırmalar, yüksek miktarda kalsiyum almanın kolon kanser riskini azaltabileceğini öne sürülmektedir. Mekanizması tam açıklanmış olmamakla beraber, E-kaderin ekspresyonunu arttırarak, hücrel sinyal aktivasyonunu baskılayarak kalsiyumun etkili olabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, çinkoya bağımlı metalloenzim bulunduran ETBF'nin üremesi üzerine herhangi bir etki yapıp yapmadığı araştırılmıştır. İkisi *bft-1* ikisi de *bft-2* geni taşıyan toplam dört ETBF kökeni çalışılmıştır. Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ve çinko klorür ( $\text{ZnCl}_2$ ) tuzlarının ETBF üremesine etkisi kantitatif kültür ile araştırılmıştır. Bunun için, normal ve yüksek doz kalsiyum alınması halinde barsak kalsiyum konsantrasyonlarını temsil eden, farklı tuz konsantrasyonlarıyla hazırlanmış besiyerlerinde gerek bakterilerin üreme profilleri gerekse doza yanıt durumları incelenmiştir. Veriler SPSS versiyon 11.0 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Kalsiyum klorür tuzları tüm bakteri kökenlerinin üremesi üzerinde inhibitör etki göstermiştir; özellikle yüksek düzeyde  $\text{CaCl}_2$ , *bft2* + geni taşıyan kökenlerin koloni sayısında belirgin şekilde azalma göstermiştir ( $p=0.008$ ). İstatistiksel anlamlı bir fark olmamakla beraber  $\text{ZnCl}_2$ ' nin, tuz bulunmayan kontrol besiyerindeki kültürlerle göre daha fazla sayıda koloniye neden olmuştur.

Bulgularımız, kalsiyumun ETBF kökenleri üzerine antimikrobal etkisinin olabileceğini göstermektedir, ancak kalsiyumun enterotoksik etkide bir değişiklik yapıp yapmadığının araştırılması gerekmektedir.

---

Anahtar Sözcükler: Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*, frajilizin, E-kaderin, metalloenzim, iyonize kalsiyum

**SUMMARY: Investigation of the effect of different calcium concentration on the growth of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains**

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) has been implicated in diarrhoeal illness. Recent data suggest that ETBF may be associated with inflammatory bowel disease and colonic cancer. Toxigenicity of bacterium is attributed to expression of a zinc-dependent metalloenzyme referred to as fragilysin, which cleaves the E-cadherin (zonula adherens protein). Fragilysin causes alteration of intestinal epithelial cells, and then stimulates nuclear signaling proteins, induces transcription, translation of proto-oncogene c-Myc and epithelial cell proliferation. ETBF can produce three isoforms of the enterotoxin which encoded by *bft-1*, *bft-2* and *bft-3* genes.

Some research suggests that a high calcium intake may decrease the risk of colon cancer. Although, the underlying mechanism is unclear, it has been suggested that calcium can be effective by increasing the expression of E-cadherin and suppressing the activation of nuclear signaling.

In this study we investigated whether the calcium to be effective on growth of ETBF which produces a zinc-dependent metalloenzyme. A total of four ETBF strains (two *bft-1+*, two *bft2+* strains) were tested. Individual effects of calcium (CaCl<sub>2</sub>), and zinc (ZnCl<sub>2</sub>) chloride salts on growth of ETBF strains were carried out with quantitative cultivation. In order to assess potential activities of different salt concentrations on growth parameters and dose-response profiles of strains, media with different salt concentrations which represent the normal and high dose calcium intake levels as in intestines, were evaluated. The data was analyzed by using SPSS version 11.0 software. Calcium salts exerted a significant inhibitory effect on the growth of all bacterial strains; particularly high level CaCl<sub>2</sub> resulted in significant decrease in number of bacterial colonies of *bft-2+* strains (p=0.008). Although there were no statistically differences but slightly high number of colonies were grown on culture media with ZnCl<sub>2</sub> when compared with medium without salt.

Our results indicate the presence of antimicrobial effect of calcium on ETBF strains, however, any presence of a link to the changing of enterotoxin effect remains to be established.

---

Key Words: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, fragilysin, E-cadherin, metalloenzyme, ionized calcium

## GİRİŞ ve AMAÇ

Normal barsak florasında bulunan *Bacteroides fragilis* kökenlerinin bazıları frajilizin adı verilen bir enterotoksin salgılamaktadır. Bu enterotoksin, barsak epitel hücrelerinde birtakım morfolojik değişikliklere yol açmakta, özellikle küçük çocuklarda ishale neden olmaktadır (1,2). Son yıllarda enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) kökenlerinin, bazı kronik inflamatuvar barsak hastalıklarıyla ilişkisi gösterilmiştir (3,4).

Bir metalloenzim olan frajilizin aktif bölgesinde iki değerlikli çinko atomu ( $Zn^{++}$ ) taşımaktadır. Frajilizin etkisini, barsak epitel hücreleri arasında yer alan, sıkı bağlanmayı sağlayan Zonula Adherens'in ekstraselüler parçası E-kaderin'i parçalayarak göstermektedir. E-kaderin'in yıkılmasıyla hücre içi sinyal mekanizmaları devreye girmekte, çekirdekte c-Myc gibi birtakım onkojen proteinlerin ekspresyonu artmaktadır. Frajilizin'in kolon kanseri oluşumunda rolü olabileceği yönünde varsayımlar bulunmaktadır (3,4). Nitekim hastanemiz ve GATA Genel Cerrahi Anabilim Dallarıyla yapılan ortak çalışmada, kolon kanserli hastaların dışkı örneklerinde ETBF pozitifliği normal kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (5).

Mekanizması tam olarak anlaşılamamakla beraber diyetle düzenli alınan yüksek doz kalsiyumun, kolon kanseri oluşumunu önlediği ve kalsiyum sabunları olarak bilinen çözünmeyen kompleksler oluşturarak gastrointestinal sistemde safra asitleri ve yağ asitlerini bağladığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (6). Yapılan diğer moleküler çalışmalarda ise kalsiyumun E-kaderin ekspresyonunu arttırarak,  $\beta$ -katenin/TCF aktivasyonunu baskılayarak etkisini gösterdiği anlaşılmıştır (7).

Bu bilgiler ışığında iki değerlikli pozitif yüke sahip ( $Ca^{++}$ ) kalsiyumun, aktif bölgesinde iki değerlikli  $Zn^{++}$  atomu taşıyan ve bir metalloenzim olan frajilizin üreten ETBF kökenlerinin üremelerinde etkili olabileceği öne sürülebilir.

Bu varsayımdan yola çıkarak çalışmamızda, besiyerlerine farklı oranda kalsiyum eklenmesi halinde ETBF kökenlerinin üremelerinde bir farklılığın olup olmayacağı

araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışma, kalsiyumun ETBF kökenlerinde toksin üretimine veya oluşan toksinin fonksiyonuna herhangi bir etkisinin olup olmayacağına yönelik yeni araştırmalara yol gösterecek bir n çalışma olarak planlanmıştır.

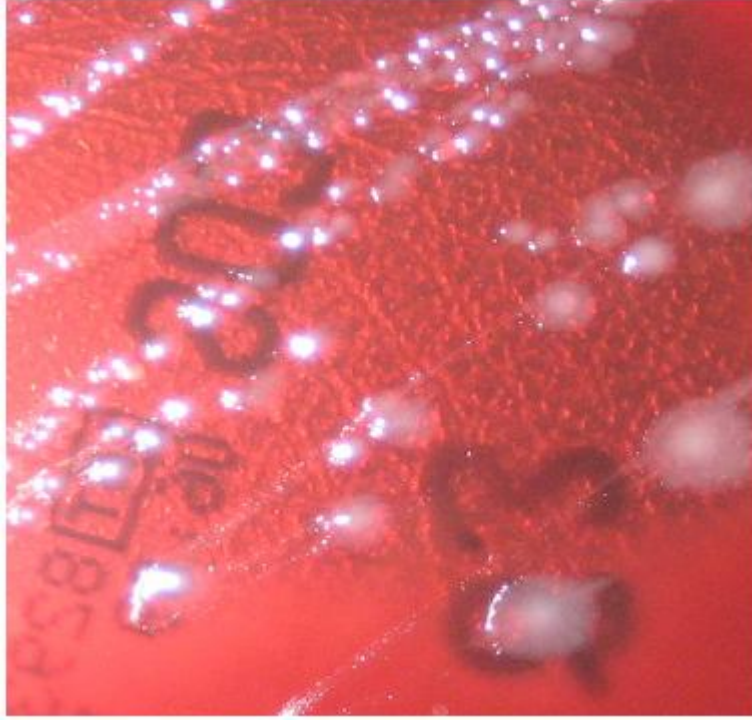
## 2.GENEL BİLGİLER

Barsak florasının önemli bir kısmını oluşturan *Bacteroides*'ler, karın bölgesine gerçekleşen travma veya cerrahi girişimler, anaerop bakterilere etkisiz antimikrobik tedavi uygulamaları, malign hastalıkların varlığı ve bağışık yanıtın baskılanması gibi durumlarda ölümcül enfeksiyonlara yol açabilirler. Çoğunlukla diğer bakterilerle birlikte batın içi apseleri, diyafram altı ve cerrahi yara yeri miks enfeksiyonları şeklinde bulunurlar, bakteremiye neden olabilirler (8,9).

### 2.1.*Bacteroides* Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

*Bacteroides* türleri, zorunlu anaerop, penisilin ve safraya dirençli sporsuz, gram negatif basil veya kokobasillerdir. Bipolar boyanmış ya da pleomorfik görünümde olabilirler. Eni 0,5–0,8 µm, boyu 1,5–9 µm arasında değişmektedir. Bu bakteriler, anaerop ortamda 37° C'de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından koyun kanlı besiyerinde 1-3 mm çapında yuvarlak, düzgün sınırlı, konveks, gri-beyaz renkli, hemoliz yapmayan koloniler oluştururlar (Resim1). *Bacteroides* cinsi bakteriler, diğer anaerop gram negatif basillerden, safra (%20) varlığında üreyebilme ve kanamisin, vankomisin ve kolistin disklerine dirençli olma özellikleriyle ayırt edilirler (9,10).

Gram negatif anaerop basil ilk kez, Veillon ve Zuber tarafından 1898 yılında *Bacillus fragilis* olarak tanımlanmıştır. Ancak, 1919 yılında Castellani ve Chalmers bu bakterinin, *Bacteroides* olarak tanımladıkları cins içinde yer almasını uygun görmüşlerdir (11). O zamandan günümüze kadar sınıflamada pek çok değişiklik yapılmış, özellikle moleküler genetik çalışmaların sonuçlarına göre yeni türler belirlenmiş, *Bacteroides fragilis* grubu içinde yer alan bazı türler başka cinslerin içine taşınmıştır (12,13). Yeni sınıflamaya göre, *Bacteroides* cinsi içerisinde *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. fingoldii*, *B. fragilis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotamicron*, *B. uniformis* ve *B. vulgatus* türleri yer almaktadır. *Bacteroides* türleri içinde etken patojen olarak en sık *B. fragilis* izole edilmekte bunu *B. thetaiotamicron* izlemektedir (10).



**Resim 1:** Hemin, K1 vitamini ve %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde *Bacteroides fragilis* kolonilerinin görünümü

## **2.2. *Bacteroides fragilis*' in Virülans Özellikleri**

Diğer *Bacteroides* türlerine göre barsak florasında 10 ile 100 misli daha az bulunmakla birlikte, *B. fragilis* kökenlerinin anaerop enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilmesi, bu türün daha patojen olmasına bağlanmıştır. *B. fragilis*'in diğer *Bacteroides* türlerinde bulunmayan ya da kantitatif farklılıklar gösterdiği bilinen birtakım virülans faktörlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo1) (14). Enfeksiyonun başlangıcı genellikle konak faktörüne bağlı olmakla beraber, enfeksiyonun sürecini bakterinin virülans özellikleri etkilediği öne sürülmektedir. Örneğin, kan kültürleri gibi invaziv örneklerden izole edilen *B. fragilis* kökenlerinde daha yüksek oranda enterotoksin varlığı tespit edilmiştir (15).

Tablo 1: *Bacteroides fragilis* kökenlerinin virülans özellikleri

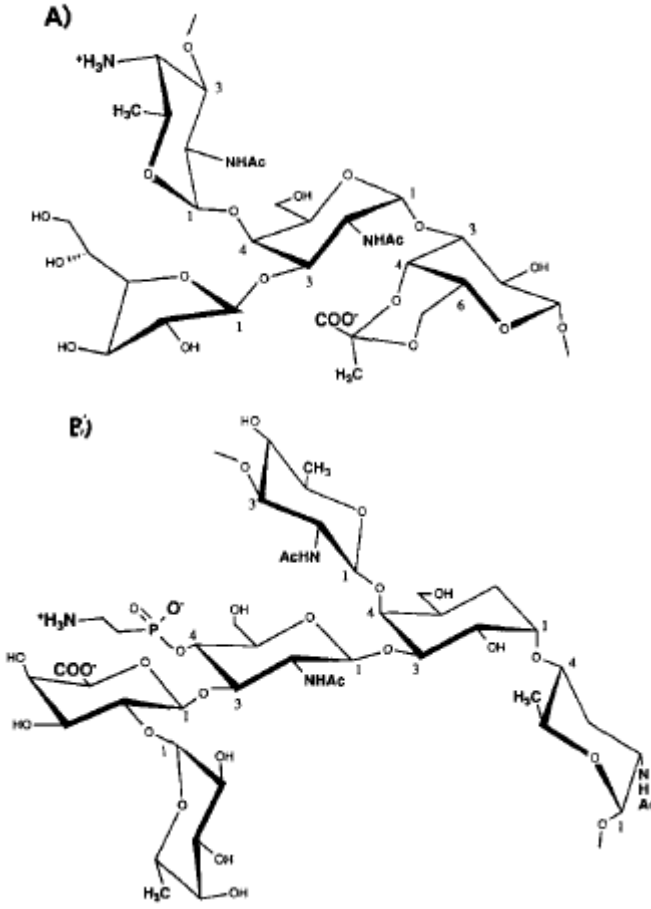
1- Kolonizasyonu sağlayan, bakterinin dış yapısında yer alan oluşumlar
a. Kapsül polisakkaridi
b. Lipopolisakkarit yapısı
c. Dış zar proteinleri
d. Piluslar
-----
2- İnvazyonun gerçekleşmesi
-----
3- İnfeksiyon alanında çoğalma ve konağın savunma sisteminden kaçma
-----
4- Salgılanan enzimler ve toksinler

### 2.2.1. Bakterinin Dış Yapısında Yer Alan Kolonizasyonu Sağlayan Oluşumlar

#### 2.2.1.a: Kapsül Polisakkaridi

*Bacteroides fragilis*'in, kapsül yapısı nedeniyle barsak mukozasına bağlanabildiği, barsağın peristaltik hareketlerinden ve dışkı oluşumu sürecinden etkilenmediği öne sürülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar da bu hipotezi doğrulayan sonuçlar elde edilmiş, kolon lavajı ve biyopsi örneklerinin kantitatif kültürlerinde, dışkıda %4, biyopsi örneklerinde ise %44 oranında *Bacteroides fragilis* tespit edilmiştir (16).

Kapsül polisakkaridi, iki farklı alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimlerin her biri pozitif yüklü amino ve negatif yüklü karboksil veya fosfat grupları bulunduran tekrarlayan dizilerden oluşmaktadır. İki birim arasındaki iyon yükü, apse oluşumunu başlatmada önemli rol oynayan, sıkı şekilde bağlanan yüksek molekül ağırlıklı kompleksler meydana gelmektedir (17).



Şekil 1: *B. fragilis*'in kapsül polisakkaritinin A ve B birimleri (17)

Kapsül yapısı diğer bakterilerin çoğunda T-hücreden bağımsız yani antikora bağımlı immün cevabı stimüle ederken, *Bacteroides fragilis*' in kapsülü T hücre bağımlı immün cevabı stimüle etmektedir (18). *Bacteroides fragilis*'in polisakkarit kapsülüne karşı konak immün sistemi, apse oluşumu şeklinde bir patolojik cevap oluşturmaktadır (19). Apseler, fibröz bir zar ile çevrilen ölü polimorf nüveli lökositler, hücresel atıklar ve bakterilerden meydana gelir. Apseler, fistül oluşumuna giden komplikasyonlara yol açabilir, bakteremi veya metastazla sonlanan yaygın enfeksiyonlara ve ölüme neden olabilir (14,16).

### **2.2.1.b: Lipopolisakkarit Yapısı**

Lipopolisakkarit, bakteri hücre duvarının en dış tabakasında yer almakta ve hücre duvarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. *Bacteroides* kökenlerinde lipopolisakkarit yapısının enterik bakterilerinkine göre daha zayıf etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu farklılık, lipopolisakkaritlerin endotoksin etkisinden sorumlu lipit A yapısında 3-hidroksimiristik asidin, indirgenmiş amino şekerlerin ve fosfat gruplarının bulunmamasına bağlanmıştır. Bu durum *B. fragilis*'in düşük endotoksin aktivitesini göstermektedir (20,21).

### **2.2.1.c: Dış Zar Proteinleri**

*Bacteroides fragilis* kökenlerinin kendilerine özgü dış zar proteinlerinin bulunduğu anlaşılmıştır (22). Sayıları 7 ile 10'u bulan ana proteinlerin kompozisyon ve miktarı üreme koşullarına göre farklılık göstermektedir. Özellikle demir elementinin, bakterinin üremesinde ve proteinin yapılmasında önemli olduğu görülmüştür. Çalışmalar enfeksiyon sürecinde bu elementin kullanılmasında, konak ile bakteri arasında büyük bir rekabetin olduğunu göstermiştir. Ayrıca demir bulunmayan ortamda üretilen *B. fragilis* kökenlerinde, üç protein yapımının baskılandığı, bunlardan IROMP'un antikor yapımını indüklemeye önemli işleve sahip olduğu bildirilmiştir (23).

### **2.2.1.d: Piluslar**

Özellikle kapsülsüz *B. fragilis* suşlarında pilus yapısının epitel hücrelerine daha kolay tutunmayı sağladığı bilinmektedir (15).

## **2.2.2: İnvazyonun gerçekleşmesi**

*Bacteroides* bakterilerin çoğu temelde invaziv özelliğe sahip değildir. Sağlam epitel ve mukozadan iç kısımlara nüfuz etmezler. Travma, hipoksi, doku hasarı ve neoplazma gibi zedelenmeye yol açan durumlar bakterilerin invazyonunu

kolaylaştırır. Ayrıca *Bacteroides* kökenlerinin salgıladıkları enzimler de invazyonda önemli rol oynar (14,15).

### 2.2.3: Enfeksiyon Alanında Çoğalma ve Konağın Savunma Sisteminden Kaçma

Periton boşluğuna geçen flora elemanlarının temizlenmesi için konakta bir takım bölgesel olaylar başlatılır. Buna rağmen *B. fragilis* grubu bakterilerinin oluşturduğu inflamatuvar yanıtla bağlı olarak sızan plazma, bakteri etrafında bir fibrin ağı oluşturmaktadır. Bu fibrin ağı çok sayıda bakteri için bir sığınak görevi görmekte böylece konağın fagositik hücrelerinden bakteriyi koruyarak, çoğalmasını sağlamaktadırlar. Diğer yandan fibrinin fagositik hücrelerin göçünü azalttığı, ayrıca bakterileri sararak opsonize olmasını önlediği dolayısıyla bakterileri nötrofillerin etkisinden koruduğu saptanmıştır (24).

*Bacteroides fragilis*'in polisakkarit yapıdaki kapsülünde antifagositik etkiye sahiptir ve kapsül kalınlığının opsonizasyonu ve dolayısıyla nötrofiller tarafından fagositozu etkilediği tespit edilmiştir (25).

*Yine Bacteroides* kültür süpernatantlarından elde edilen, yaklaşık 3,5 kD ağırlığındaki ısıya dayanıklı bir proteinin henüz bilinmeyen bir nedenle nötrofil göçünü önlediği saptanmıştır (26).

Bakteri kültür filtratlarından açığa çıkan süksinik, asetik, propionik ve fenil asetik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin nötrofil fonksiyonunu bozduğu gözlenmiştir. Plazma zar engelini aşarak nötrofil sitoplazmasına giren yağ asitlerinin, hücre içi pH'sını düşürdüğü, enzimlerin çalıştığı optimum koşulları değiştirdiği gösterilmiştir (27).

Yapılan çalışmalarda *Bacteroides* kökenlerinin fakültatif anaerob bakterilerle birlikte apse oluşturma özellikleri, her bir bakterinin yalnız başına apse yapma özelliğinden daha yüksek bulunmuştur. Miks enfeksiyonlarda yer alan *Bacteroides*'lerin *E. coli* gibi belirli fakültatif anaerob bakterilerin üremesini arttırdığı saptanmıştır. Anaerob bakteriler fagositlerin aktivitesini bozarak aerob bakterilerin fagositozdan korunmalarını sağlarken, fakültatif mikroorganizmalar ise oksidasyon-redüksiyon potansiyelini azaltarak anaerob organizmaların üremesine yardımcı olmaktadır. Normalde *B. fragilis* hemoglobülin ve heptaglobülini demir ve

porfrin kaynağı olarak kullanmaktadır. Batın içi apsesi gibi demirin sınırlı olduğu ortamlarda bakteri bu ihtiyacını *E. coli*'nin hemoglobin bağlayan proteinini kullanarak giderir (15,23, 24).

#### **2.2.4.Salgılanan Enzimler ve Toksinler**

*Bacteroides fragilis*, hyaluronidaz, kondrotin sülfataz, kollojenaz, nöraminidaz, DNaz, heparinaz, hemolizin A, hemolizin B, fosfolipaz C gibi enzimleri hücre dışına salgılar. Bu enzimler, bakterinin patogeneğinde önemli rol oynamakta, özellikle konak dokuya invazyonda yardımcı olmaktadır (28,29).

Bazı *B.fragilis* kökenlerinin bir metalloenzim olan enterotoksin salgıladıkları gösterilmiştir.

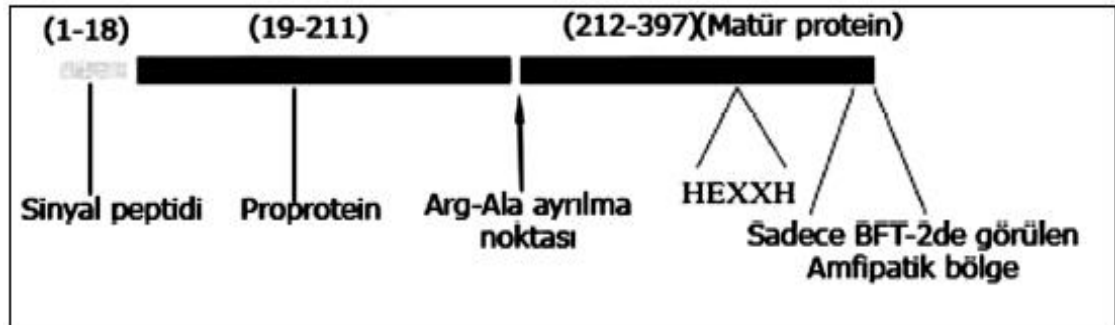
#### **2.3.Bacteroides fragilis Toksini**

*B. fragilis*'in, çiftlik hayvanları ve insanlarda, özellikle küçük çocuklarda sulu ishale neden olduğu bildirilmiştir. İshale neden olan bakterilerin 20 kD ağırlığında, ısıya duyarlı, protein yapısında bir toksin salgıladığı bildirilmiştir. Metalloproteaz yapısında olan bu toksine *Bacteroides fragilis* toksin (BFT) veya frajilizin ve bu toksini salgılayan suşlara ise enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) adı verilmiştir. Bakterinin toksik etkisi, ilk olarak 1984 yılında Myers ve arkadaşları tarafından deneysel kuzu modelinde tanımlanmıştır. Yapılan farklı hayvan deneyleriyle ETBF'in hastalık oluşturabileceği gösterilmiş (30,31). Daha sonra, İtalya, Bangladeş ve Japonya gibi ülkelerde, ishali çocukların dışkılarında %12 ile % 14.9 arasında değişen ETBF pozitifliği saptanmıştır. Bunun yanında sağlıklı kişilerde bölgelere, beslenme alışkanlıklarına göre değişen, %1 ile %12 oranlarında görülen bir ETBF pozitifliği bildirilmiştir (32,33,36). Bangladeş'te yapılan bir başka çalışmada da *B. fragilis* pozitifliği olan 0-2 yaş grubu ishali çocukların % 20.3'ünde ETBF pozitif bulunmuştur (37).

ETBF'nin sadece ishal etkeni olmadığı bağırsak dışı enfeksiyonlarda da izole edildiği gözlenmiştir. Almanya'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda kan, yara ve yumuşak doku gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen *B. fragilis* suşlarının % 10'u ETBF olarak tanımlanmıştır ve bu suşların patojenik potansiyelinin ETBF negatif suşlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (34,38). Diğer yandan ETBF'in, inflamatuvar barsak hastalıklarına ve kolorektal kanserlere yol açabileceğine yönelik hipotezler ileri sürülmüş ve bu hipotezleri doğrulayacak bazı sonuçlar bildirilmiştir (3,4).

### 2.3.1: *Bacteroides fragilis* Toksinin Yapısı

Enterotoksijenik *B. fragilis* BfPAI olarak bilinen ve 6 kb'lik kromozom bölgesini içine alan patojenite adasına sahiptir. Patojenite adasının 1191 nükleotitten oluşan *bft* gen bölgesinin ekspresyonu ile pre-protoksin öncül protein sentezi gerçekleşir. Pre-protoksin 397 aminoasitten (aa) oluşur, bunun 18 aa'si sinyal peptidi, 193 aa'si propeptid ve 186 aa'si ise matür protein olmak üzere üç ardışık peptid bölgesine sahiptir (Şekil 2) (39,40). Protoksinin, arginin ve alanin amino asitleri arasındaki bağın kırılması ile matür açığa çıkar. *bft* gen bölgesinin, *bft-1*, *bft-2* ve *bft-3* olarak bilinen üç varyantı tanımlanmıştır. Safılaştırılmış enterotoksinlerle yapılan çalışmalarda, üç varyant gen bölgesinden kodlanan toksinlerin, HT29/C1 hücreleri üzerinde farklı aktivite sergiledikleri görülmüş, BFT2 toksininin en fazla, BFT3'ün ise en düşük toksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir (39, 41).

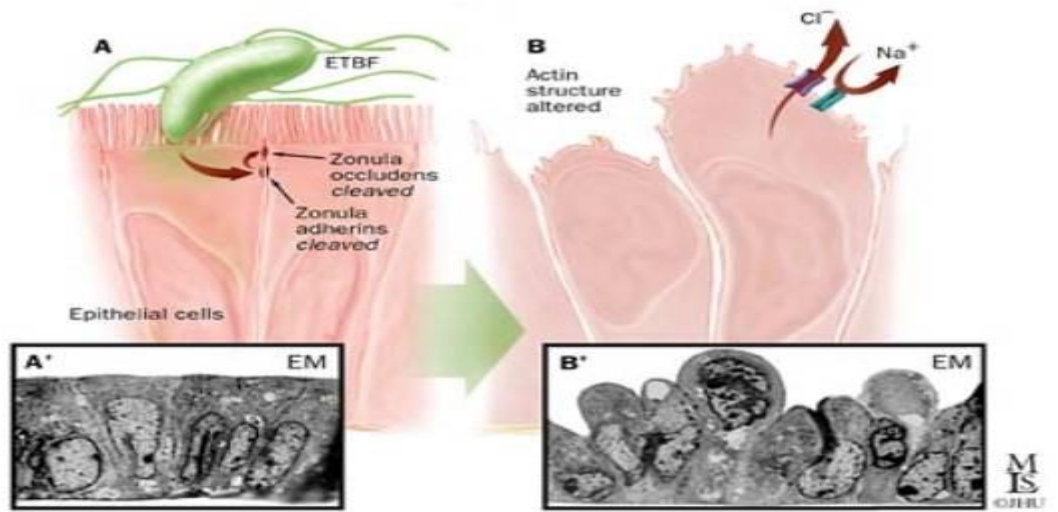


Şekil 2: *Bacteroides fragilis* toksinin şematik yapısı

### 2.3.2. *Bacteroides fragilis* Toksinin Etki Mekanizması

Yapılan in vitro çalışmalarda BFT'nin, HT29/C1 hücreleri üzerine hızlı toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Hücrelerde, BFT ile karşılaşma sonrasında morfolojik değişikliklerin olduğu ve bu morfolojik değişikliklerin toksin uzaklaştırıldıktan sonra bile, 48 saate kadar devam ettiği gözlenmiştir (42).

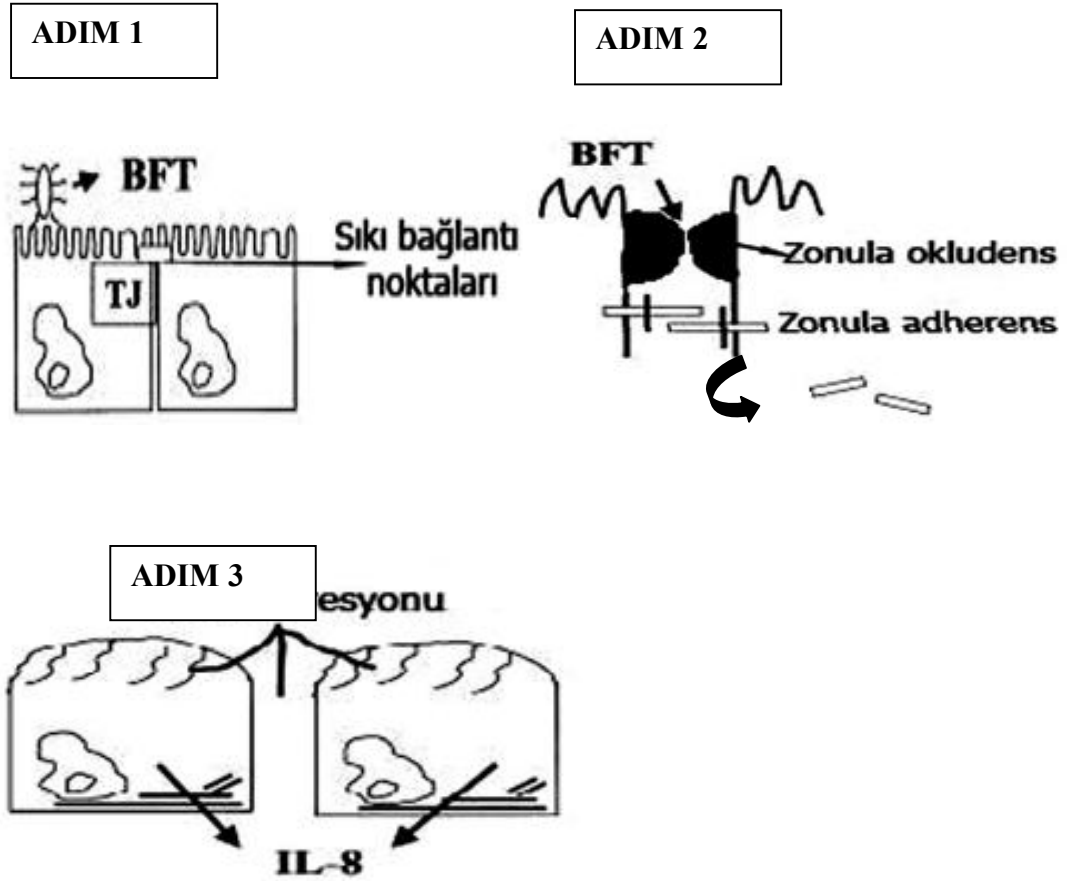
Barsak epitel hücreleri arasındaki sıkı bağın yıkılması ile hücre morfolojisi bozulur, barsak doku direnci azalır,  $Cl^-$  ve  $Na^+$  iyonlarının dışarı akışında, dolayısıyla barsak sekresyonunda artış görülür (Şekil 3) (32).



Şekil 3: BFT'nin hücre kültürlerinde yaptığı histolojik değişimin elektron mikroskopik görünümü (35).

Toksinin in vivo etkisi, barsak epitel hücreleri arasında yer alan sıkı bağlantının kırılmasıyla gerçekleşmektedir. Toksin varlığında birkaç dakika içinde, sıkı bağlanmayı sağlayan zonula adherensin bir proteini olan E-kaderin parçalanmaya başlamaktadır. E-kaderin ekstraselüler kısmı kırıldıktan sonra intraselüler enzimler devreye girerek parçalanmayı tamamlar. Sıkı bağlantının ortadan kalkması, E-

kaderin hücre içi yapısına bağlı olan hücre iskeleti F-aktinin çökmesine neden olur. Tüm bu değişiklikler hücre içinde ardışık bir dizi olayı tetikler; özel sinyal ağı aracılığıyla F-aktinde yeniden şekillenme, proinflamatuar IL-8 sekresyonunda ve potansiyel onkojen proteinlerin kopyalanmasında artış gerçekleşir (Şekil 4) (40).



Şekil 4: *Bacteroides fragilis* toksinin patogenez modeli (40)

## 2.4.Kolon Kanseri

Kolorektal kanserler bütün dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir, insanlarda görülen kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. Diyet, çevresel etkiler, yaş, adenom ve karsinom öyküsü, aile öyküsü, özellikle inflamatuvar barsak hastalıkları gibi predispozan faktörler kanser gelişmesinde önemli rol oynar. Normal

bir kolon epitelyum hücresinin karsinom özelliği kazanması bir dizi mutasyonun ardında gerçekleşebilmekte ve yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir (43).

#### **2.4.1.Kolon Kanserinin Oluş Mekanizması**

Onkogenez ya da karsinogenez olarak tanımlanan, normal hücrenin kontrolsüz çoğalmasında hangi mekanizmaların rol oynadığı kolon kanserlerinde kısmen anlaşılabilmiştir (44). Hücre kontrol mekanizmalarında Wnt sinyal yolu anahtar rol oynar. Kolorektal kanserlerin %70-80'inde Wnt- $\beta$ -katenin sinyal yolunda, dolayısıyla hücre çoğalması ve farklılaşmasında kusurlar bulunmaktadır. Bir hücre içi proteini olan  $\beta$ -katenin, sinyal yolunun gerçekleşmesinde belirleyici etkiye sahiptir. Wnt proteinlerinin hücre yüzeyinde özgün reseptörlere bağlanmasıyla çok sayıda proteinin görev aldığı bir dizi reaksiyon gerçekleşir.  $\beta$ -kateninin bir kısmı, sitoplazmadan çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini (TCF/LEF-1) aktive eder ve c-Myc gibi genlerin transkripsiyonunu sağlar. Sitozolda biriken  $\beta$ -kateninin diğer bir kısmı ise hücreler arası bağlantıda önemli rol oynayan E-kaderin'in sitozol içindeki kısmına bağlanır (45, 46).

Adenomatöz Polipozis Coli (APC) geninin kodladığı sitoplazmik protein,  $\beta$ -kateninin üzerinde etkisini gösterir. Hücre proliferasyonu gerekmeyen durumlarda APC proteinleri sitoplazma içinde bulunan serbest  $\beta$ -kateninlerin yıkılmasını sağlar. Ancak APC geninde oluşan mutasyonlarda hücre içi  $\beta$ -katenin miktarında, dolayısıyla c-Myc gibi genlerin transkripsiyonunda artış gözlenir. APC protein kaybı benign poliplerin oluşumuna yol açar ve ek genetik değişikliklerin meydana gelmesiyle malin tümör ortaya çıkar (47).

Kolorektal kanserin moleküler gelişme mekanizması ile ETBF'nin barsak epitel hücresinde oluşturduğu değişiklikler ilişkilendirmek istendiğinde, gerek kanserli hücrede, gerekse frajilizine maruz kalan hücrede gerçekleşen olaylar dizisinin benzer olduğu görülmektedir.

Kolon epitel hücrelerine kolonize olan ETBF'nin salgıladığı toksin, hücreler arasında yer alan E-kaderin bağının kopmasına sebep olmaktadır. E-kaderin bağının kopması, hücre geçirgenliğinin bozulması yanı sıra,  $\beta$ -katenin/Wnt sinyal yolağının başlamasına dolayısıyla c-Myc gibi birtakım onkojen proteinlerin ekspresyonu neden olmaktadır.

Bunun yanında BFT, kolon epitel hücrelerinde hem Nucleer Faktör kappa  $\beta$  yolunu aktifleyerek proinflamatuvar sitokin salgılanmasına, hem de interlökin 8 ekspresyonuna ve salgılanmasına neden olmaktadır (48).

Bu veriler ETBF'nin inflamatuvar ve onkojenik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ülkemizde yapılan ve bu bilgileri destekler nitelikte olan bir çalışmada kolon kanserli hastalarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek ETBF pozitifliği bulunmuştur (5).

Mekanizması tam olarak anlaşılammakla beraber diyetle düzenli alınan yüksek doz kalsiyumun, kolon kanseri oluşumunu önlediği ve kalsiyum sabunları olarak bilinen çözünmeyen kompleksler oluşturarak gastrointestinal sistemde safra asitleri ve yağ asitlerini bağladığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (6,49). Chakrabarty ve ark. (7) yaptıkları çalışmalarda ekstraselüler kalsiyum ve Human parathyroid calcium sensing receptor (CaSR)'in E-kaderin ekspresyonunu arttırdığı, hücrenin malign davranışını baskıladığı bulunmuştur. Ayrıca kalsiyumun kemoprotektif etkisinin E-kaderin ekspresyonunda artışa,  $\beta$ -katenin/TCF aktivasyonunda baskılanmaya bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine son yapılan randomize çalışmalarda, kalsiyum eklenmesiyle tekrarlayan kolorektal adenom riskinde azalma olduğu saptanmıştır.

Bu bilgilerin ışığında, kalsiyumun barsak hücrelerini onarıcı etkisiyle kanser riskini azalttığı söylenebilir. Ancak kalsiyumun, onkojenik kolon bakterisi olduğu ileri sürülen ETBF üzerine etkisi bilinmemektedir. Diğer bakterilerle yapılmış bir takım çalışmalarda, bazılarında antimikrobik etki bazı çalışmalarda ise bakteri üremesinde veya virülansında artış bildirilmiştir (50-52). Ancak, kalsiyumun ETBF üremesine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada da, farklı konsantrasyonlarda kalsiyum iyonunun, ETBF kökenlerinin üremesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Toksijenik kökenlerin ikisi kolon kanserli hastaların dışkısından elde edilmiş olup *bft1* ve *bft2* geni taşımaktadır. Diğeri ise apsede üretilmiş olup *bft1* geni taşımaktadır. Pozitif kontrol olarak *bft2* geni taşıyan (NCTC 11295), negatif kontrol olarak non-toksijenik *B. fragilis* kökenleri kullanılmıştır.

### 3.GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Besiyerleri

1. %5 koyun kanlı Agar (Becton Dickinson)
2. Brain-Heart İnfusion Broth (Becton Dickinson)
3. Farklı miktarda Ca ve Zn içelikli Bazal Medium Katı besiyeri
4. Skim Milk

##### 3.1.2. Standart Kökenler

1. ATCC 25285 *Bacteroides fragilis*: Enterotoksin salgılamayan köken, negatif kontrol olarak kullanıldı.
2. NCTC 11295 *Bacteroides fragilis*: Enterotoksin salgılayan, *bft2* genine sahip köken, pozitif kontrol olarak kullanıldı.
3. A-18: Kolon kanserli hasta dışkısından üretilmiş Enterotoksin - *bft2* genine sahip köken (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri stoklarından)
4. A-24: Kolon kanserli hasta dışkısında üretilmiş Enterotoksin – *bft1* genine sahip köken (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri stoklarından)
5. 87-T1: Apsede üretilmiş Enterotoksin – *bft1* genine sahip köken (Prof. Dr. Sidney M. Finegold, Los Angeles, CA, USA)

### 3.1.3. PZR Malzemeleri

- PZR Master Miks (2X) (Fermentas)
- 6 x Yükleme boyası (Loading Dye, MBI Fermentas)
- 100 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)
- DNaz- RNaz içermeyen distile su (MBI Fermentas)
- 10x TBE Tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
- 200 µl sarı, 1000 µl mavi pipet ucu (DNaz, RNaz içermeyen) (Axygen)
- Agaroz (Prona)
- Etidyum bromid (Merck)
- 1,5 ml'lik mikrotüpler (Axygen)
- Eldiven (Beybi)
- BFT forward ve reverse primerleri(Fermentas)

### 3.1.4. Hazırlanan Besiyerleri ve Solüsyonlar

#### **%5 Koyun Kanlı Agarın Hazırlanışı**

Toz besiyerinden 40 gram tartılıp 1 lt distile su ile karıştırılıp 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50°C'ye gelinceye kadar soğutulmuş, birer ml hemin stok solüsyonu ve K vitamini, %5 oranında defibrine koyun kanı eklenip karıştırılmış, 9 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

#### **Skim Milk Saklama Besiyeri**

Toz besiyerinden 100 gram, 1 lt distile su ile karıştırılıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş, kriyo tüplere ikişer ml dağıtılarak bakterileri – 80 °C'de saklamak için kullanılmıştır.

## Bazal Medium Katı Besiyerinin Hazırlanışı (1000 ml)

### KISIM A:

1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... : 33,4 ml

1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... : 66,6 ml

FeSO<sub>4</sub> (7,3 mg/ml).....: 1 ml

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....: 0,4 gr

Agar.....: 15 gr

Toz bileşim 1 lt distile su ile çözdürülmüş, ardından soğutularak pH ölçümü yapılmıştır (pH:7.2–7.4) cam balon içinde otoklavda 121° C’de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 45-50° C’ye soğutulup, üzerine steril koşullarda

### KISIM B:

Glukoz.....: 2 ml (% 0,5’lik stok solüsyondan)

Hemin.....: 1000 µl

K vitamini..... : 100 µl

B<sub>12</sub> vitamini.....: 500 µl

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (%10).....: 4 ml

L-Cyctein (%5).....: 10 ml

KISIM B maddeleri eklenip karıştırılmış, 9 cm’ lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır (53).

Hazırlanan bu ana besiyeri (**Bazal Medium**) aynı zamanda kontrol amaçlı kullanılmıştır. Besiyeri bileşimindeki KISIM B hepsinde aynı olacak şekilde, KISIM A’ ya belirli miktarlarda kalsiyum veya çinko mineralleri eklenerek farklı 5 besiyeri daha hazırlanmıştır. Böylece farklı içerikli toplam 6 besiyerinde bakteri üreme özelliği değerlendirilmiştir.

- 1) **Bazal Medium KISIM A** + 0,57 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır)
- 2) **Bazal Medium KISIM A** + 1.08 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun yanı sıra, günde 1 gram kalsiyum preparatının alınması halinde barsaktaki kalsiyum miktarını yansıtmaktadır)
- 3) **Bazal Medium KISIM A** + 156  $\mu\text{l}$   $\text{ZnCl}_2$ , (Normal gıdalarla alınan çinkonun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır)
- 4) **Bazal Medium KISIM A** + 0,57 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  +156  $\mu\text{l}$   $\text{ZnCl}_2$  (Normal gıdalarla alınan kalsiyum ve çinkonun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır)
- 5) **Bazal Medium KISIM A** + 1.08 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  +156  $\mu\text{l}$   $\text{ZnCl}_2$  (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun yanı sıra, günde 1 gram kalsiyum preparatının alınması halinde barsaktaki kalsiyum ve çinko miktarını yansıtmaktadır)

### **Zenginleştirilmiş Brain Heart İnfüzyon (BHI) Sıvı Besiyerinin Hazırlanışı**

Brain-Heart infüzyon tozu..... 37 gr

Maya ekstraktı tozu..... 5 gr

L-sistein tozu..... 0,5 gr

Toz bileşim 1 lt distile su ile çözdürülmüş, ardından soğutularak pH ölçümü yapılmıştır (pH:7.2–7.4) cam balon içinde otoklavda  $121^\circ \text{C}$ 'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra  $45\text{-}50^\circ \text{C}$ 'ye soğutulup, üzerine steril koşullarda, hemin stok solüsyonundan 1ml, Vitamin K'dan 100  $\mu\text{l}$  ilave edilerek steril tüplerin her birine 4,5 ml dağıtılmıştır.

### **3.1.5. Hazırlanan Solüsyonlar**

#### **1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Stok Solüsyonunun hazırlanılması**

136 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp üzerine 1000 ml deiyonize su ilave edilmiştir.

#### **1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Stok Solüsyonunun hazırlanılması**

174 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılıp üzerine 1000 ml deiyonize su ilave edilmiştir.

#### **FeSO<sub>4</sub> Stok Solüsyonu**

FeSO<sub>4</sub>'den 0,136 gr tartılıp 10 ml deiyonize suda çözdürülmüştür.

#### **Glikoz Stok Solüsyonu**

25 gr glikoz 100 ml deiyonize suda çözdürülmüş filtreden (0,45 µm'lik membran filtre -Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir.

#### **Hemin Stok Solüsyonu**

0,1 gr hemin, 2 ml 1 N NaOH ile çözdürülmüş, üzerine 20 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

#### **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Stok Solüsyonunun hazırlanılması**

10 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılıp 100 ml deiyonize su ile sulandırılmıştır.

#### **L-sistein Stok Solüsyonu**

L-sistein'de 5 gr tartılıp 100 ml deiyonize su ile sulandırılmıştır.

### **TBE Tampon ( 10X, Stok Solüsyon)**

Tris Base..... 121, 10 gram

Borik Asit..... 61, 83 gram

EDTA..... 5, 84 gram

Distile su..... 1000 ml

Sodyum hidroksit ile pH 8' e ayarlanmıştır.

### **3.2. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar**

- Etüv (Memert)
- Pasteur fırını (Memert)
- Otoklav (Hirayama)
- Buzdolabı (Arçelik)
- ( - 20 °C ) Dondurucu (Uğur)
- ( - 80 °C ) Dondurucu (iShin)
- Steril plastik petripler
- Hassas terazi (Sartorius)
- Vorteks (Yellowline)
- Steril pamuklu çubuklar
- Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO-RAD)
- Elektroforez tankı ve cihazı (Biometra)
- Mikrodalga fırın (Beko)
- UV görüntüleyici (Vilber Lourmant)
- Santrifüjler ( Hettich)
- Otoklav (Hirayama)
- Cam balonlar, otomatik pipetler

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1 Kökenlerin Seçimi

Çalışmamızda 5 farklı *B. fragilis* kökeni kullanılmıştır. Bu kökenlerden ikisi standart kökenler iken üçü hastalardan izole edilen kökenlerdir. Standart kökenlerden biri ATCC 25285 *Bacteroides fragilis* (*bft2* geni negatif) diğeri ise NCTC 11295 *Bacteroides fragilis* (*bft2* geni pozitif)' dir. Diğer 3 kökenimizden ikisi kolon kanserli hasta dışkısından üretilmiş olup, Enterotoksin-*bft2* genine sahip A-18 kökeni ve Enterotoksin-*bft1* genine sahip A24 kökenidir. Üçüncü kökenimiz apseden üretilmiş olan Enterotoksin-*bft1* genine sahip 87-T1 kökenidir. "Skimmed Milk" besiyeri içinde -80°C'de stoklanmış olan kökenlerimiz hemin, K1 vitamini ve %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş besiyerlerine ekilerek, anaerop ortamda, 35–37°C'de, 48 saat inkübe edilmiştir.

Kökenlerin toksin genlerinin varlığı, saklama koşullarından meydana gelebilecek bir olumsuzluğun olup olmadığını anlamak amacıyla, yeniden çalışılmıştır. Bunun için aşağıdaki yöntemler dikkate alınmıştır.

#### 3.3.2. *Bacteroides fragilis* kökenlerinde *bft* Gen Bölgesinin Tespiti

##### 3.3.2.1. DNA İzolasyonu

Stoktan çözülen kökenlerin üçüncü pasajları yapıldıktan sonra ısıtma yöntemiyle DNA'ları elde edilmiştir. 500 µl'lik ependorfların içinde, 250 µl DNaz, RNaz içermeyen su konulmuş, bakteriden alınan 5- 6 koloni ile süspansiyon hazırlanmış, daha sonra ısı bloğunda 95 °C'de 20 dakika ısıtılmış, ardından 2 dakika en yüksek devirde santrifüj edilmiştir. Üst kısımda kalan sıvı DNA amplifikasyonu için kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.3.2.2. PZR Yöntemi

Bakteri DNA'ları izole edildikten sonra uygun primer çifti;  
BFT-F: 5'-TGG GAG ATG AGT TCG CAG TAT TA-3' ve  
BFT-R: 5'-CCA ACC GAG ATT TTT AGC GAT TA-3'  
kullanılarak *bft* gen bölgeleri tespit edilmiştir (54). Bunun için:

PZR karışımı.....12,5µl  
Primer (Forward).....0,5µl  
Primer (Reverse).....0,5µl  
H<sub>2</sub>O.....10µl

karıştırılmış ve üzerine 1,5µl bakteri DNA'sı eklenerek termal döngü cihazında çalışılmıştır. PZR koşulları tablo 2'de verilmiştir (54).

Tablo 2. PZR Koşulları

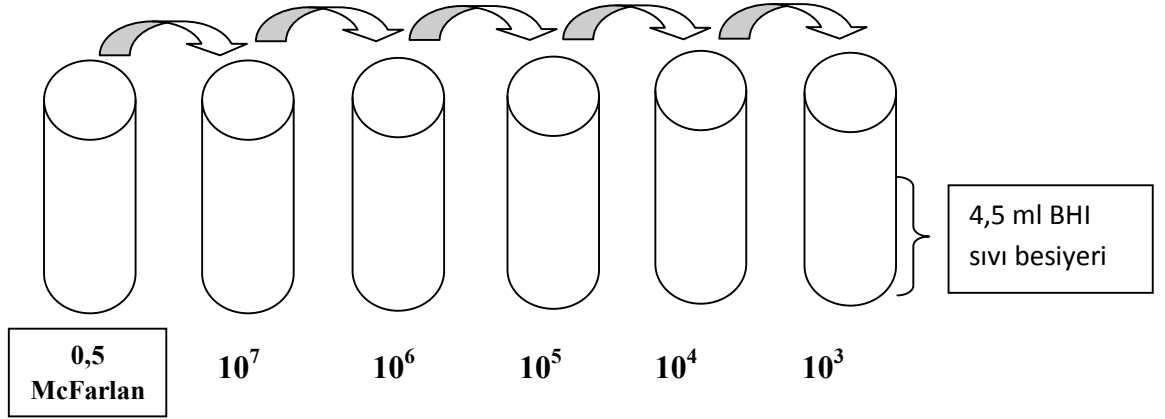
Primer	Döngü Koşulları
	95 °C 2 dk      1 döngü
BFT (F)	94 °C 45 sn
BFT (R)	42 °C 45 sn
	72 °C 1 dk
	} 30döngü

PZR ürünleri %1,5'luk agaroz jelde ve 1xTBE tamponu içinde 90 volt akımda 20 dakika yürütülmüş ve oluşan bantlar UV ışığı altında incelenmiştir. Gözlenen bantlar kontrol köken bantlarıyla kıyaslanmıştır.

### 3.3.3. Kökenlerin Besiyelerine Ekilmesi

*bft* gen bölgesine tespit edilen kökenler, ilk olarak zenginleştirilmiş koyun kanlı besiyerine ekilmiş, elde edilen kültürden 1-2 koloni alınarak K1 vitamini ve hemin ilave edilen brain-heart infüzyon sıvı besiyerlerine pasajları yapılmış ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

Zenginleştirilmiş sıvı besiyerinde üreyen kökenlerimizi yine aynı besiyeri ve uygun ortam koşullarında 0,5 McFarland ( $10^8$  cfu/ml) bulanıklığına getirdikten sonra, 4,5 ml miktarında dağıtılan zenginleştirilmiş sıvı besiyerinin bulunduğu tüplere 500  $\mu$ l aktararak 10 kez sulandırılmıştır. Seri sulandırmalara  $10^3$  cfu/ml oranında dilüe oluncaya kadar devam edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: Bakteri süspansiyonlarının seri bir şekilde dilüe edilmesi

$10^3$  cfu/ml oranında dilüe edilmiş olan bakteri süspansiyonlarının 100'er  $\mu$ l'si, belirli miktar  $\text{CaCl}_2$  ve  $\text{ZnCl}_2$  tuzlarının ilave edilmesiyle hazırlanan 6 farklı besiyerine sayım plağı yöntemiyle ekilerek, 5 gün anaerop ortamda  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

### 3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızın veri analizinde SPSS version 11.0 yazılım programı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum içeren besiyerlerine ekilen 5 kökenin üreme durumu değerlendirilmiştir. Bu her bir gruptaki altı ölçüm değerlerinin minimum, maksimum, aritmetik ortalama ve standart sapmaları hesaplandı. Her bir dağılımın normal dağılıp dağılmadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Her bir alt koşulda bazal medium ile diğer besiyerlerinde üreme ölçümlerinin ortalamaları karşılaştırıldı. (İki bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılması testi). Eğer her iki dağılım da normal dağılıyor ise burada t test yapıldı, iki dağılımdan en az birisi normal dağılmıyor ise, non-parametrik test olan Mann-Whitney U test yapıldı. Önemlilik testlerinin anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

İkisi kolon kanserli hastalarının dışkısından, birisi klinik örnekten izole edilmiş toplam üç ETBF kökeni, birisi negatif kontrol (ATCC 25285) diğeri pozitif kontrol köken (NCTC 11295) olmak üzere toplam 5 köken çalışmaya alınmıştır. Toksin gen bölgesinin varlığı PZR ile doğrulandıktan sonra farklı miktarda tuz içeren besiyerlerine ekilerek üreme durumları değerlendirilmiştir.

Koloni sayımları yapılan kültürlerin istatistiksel analizi, kökenlere göre ortalama değerleri ve p değerleri hesaplanarak, sonuçlar aşağıdaki tabloda verildiği gibi bulunmuştur.

**Tablo 3: Koloni Sayımlarının Ortalama Değerleri ( $\times 10^3$  cfu/ml)**

	ATCC	NCTC	A18	A24	87-T1
<b>MB</b>	66.67	73.83	188.60	83.50	289.60
<b>Ca</b>	114.83	51.33	1.20	71.00	226.60
<b>Ca ekstra</b>	51.00	14.17	.00	41.33	235.75
<b>Zn</b>	98.33	111.83	234.60	41.67	258.60
<b>Ca+Zn</b>	67.83	39.17	7.60	103.83	349.80
<b>Ca ekstra+ Zn</b>	47.33	4.83	.00	73.00	283.20

**MB:** Bazal medium ( Ana besiyeri),

**Ca:** + 0,57 gr CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır),

**Ca ekstra:** + 1.08 gr CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun yanı sıra, günde 1 gram kalsiyum preparatının alınması halinde barsaktaki kalsiyum miktarını yansıtmaktadır),

**Zn:** + 156 µl ZnCl<sub>2</sub>, (Normal gıdalarla alınan çinkonun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır),

**Ca+Zn:** + 0,57 gr CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O +156 µl ZnCl<sub>2</sub> (Normal gıdalarla alınan kalsiyum ve çinkonun barsaktaki miktarını yansıtmaktadır)

**Ca eks+Zn:** + 1.08 gr CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O +156 µl ZnCl<sub>2</sub> (Normal gıdalarla alınan kalsiyumun yanı sıra, günde 1 gram kalsiyum preparatının alınması halinde barsaktaki kalsiyum ve çinko miktarını yansıtmaktadır)

Ek kalsiyum miktarının *bft2* geni taşıyan NCTC 11295 ve A18 *B. fragilis* kökenleri üzerine inhibitör etkisi kalsiyum bulundurmeyen ortama göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur.

**Tablo 4. Kökenlerin, bazal besiyerine ve farklı oranda tuz bulunduran diğer besiyerlerindeki üreme oranlarının karşılaştırıldığı verilerin p değerleri**

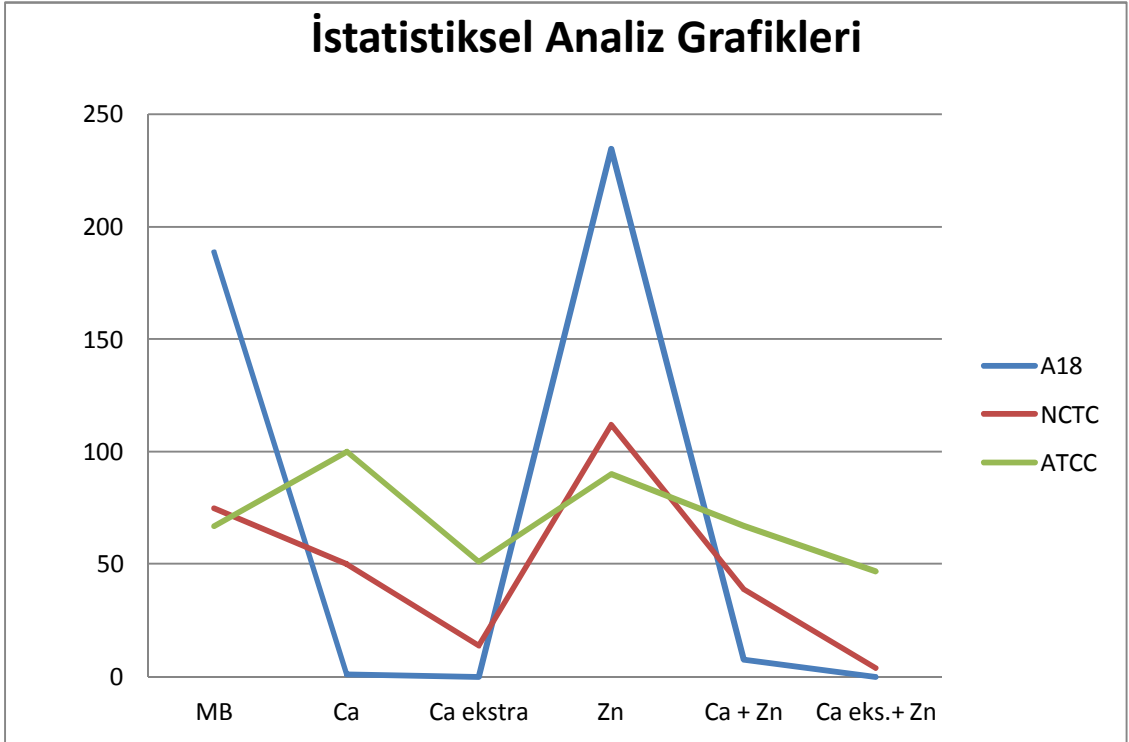
Karşılaştırılan koşullar		NCTC	ATCC	A18	A24	87-T1
		P değerleri				
MB	Ca gun	0.631	0.262	0.008	0.699	0.310
MB	Ca extra	0.004	0.688	0.008	0.132	0.905
MB	Zn	0.470	0.522	0.222	0.132	1.0
MB	Ca gun+Zn	0.109	0.631	0.008	0.394	0.222
MB	Ca extra+Zn	0.004	0.873	0.008	0.937	1.0
Ca gun	Ca extra	0.017*	0.052*	0.151	0.093	0.556
Ca gun	Zn	0.080*	0.711*	0.008	0.093	0.421
Ca gun	Ca gun+Zn	0.423	0.181*	0.421	0.240	0.095
Ca gun	Ca extra+Zn	0.007*	0.040*	0.151	0.818	0.222
Ca extra	Zn	0.015*	0.237*	0.008	1.0	0.556
Ca extra	Ca gun+Zn	0.229	0.470*	0.151	0.009	0.286
Ca extra	Ca extra+Zn	0.065*	0.821*	1.0	0.093	0.413
Zn	Ca gun+Zn	0.025	0.455*	0.008	0.009	0.421
Zn	Ca extra+Zn	0.011*	0.205*	0.008	0.093	0.421
Ca gun+Zn	Ca extra+Zn	0.010	0.373*	0.151	0.132	0.310

\*NCTC ve ATCC suşlarında Mann Whitney U yerine T test uygulandığını göstermektedir.

#### 4.1. Sonuçların Grafik Üzerinde Gösterimi

Ortalama değerleri ve istatistiksel analizi anlamlı bulunan *bft2* geni içeren NCTC ve A18 kökenleriyle, standart köken olan ATCC'yi grafik üzerinde karşılaştıracak olursak NCTC ve A18'in kalsiyum ilaveli besiyerindeki üremelerinin ATCC'ye göre belirgin şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir.

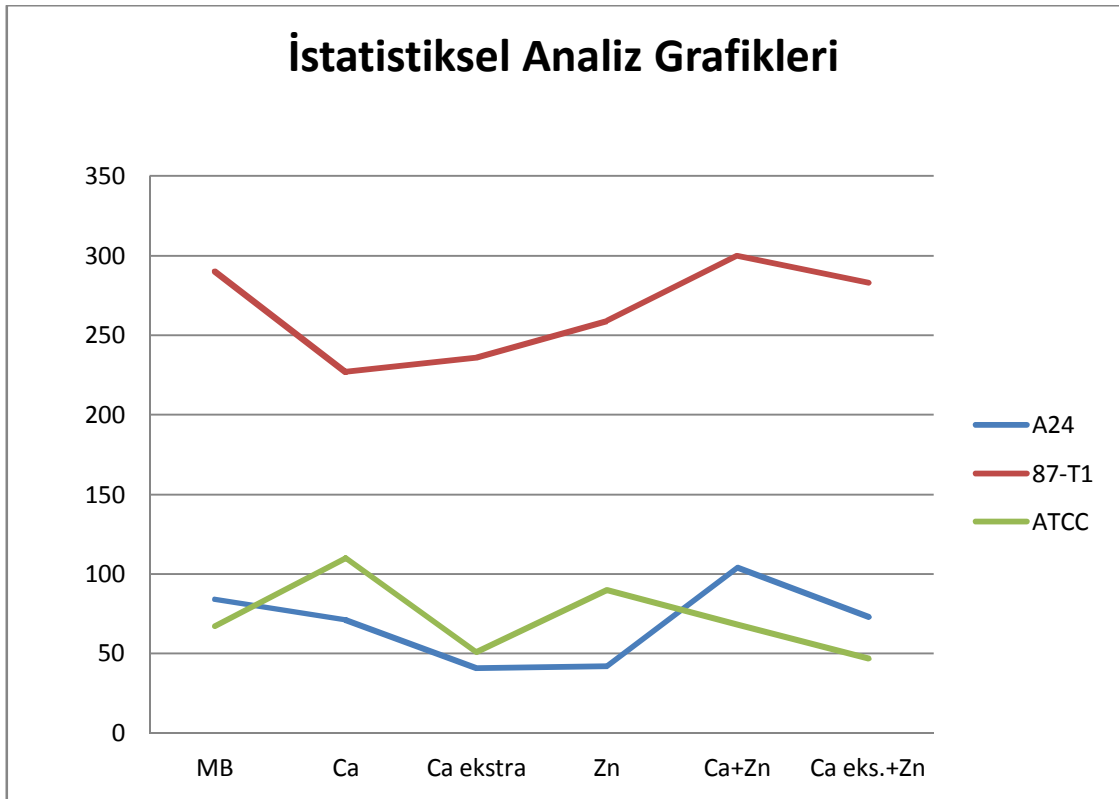
Grafik 1: *bft2* geni pozitif kökenlerin negatif kontrol ATCC kökeni ile karşılaştırıldığı veriler



Grafikte; Kalsiyum miktarı fazla olan besiyerlerindeki üremenin standart kalsiyum içeren besiyerine göre daha az olduğu, bunun yanında sadece çinko bulunan besiyerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada üremede artış olduğu ve kalsiyum ile çinkonun birlikte bulunduğu ortamdaki besiyerlerinde kalsiyumun üremeyi düşürmeye, çinkonun ise üremede bir artış sağlamaya çalıştığı görülmektedir.

Koloni sayılarının ortalama değerleri ve istatistiksel analiz sonuçları hesaplanan, *bft1* genine sahip A24 ve 87-T1 kökenlerinin remelerinin kalsiyum varlığından etkilenmediği grafik üzerinde de negatif kontrol ATCC *B. fragilis* kökeni ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. (Grafik 2)

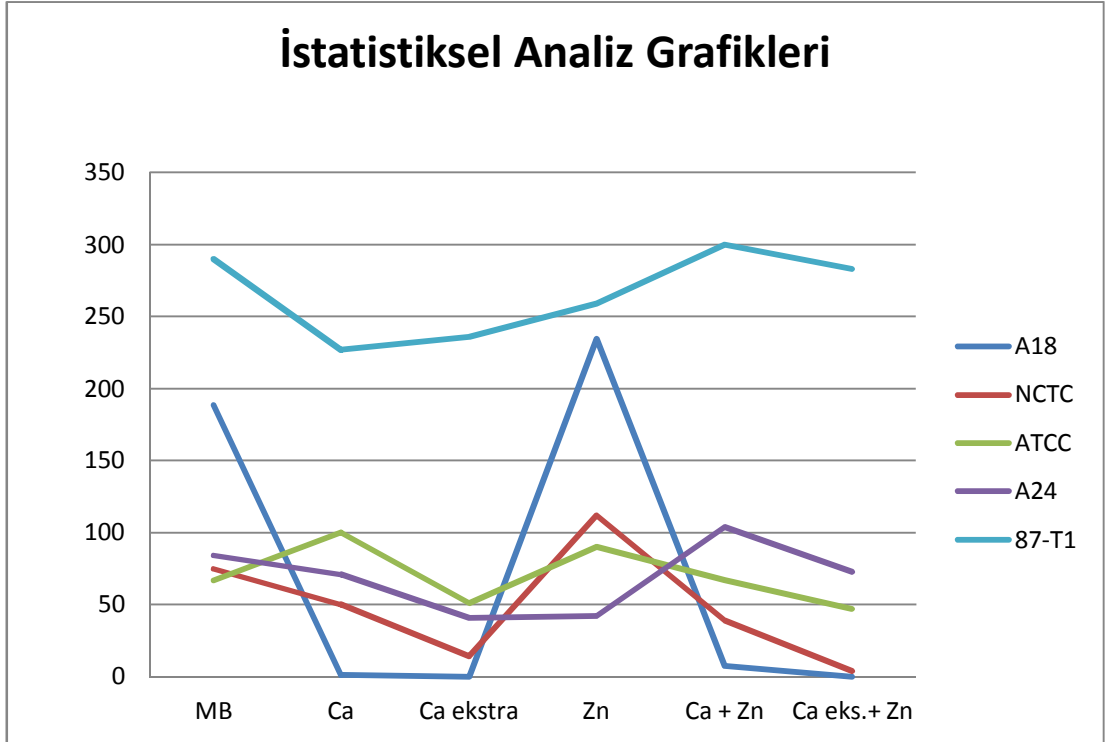
Grafik 2: *bft1* pozitif kökenlerin negatif kontrol kökenle karşılaştırıldığı veriler



Böylece *bft2* geni taşıyan kökenlerden farklı olarak *bft1* geni taşıyan kökenlerin kalsiyum varlığından etkilenmedikleri söylenebilir

Grafik 3'te bütün kökenler bir arada gösterilmektedir. Buna göre çalıştığımız *bfi2* ve *bfi1* geni taşıyan kökenlerimizin tamamını grafik üzerinde incelediğimizde yapılan analizlerin sonuçları net olarak görülmektedir. Özellikle Ca varlığından etkilenen ve *bfi2* geni taşıyan NCTC ve A18 kökenlerinin piklerindeki düşüş çinko varlığındaki artış göze çarpmaktadır. Diğer iki kökende bu gözlenmemektedir.

Grafik 3: Kökenlerin hepsinin verileri



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan kolon kanseri, günümüzde gastrointestinal sistem kanserleri içinde görülme sıklığı açısından birinci sırada yer almaktadır. Kolon kanserinin görülme sıklığı ülkelere, aynı ülkede yörelere ve topluluklara göre farklılık göstermektedir. Bu farklılığı belirleyen etkenlerin, çevresel faktörler, diyet, aile öyküsü ve genetik özellikler olduğu ileri sürülmektedir. Diğer kuvvetli predispozan faktörler arasında, kişide adenom öyküsünün ve özellikle inflamatuvar barsak hastalığının bulunması gösterilmiştir (49).

Buna karşın kolon kanseri gelişmesinde, diyetle yağ oranının düşük olması, sebze ve meyve gibi lifli yiyeceklerin tüketilmesi, A, C ve D vitaminlerinin alınması, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların kullanılması riski azaltmaktadır. Kalsiyumun, kolonda adenom rekürrens riskini azalttığı çalışmalarla gösterilmiştir (49). Bu sebeple koruyucu etki elde etmek için kişinin, günlük 1 ile 1,5 gram ek kalsiyum preparatı alması önerilmektedir (55). Kalsiyumun koruyucu etkisini, sekonder safra asitlerini ve iyonize yağ asitlerini bağlayarak gösterdiği düşünülmektedir. Diğer yandan, ek kalsiyum verilen adenomatöz polipi olan yaşlı hastalarda, barsak mukozasında ornitin dekarboksilaz düzeyinde yükselme olmadığı görülmüştür. Poliamin biyosentezinde yer alan ornitin dekarboksilaz enzimi, kanser gelişim sürecinde artış göstermektedir (56).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar da kalsiyumun kolon kanserini önleyebileceği varsayımını güçlendirmektedir (5). Chakrabarty ve ark. (7) ekstraselüler kalsiyumun ve Human parathyroid calcium sensing receptor (CaSR)'in E-kaderin ekspresyonunu arttırdığını saptanmışlardır. Bu çalışmalarda hücrede E-kaderin ekspresyonundaki artışın yanı sıra,  $\beta$ -katenin/TCF aktivasyonunda baskılanma, dolayısı ile malign davranışın önlendiği görülmüştür.

Bu bilgilerden yola çıkarak kalsiyumun, ETBF'nin hücre üzerindeki yıkıcı etkisini onarabileceğini öne sürebiliriz. Kolon mukoza hücrelerinde kolonize olan

ETBF'in salgıladığı frajilizin, hücreleri arasındaki sıkı bağlantının E-kaderin proteinini koparabilmektedir. E-kaderin'in yıkılmasıyla, hücrenin bariyer geçirgenliğinde bozulma olmakta, beraberinde kolorektal kanser oluşumunu aktive eden  $\beta$ -catenin/Wnt sinyal yolağı devreye girmektedir.  $\beta$ -catenin/Wnt sinyal yolağının tetiklenmesiyle hücre çekirdeği uyarılmakta, c-Myc gibi birtakım onkojen proteinlerin ekspresyonu sağlanmaktadır. Diğer yandan ETBF yanıt olarak, kolon mukoza hücrelerinde proinflamatuvar sitokin ve IL-8 salgılanmaktadır. Gerek E-kaderin'de yıkım yapması, gerekse salgıladığı sitokinler ile kuvvetli bir kanser predispozan faktörü olan inflamatuvar barsak hastalığına neden olması, ETBF nin bir onkojen bakteri olabileceğini göstermektedir. Bu düşüncüyü doğrulayacak bir takım çalışmalar bildirilmiştir (48). Kalsiyumun E-kaderin ekspresyonunu arttırdığı bilgisinden yola çıkarak, ETBF'nin E-kaderin üzerinde yaptığı yıkımı, kalsiyumun onarıcı etkisiyle giderilebileceği, dolayısıyla uzun vadede kanser oluşumunu önlenebileceği düşünülebilir.

Mukoza hücresi üzerinde ETBF'nin toksik etkisini, kalsiyumun onaracağı fikri mantığa uygun gelmekle birlikte, kalsiyumun ETBF'ye bağlı gelişebilecek kanseri önler denebilmesi için, kalsiyumun bakteri üzerindeki etkisinin de bilinmesi gerekir. Literatürde, bir takım mikroorganizmalarla yapılmış çalışmalarda, kalsiyumun bazı bakteriler üzerine antimikrobik etkide bulunduğu, bazı bakterin ise üremesini veya virülansını arttırdığı saptanmıştır. Üremeyi arttırıcı etkinin hücre duvar yapısında oluşturduğu stabilizasyona bağlanmaktadır. Antibiyotik etki ise daha çok besinlerin saklanması yüksek dozda kalsiyum kullanılması ile gerçekleşmiştir (50-52). Ancak, kalsiyumun ETBF üremesine etkisini araştıran herhangi çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, ikisi *bft2* (NCTC 11295, A18), ikisi *bft1* geni taşıyan (A-24, 87-T1) toplam 4 ETBF kökeni ve negatif kontrol amacıyla toksin üretmeyen bir *B. fragilis* (ATCC 25285) kökeni yer almıştır. Kökenler, normal beslenme durumunda veya ek kalsiyum alındığında barsakta bulunabilecek ortalama kalsiyum miktarı ve günlük çinko miktarı göz önüne alınarak hazırlanan besiyerlerine ekilmiş ve elde edilen kültürler değerlendirilmiştir. Ek kalsiyum bulunan besiyerlerinde *bft2* geni

taşıyan iki kökenin koloni sayısı, kalsiyum bulunmayan bazal besiyerine göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (NCTC, p:0.004, A18; p:0.008). Diğer bakterilerin koloni sayısı da düşük olmakla beraber, istatistiksel bir anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yine bu iki *bft2* genine sahip köken, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte çinko bulunduran ortamda daha fazla koloni oluşturmuştur. Ancak ek kalsiyum ve çinko bulunan besiyerinde koloni sayısında yine anlamlı düşüşler olmuştur. Bu durumda ek kalsiyumun, çinkonun üremeyi arttırıcı etkisini de baskıladığını söyleyebiliriz (Tablo3, 4).

Sonuçlarımıza göre ek kalsiyumun *bft2* bulunduran ETBF kökenleri üzerine antimikrobik etkide bulunduğu, ancak diğer bakterilerin üremesini etkilemediği görülmektedir. Bu sonuçlara benzer etkinin barsaktaki ETBF kökenleri üzerinde olduğunu varsayarsak, kalsiyumun gerek bozulmuş E-kaderin'i onararak, gerekse bakterinin çoğalmasını inhibe ederek ETBF'nin onkojenik etkisini azalttığı söyleyebiliriz.

ETBF'de toksin geninin üç varyantı tanımlanmış, eksprese olan toksinlerden BFT2'nin potansi daha yüksek bulunmuş, gerek hücre kültürü gerekse kolon mukozasına daha fazla toksik etki göstermiştir. BFT2 toksini salgılayan kökenlerin çocuklarda, erişkinlere göre nispeten daha fazla ishal oluşturduğu anlaşılmıştır. ETBF kökenlerinin çoğunlukla *bft1*'e sahip olduğu, toksik etkisinin *bft2* pozitif kökenlere göre az ancak *bft3* geni taşıyanlara göre ise daha fazla bulunmuştur. Kolon kanserinin genellikle bir ileri yaş hastalığı olduğu ve bu yaş grubunda genellikle *bft1* geni taşıyan kökenlerin bulunduğu göz önüne alınırsa, literatür bilgileri ve sonuçlarımıza göre, ek alınacak kalsiyumun barsakta bulunan ETBF kökenlerinin üremesine etki yapmayacağı, ancak toksininin E-kaderin üzerindeki harabiyetini onarabileceği söylenebilir.

Daha bütüncül değerlendirebilmek için kalsiyumun, bakterinin virülans özelliğinde bir değişiklik yapıp yapmadığının bilinmesi gerekir. ETBF'lerle yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamakla beraber, kalsiyumun bakteri virülansını arttırıcı etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar bildirilmiştir (50-52). Örneğin,

kalsiyumun mukoid *P.aeruginosa* kökenlerinin ekstraselüler yapılarını dolayısı ile biyofilm tabakasının kalınlığını arttırdığı gösterilmiştir (51). Başka bir çalışmada, kalsiyum iyonuna bağımlılık olarak tanımlanan olayda, *Y.pestis*'in virülans faktörlerinin sentezi için 2,5 mM kalsiyum iyonuna bulunması gerektiği anlaşılmıştır. Kalsiyum miktarına ve ısıya bağlı olarak sentez edilen bu virülans faktörlerinin, konakta hücre içi uyumun sağlanmasında önemli olduğu ileri sürülmüştür (52).

Elde ettiğimiz sonuçlar, günlük tüketilen ek kalsiyum miktarının in vitro koşullarda bazı ETBF kökenlerinin üremesini baskıladığını göstermiştir. Bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuçlarımız, yeni çalışmalara ışık tutacak yararlı veriler sunmaktadır, ancak daha fazla köken ile yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Burada özellikle kolon kanseri hastalarının dışkısından izole edilmiş (A18:*bft2+* ve A24:*bft1+*) ve farklı gen profiline sahip kökenler seçilmiştir. Benzer çalışmanın diğer kaynaklardan izole edilmiş kökenlerle de yapılmasında yarar vardır. Kalsiyumun, bakterinin toksik özelliklerinde ya da salgılanmış toksinin fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik yapıp yapmadığı da araştırılması gereken konular içinde yer almaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- 1) Nguyen TV, Van PL, Huy CL, Weintraub A. (2005). Diarrhea caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children less than 5 years of age in Hanoi, Vietnam. *Anaerobe*, 11: 109–14.
- 2) Oldfield EC 3rd. (2009). Diarrhea. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: newly recognized cause of inflammatory diarrhea. *Rev Gastroenterol Disord*, 9(2):E65-6.
- 3) Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL. (2007). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm Bowel Dis*; 13(12):1475-83.
- 4) Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. (2004). Are Helicobacter species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? *Dig Dis Sci*; 49(9):1425-32.
- 5) Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect*, 12(8):782-6.
- 6) Milner JA, McDonald SS, Anderson DE, Greenwald P. (2001). Molecular targets for nutrients involved with cancer prevention. *Nutrition and Cancer*; 41(1–2):1–16.
- 7) Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. (2003). Extracellular Calcium and Calcium Sensing Receptor Function in Human Colon Carcinomas: Promotion of E-Cadherin Expression and Suppression of  $\beta$ -Catenin/TCF Activation. *Cancer Research* 63: 67–71.

- 8) Finegold SM. (2005). Anaerobic bacteria: general concepts. Ed: Mandell LG, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practise of Infectious Diseases. 5th Edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, p: 2519–2575.
- 9) Tunçkanat F. (2002). Anaerop Bakteriler Genel Özellikler. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1:1705-1748
- 10) Citron DM , Poxton IR, Baron EJ, (2007). *Bacteroides*, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and Other Anaerobic Gram Negative Rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9<sup>th</sup> ed, Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Washington, ASM, p.911-932.
- 11) Shah HN, Gharbia SE, Duerden BI, (2005). *Bacteroides*, Prevotella and Porphyromonas. In: Topley's and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. 10<sup>th</sup>ed, Eds: Borriello SP, Murray PR, Funke G, Arnold, London: 1913–1944.
- 12) Richard Joseph Obiso, (1997). Characterization and Molecular analysis of fragilis: The *Bacteroides fragilis* toxin. Blacksburg, Virginia.
- 13) Babb, J.L. and J.L. Jahnsen. (1981). Relationships between serological groups and deoxyribonucleic acid homology groups in *Bacteroides fragilis* and related species. J.Clin.Microbiol. 13: 369-379.
- 14) Wexler HM, (2007). *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clinical Microbiology Reviews; 593–621
- 15) Duerden BI, (1994). Virulence factors in anaerobes. Clin. Infect Dis: 18 (4): s.253-9.

- 16) Tzianabos AO, Kasper DL, Onderdonk AB. (1995). Structure and function of *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharides: Relationship to induction and prevention of abscesses. *Clin Infect Dis*: 20(2): s.132-40.
- 17) Tzianabos AO, Pantosti A, Baumann H, Brisson JR, Jennings HJ, Kasper DL. (1992). The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* comprises two ionically linked polysaccharides. *J. Biol. Chem*: 267: s.18230–18235.
- 18) Coyne MJ, Tzianabos AO, Mallory BC, Carey VJ, Kasper DL, Comstock LE. (2001). Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 69(7): s.4342-50.
- 19) Coyne MJ, Kalka-Moll W, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. (2000). *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. *Infect. Immun*: 68: s.6176–6181.
- 20) Kasper DL. (1976). Chemical and biological characterization of the lipopolysaccharide of *Bacteroides fragilis* subspecies fragilis. *J. Infect. Dis*: 134: s.59-66.
- 21) Pumbwe L, Skilbeck CA, Wexler HM. (2006). The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach-or all three? *Anaerobe*. 12: 211-220.
- 22) Otto BR, Sparrius M, Maclaren DM. (1990). Iron-Regulated Outer Membrane Protein of *Bacteroides fragilis* Involved in Heme Uptake. *Infection and Immunity*: 8: s.3954-3958

- 23) Kanazawa K, Y. Kobayashi, H. Nakano, M. Sakurai, N. Gotoh, and T. Nishino. (1995). Identification of three porins in the outer membrane of *Bacteroides fragilis*. FEMS Microbiol. Lett. 127:181–186.
- 24) Rotstein OD. (1992). Role of fibrin deposition in the pathogenesis of intraabdominal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis: 11: s.1064–1068.
- 25) Finlay-Jones JJ, Kenny PA, Nulsen MF, Spencer LK, Hill NL, McDonald PJ. (1991). Pathogenesis of intraabdominal abscess formation: abscess-potentiating agents and inhibition of complement-dependent opsonization of abscess-inducing bacteria. J Infect Dis: 164: s.1173–179.
- 26) Rotstein OD: (1993). Interaction between leukocytes and anaerobic bacteria in polymicrobial surgical infections. Clin Infect Dis: 16(4) s.190-4
- 27) Rotstein OD, Nashmithe PE, Grinstein S. (1987). The *Bacteroides* by-product succinic acid inhibits neutrophil respiratory burst by reducing intracellular pH. Infect Immun: s.364-70
- 28) McGregor JM, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK. (1991). Phospholipase C activity in microorganisms associated with reproductive tract infection. Am J Obstet Gynecol: s.682-6
- 29) Robertson KP, Smith CJ, Gough AM, Rocha ER. (2006). Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. Infect. Immun: 74: s.2304–2316.
- 30) Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS, Border MM. (1984). *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. Infect Immun, 44: 241–4.

- 31) Sears CI, Myers LL, Lazenby A, Van tassel RL. (1995). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. Clin Infect Dis, 20 (2): 142-8
- 32) Durmaz B. (2002). İshal etkeni olarak Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*. Microbial Bült. 36: s.99-103
- 33) Sack RB, Albert MJ, Alam K, Neogi PK, Akbar MS. (1994). Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. J Clin Microbiol: 32(4): p.960-3
- 34) Claros ZC, Claros MC, Tang YJ, Cohen SH, Silva JR, Goldstein EJC, Rodloff AC. (2000). Occurrence of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene Carrying Strains in Germany and the United States. J Clin Microbiol: 38:(5) p. 1996–1997.
- 35) Saidin RF, Jaeger K, Montrose MH, Wu S, Sears CL. (1997). *Bacteroides fragilis* toxin rearranges the actin cytoskeleton of HT29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decrease in F-actin content. Cell Motil Cytoskeleton. 37(2): p.159-65
- 36) Kato N, Liu C, Kato H, Nakamura H, Iwai N, Ueno K. (1999). Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children with diarrhea in Japan. J Clin Microbiol: 37: p.801-3.
- 37) Pathela P, Hasan KZ, Roy E, Alam K, Huq F, Siddique AK, Sack RB. (2005). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-associated diarrhea in children 0-2 years of age in rural Bangladesh. J Infect Dis. 15;191(8):1245-52.
- 38) San Joaquin VH, Griffis JC, Lee C, Sears CL.(1995). Association of *Bacteroides fragilis* with childhood diarrhea. USA, Scand J Infect Dis; 27(3):211-5

- 39) Weikel CS, Grieco FD, Reuben J, Myers LL, Sack RB. (1992). Human colonic epithelial cells, HT29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology. *Infect Immun*: 60(2): p.321-7.
- 40) Sears CL. (2001). The toxins of *Bacteroides fragilis*. p.1737-46.
- 41) Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, Sears CL. (1999). Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*: 67(9):4945-9,
- 42) Saidi RF, Sears CL. (1996). *Bacteroides fragilis* toxin rapidly intoxicates human intestinal epithelial cells (HT29/C1) in vitro. *Infect Immun*; 64:5029–34.
- 43) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Smigal C, Thun MJ. (2007). Cancer statistic. *CA Cancer J Clin*: 57(1):43-66.
- 44) ÇEFLE K. (2009). Kanser genetiği. *Klinik Gelişim Dergisi*: 22(3).
- 45) Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. (2005). Oncogenic  $\beta$ -Catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle*; 4: p.1522-1539.
- 46) Wong NA, Pignatelli M. (2002). B-Catenin- A linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol*; 160: 389-399.
- 47) Akışık EZ. (2008). Kolorektal Kanserli Hastalarda  $\beta$ -Katenin Değişikliklerinin ve Gen Mutasyonlarının Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul (Danışman: Prof.Dr.Nejat DALAY)

- 48) Housseau F. and Sears CL. (2010). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (*Apc*<sup>+/-</sup>) mice: A human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell Cycle*. 9(1): 3–5.
- 49) Simon GL, Gorbach SL. (1994). Intestinal health and disease. *Gastroenterology* 86; p.174-193
- 50) Adachi T, Yamagata H, Tsukagoshi N, Udaka S. (1991). Repression of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47 by magnesium and calcium ions. *J Bacteriol*. 173(13):4243-5.
- 51) Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 187(13):4327-37.
- 52) Hall PJ, Yang GC, Little RV, Brubaker RR. (1974). Effect of Ca<sup>2+</sup> on morphology and division of *Yersinia pestis*. *Infect Immun*. 9(6):1105-13.
- 53) Der Meer R.V, Welberg JWM, Folkert Kuipers, Kleibeuker JH, Mulder N.H, Termont D. S. M. L, Vonk RJ, De Vries H.T. and De Vries E.G.E. (1990). Effects of Supplement Diatery Calcium on the Intestinal Association of Calcium, Phosphate, and Bile Acids. *American Gastroenterological Association*. 99: 1653-1659.
- 54) Ulger N, Rajendram D, Yagci A, Gharbia S, Shah HN, Gulluoglu BM, Akin LM, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. (2006). The distribution of the bft alleles among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from stool specimens and extraintestinal sites. *Anaerobe* 12: p.71–74.

- 55) Levin B, Raijman I. (1995). Malignant Tumors of the Colon and Rectum. In: Bockus Gastroenterology: Intestine. 5th ed, Eds: William S. Haubrich, Fenton Schaffner, Henry L. Bockus. p. 1744-68.
- 56) Goodwin AC, Destefano Shields CE, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL, Casero RA Jr. (2011). Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(37):15354-9.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

SAYI: B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/442  
İLGİ:

05.06.2009

Sayın : Doç.Dr. Nurver ÜLGER

MAR-YÇ-2009- 0217 protokol nolu " Enterotoksijenik Bacteroides fragilis kökenlerinde toksin geni ekspresyonuna kalsiyumun etkisinin araştırılması" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hacer DİRESKENELİ  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Araştırma Etik Kurul Başkanı

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı	Neşe	Soyadı	BALKAN
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	15.02.1984
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	15503401650
E-mail	<a href="mailto:nesebalkan@hotmail.com">nesebalkan@hotmail.com</a>	Tel	05362114970

## Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi	2007
Lise	Küçükçekmece Lisesi	2002

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Stajyer	Marmara Üniversitesi Hastahanesi	Ekim 2008 – Şubat 2009
2. Stajyer	Tübitak	Şubat 2008–Haziran 2008
3. Öğretmen	Zihni Küçük İ.Ö.O	Ekim 2007-Şubat 2008

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	İyi
Arnavutça	iyi	Çok iyi	İyi

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

# Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70.400	66.865	61.273
(Diğer) Puanı			

## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer