

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİPROLİFERATİF,
ANTİGENOTOKSİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Serap NİĞDELİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2013

ANKARA

Serap NİĞDELİOĞLU tarafından hazırlanan “LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİPROLİFERATİF, ANTİGENOTOKSİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim SULTAN

Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 17.07.2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Serap NİĞDELİOĞLU

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİPROLİFERATİF,
ANTİGENOTOKSİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Serap NİĞDELİOĞLU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2013**

ÖZET

Kanser günümüzün en sık karşılaşılan hastalıklarından birisi haline gelmiştir. Klinikte kanserin tedavisinin yanı sıra, önlenmesine yönelik alternatif yöntemlerin geliştirildiği çalışmalara ilgi artmıştır. Son yıllarda probiyotik kültürler antikanser çalışmalarında bir alternatif olarak gösterilmekle birlikte, antiproliferatif etkilerinin mekanizması şimdiye kadar net bir şekilde ortaya konulmamıştır. Çalışmada Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, insan (bebek gaitası) kaynaklı bakteri kültürlerinden, daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış 6 laktik asit bakterisi kullanılmıştır. Bakterilerin canlı hücre, metabolit ve ekzopolisakkaritlerinin (EPS), kolorektal adenokarsinoma hücreleri olan HT-29 ve Caco-2 kanser hattı üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Her iki hücre hattında canlı hücrelerin, metabolitler ve EPS'lerden daha etkin antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En iyi antiproliferatif etki HT-29 kolon kanser hücre hattında, *Lactobacillus brevis* LB63 suşunun canlı hücrelerinden (% 51 hücre ölümü) elde edilmiştir ($p<0,05$). Suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin tek hücre jel elektroforezi ile insan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkisi incelenmiş ve analizleri yapılmıştır. Suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin genotoksik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Tüm örnekler

antigenotoksik etki göstermekle birlikte, en iyi antigenotoksik etki LB63 suşunun canlı hücrelerinden (% 48 inhibisyon) elde edilmiştir ($p<0,05$). Antiproliferatif ve antigenotoksik etkileri ile öne çıkan suşların (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) HT-29 ve Caco-2 hücre hatları üzerinde antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Her iki hücre hattında IL-8 salınımı için tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ile inflamasyon ortamı yaratılarak canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin sitokin salınımına etkisi araştırılmıştır. Metabolitlerin ve EPS'lerin IL-8 salınımını baskılamakta canlı hücrelere göre daha az etkili olduğu ve etkinin HT-29 hücre hattında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. HT-29 hücre hattında IL-8 salınımının baskılanmasında en iyi etkiyi LB63 suşunun canlı hücreleri (557 pg/mL'den 302 pg/mL'ye) göstermiştir. TNF- α ile inflamasyon ortamı oluşturulmayan hücrelerde, IL-10 salınımının uyarılmasında yine en iyi sonuç HT-29 hücre hattında ve LB63 suşunun canlı hücrelerinden (49 pg/mL'den 85 pg/mL'ye) elde edilmiştir ($p<0,05$). Elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizlerde suşların (canlı hücre, metabolit ve EPS) antiproliferatif-antigenotoksite, antiproliferatif-antiinflamatuvar aktiviteleri arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$). Bu çalışmada, LB63 suşunun hem antiproliferatif hem de antiinflamatuvar etkili ajan olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca probiyotik kültürlerin EPS'lerinden de, antiproliferatif ve antiinflamatuvar yeteneklerinden dolayı kanserin önlenmesinde probiyotik kültürlere alternatif olarak yararlanılabileceği ortaya konulmuştur. *İn vitro* çalışmaların sonuçlarına göre, kansere yönelik koruyucu veya tedavi edici alternatif probiyotik ajanların ilaç sanayisi alanına kazandırılması mümkün olabilecektir.

Bilim Kodu : 203.1.023
Anahtar Kelimeler : Laktik asit bakterisi, antiproliferatif, antigenotoksisite, antiinflamatuvar
Sayfa Adedi : 124
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLIM

**DETERMINATION OF LACTIC ACID BACTERIA ANTIPROLIFERATIVE,
ANTIGENOTOXIC AND ANTIINFLAMMATORY EFFECTS**

(M. Sc. Thesis)

Serap NİĞDELİOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE

July 2013

ABSTRACT

Cancer became one of the most commonly encountered diseases of our days. In the clinical practice, there is increased interest into the studies that develop alternative methods for the prevention as well as the treatment of the cancer. Although probiotic cultures were demonstrated to be an alternative in the anticancer studies in the last years, mechanism of antiproliferative effects has not been clearly revealed yet. In the study, we used 6 lactic acid bacteria that were obtained from human (baby feces) bacterial cultures in the Gazi University, Faculty of Science, Department of Biology, Biotechnology Laboratory Culture Collection and that became prominent with their probiotic features in the previous studies. Antiproliferative effects of live cell, metabolite and exopolysaccharides (EPS) of the bacteria on HT-29 and Caco-2 cancer cell line consisted of colorectal adenocarcinoma cells were examined. In both cell lines, live cells were found to have a more efficient antiproliferative effect compared to metabolites and EPSs. Best antiproliferative effect was obtained from live cells of the *Lactobacillus brevis* LB63 strain (51% cell death) in HT-29 colon cancer cell line ($p<0.05$). Genotoxic and antigenotoxic effects of live cells, metabolites and EPSs of the strains on human lymphocytes were investigated using single-cell electrophoresis and the analyses were performed. Live cells, metabolites and EPSs of the strains were found not to show genotoxic effects. Although all samples showed antigenotoxic effects, best antigenotoxic effect was

obtained from live cells of the LB63 strain (48% inhibition) ($p<0.05$). Anti-inflammatory effects of the strains that became prominent with their anti-proliferative and antigenotoxic effects (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) on HT-29 and Caco-2 cell lines were investigated. The effect of live cell, metabolite and EPSs on cytokine release was investigated by creating an inflammation environment with tumor necrosis factor- α (TNF- α) for IL-8 release in both cell lines. It was found that metabolites and EPSs were less efficient in the suppression of IL-8 release compared to live cells and that the effect was greater in HT-29 cell line. In the suppression of IL-8 in HT-29 cell line, best effect was shown by live cells of LB63 strain (from 557 pg/mL to 302 pg/mL). In the cells in which inflammatory environment was not created using TNF- α , best results of the stimulation of IL-10 release was again obtained from HT-29 cell line and live cells of LB63 strain (from 49 pg/mL to 85 pg/mL) ($p<0.05$). In the statistical analysis performed using the data available, a substantial correlation was found between antiproliferative-antigenotoxicity and antiproliferative-antiinflammatory activities of the strains (live cell, metabolite and EPS) ($p<0.05$). In this study, it was found that LB63 strain could be used as both antiproliferative and antiinflammatory agent. Furthermore, it was revealed that EPSs of the probiotic cultures could be a useful alternative of the probiotic cultures for the prevention of cancer due to their antiproliferative and antiinflammatory effects. Based on the results of in vitro studies, it will be possible to bring alternative probiotic agents that are protective or therapeutic against the cancer in the medication industry area.

Science code : 203.1.023

Key words : Lactic acid bacteria, antiproliferative, antigenotoxicity, antiinflammatory

Page number : 124

Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, bana gösterdiği sabır ve anlayışla güzel bir çalışma ortamı sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a, tezimin düzeltmesinde bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Prof. Dr. Mahmut Nedim SULTAN ve Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e, laboratuvar çalışmalarımı yaptığım Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Biyoteknoloji Laboratuvarı ve çalışanlarına, her zaman yardım ve desteğini gördüğüm Seda ŞİRİN'e, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim başta babam Zeki NİĞDELİOĞLU olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 46/2012-03 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	5
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolitleri	6
2.2.1. Ekzopolisakkaritler (EPS)	7
2.3. Probiyotik Bakteriler.....	8
2.3.1. Probiyotik bakteriler ve kanser	10
2.4. Kanser.....	10
2.4.1. Kanser biyolojisi.....	10
2.4.2. Kanser genetik yapısı.....	11
2.4.3. Kolon kanseri.....	15
2.4.4. Kanser tedavisinde kullanılan uygulamalar.....	18
2.4.5. Laktik asit bakterilerinin antiproliferatif etkisi.....	21
2.5. İmmünoloji	25

Sayfa

2.5.1. Sitokinler	25
2.5.2. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α).....	26
2.5.3. Kemokinler ve interlökin-8	27
2.5.4. İnterlökin-10.....	28
2.5.5. Bazı hastalıklar ile immün sistem arasındaki ilişki.....	29
2.5.6. Laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar etkisi	32
2.6. Genotoksisite-Antigenotoksisite İle Bazı Hastalıklar Arasındaki İlişki	38
2.6.1. Laktik asit bakterilerinin antigenotoksik etkisi	41
2.7. Klinik Uygulamalarda Probiyotiklerin Destek Materyali Olarak Kullanım Alanları	43
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler	45
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve tamponlar.....	46
3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları	47
3.2. Metot.....	47
3.2.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin hazırlanması.....	47
3.2.2. Bakterilerin muhafazası	48
3.2.3. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması.....	48
3.2.4. Laktik asit bakterilerinin antiproliferatif etkisinin belirlenmesi.....	48
3.2.5. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu.....	50
3.2.6. Laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerinin belirlenmesi	52
3.2.7. EPS'lerin antiproliferatif etkisinin belirlenmesi.....	54

Sayfa

3.2.8. Bakteri kültürleri ile EPS'lerin genotoksik ve antigenotoksik etkisinin belirlenmesi.....	54
3.2.9. Laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar etkisinin belirlenmesi.....	58
3.2.10. EPS'lerin antiinflamatuvar etkisinin belirlenmesi.....	58
3.2.11. İstatiksel analizler	58
4. DENEYSEL BULGULAR	60
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	60
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antiproliferatif Etkisi	61
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin EPS Üretme Kapasiteleri.....	63
4.4. EPS'lerin Antiproliferatif Etkisi.....	64
4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Genotoksik Ve Antigenotoksik Etkisi.....	67
4.6. EPS'lerin Genotoksik Ve Antigenotoksik Etkisi	71
4.7. Laktik Asit Bakterilerinin Antiinflamatuvar Etkisi.....	75
4.8. EPS'lerin Antiinflamatuvar Etkisi.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	99
EKLER	121
EK-1 Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu	122
ÖZGEÇMİŞ	124

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	9
Çizelge 2.2. HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarının karşılaştırılması	17
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyon kaynağı ve tür adları	45
Çizelge 3.2. MRS sıvı besiyeri	46
Çizelge 3.3. PBS tamponu içeriği	47
Çizelge 4.1. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS miktarları	64
Çizelge 4.2. Laktik asit bakterilerinin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisi	67
Çizelge 4.3. Laktik asit bakterilerinin H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş insan lenfositleri üzerindeki antigenotoksik etkisi	68
Çizelge 4.4. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkisi	72

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Lactobacillus</i> sp. bakterisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	6
Şekil 2.2. Kolonda tümör dokusu.....	11
Şekil 2.3. Genetik değişikliklerin birikmesi sonucu kanser oluşumu	12
Şekil 2.4. Kanser genetik oluşumu.....	13
Şekil 2.5. Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü	14
Şekil 2.6. Kolonun bölümleri	16
Şekil 2.7. Enterosit farklılaşmasının temel karakterini gösteren HT-29 ve Caco-2 hücreleri.....	17
Şekil 2.8. Laktik asit bakterilerinin immün sistem hücreleri ile etkileşimi	35
Şekil 2.9. Bağırsak ilişkili immün sistemin laktik asit bakterileri tarafından düzenlenmesi.....	36
Şekil 2.10. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar sonucu meydana gelen hastalıklar.....	39
Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi	53
Şekil 4.1. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin HT-29 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi.....	63
Şekil 4.2. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi.....	63
Şekil 4.3. Dört farklı suşun EPS'lerinin Caco-2 ve HT-29 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi.....	66
Şekil 4.4. H ₂ O ₂ 'in indüklediği DNA hasarına bağlı oluşan genotoksisitenin canlı hücre ve metabolitler tarafından inhibisyonu.....	71
Şekil 4.5. H ₂ O ₂ 'in indüklediği DNA hasarına bağlı oluşan genotoksisitenin EPS'ler tarafından inhibisyonu	74
Şekil 4.6. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin TNF- α ile uyarılmış HT-29 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi	77
Şekil 4.8. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin HT-29 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi	78
Şekil 4.9. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin Caco-2 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi	79
Şekil 4.10. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin TNF- α ile uyarılmış HT-29 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi	80
Şekil 4.11. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi	81
Şekil 4.12. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin HT-29 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi	82
Şekil 4.13. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin Caco-2 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi	83

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmada kullanılan mikropalak okuyucu	50
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan evaporatör	51
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı	52
Resim 3.4. Liyofilizasyon sonrası toz haline getirilen vial içindeki EPS'ler.....	52
Resim 3.5. Santrifüj sonrası eritrositlerin üzerinde oluşan beyaz lenfosit halkası.....	55
Resim 4.1. <i>Lactobacillus brevis</i> LB63 bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü	60
Resim 4.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GD11 bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü.....	61
Resim 4.3. WST-1 kiti ile mikroplaklarda bulunan kanser hücrelerinde canlılığın tespiti	62
Resim 4.4. WST-1 kiti ile mikroplaklarda bulunan kanser hücrelerinde canlılığın tespiti	66
Resim 4.5. Laktik asit bakterilerinin H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genetik hasarı önleyici etkisinin kuyruk yoğunluğuna göre belirlenmesi	69
Resim 4.6. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genetik hasarı önleyici etkisinin kuyruk yoğunluğuna göre belirlenmesi.....	73
Resim 4.7. HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarında IL-8 veya IL-10 antijeni ile antikorunun etkileşimi sonucu meydana gelen renk değişimi	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
bakteri/mL	Bakteri/mililitre
cfu/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
g	Gram
g/L	Gram/litre
g/mL	Gram/mililitre
Gr (+)	Gram pozitif
hücre/kg	Hücre/kilogram
hücre/L	Hücre/litre
M	Molar
mA	Miliamper
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogram/mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
pg/mL	Pikogram/mililitre
pH	Asitlik bazlık birimi
V	Volt
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre

Simgeler **μm** **μM** **Açıklama**

Mikrometre

Mikromolar

Kısaltmalar**4-NQO****ANOVA****APC****API****BL****CO₂****CPS****CRP****DC****dk****DMEM****D-PBS****EC****EDTA****EPS****FAO/WHO****G-CSF****GİS****G-MCSF****H₂O₂****IFN- γ** **Ig****Açıklama**

4-nitroquinolin N-oksit

Tek yönlü varyans analizi

Antijen sunan hücreler

Analitik profil indeks

B-lenfosit

Karbondioksit

Kapsüler polisakkaritler

C-reaktif protein

Dendritik hücreler

Dakika

Dulbecco's modified eagle medium

Dulbecco's phosphate buffered saline

Epitel hücreleri

Etilendiamintetraasetik asit

Ekzopolisakkarit

Birleşmiş milletler-Dünya sağlık

örgütü gıda ve tarım organizasyonu

Granülosit koloni stimülatör faktör

Gastrointestinal sistem

Granülosit-makrofaj koloni simülatör faktör

Hidrojen peroksit

İnterferon-gama

İmmünglobulin

Kısaltmalar**Açıklama**

IL	İnterlökin
K₂HPO₄	Di potasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
KZYA	Kısa zincirli yağ asitleri
LGG	<i>L. rhamnosus</i> GG
LH	Langerhans hücreleri
LMA	Düşük erime ısılı agar
LPS	Lipopolisakkarit
LT	Lenfotoksin
MC	M hücreleri
M-CSF	Monosit-makrofaj koloni uyaran faktör
MgSO₄.7H₂O	Magnezyum sülfat
Mn²⁺	+2 değerlikli mangan
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin
MnSO₄.4H₂O	Manganez sülfat
MOBAM	Moleküler biyoloji araştırma ve uygulama merkezi
MQ	Makrofaj
MRS	De man rogosa and sharp broth
MS	Mast hücreleri
MUC	Müsin
Na₂HPO₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
NK	Doğal öldürücü
NMA	Normal erime ısılı agar
NO	Nitrik oksit
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate buffered saline

Kısaltmalar**PC****PMNL****ROT****rpm****sp****spp****subsp****TCA****TGF- β** **Th1****Th2****TL****TLR****TNF- α** **Tsg****UV****WST-1** **α** **β** **Açıklama**

Plazma N hücreleri

Polimorfonükleer lökosit

Reaktif oksijen türleri

Devir sayısı

Tür

Türler

Alttür

Trikloroasetikasit

Dönüştürücü büyüme faktörü-beta

T yardımcı-1

T yardımcı-2

T-lenfosit

Toll-like reseptör

Tümör nekroz faktör- α

Tümör supresör gen

Ultraviyole

Tetrazolium tuzu

Alfa

Beta

1. GİRİŞ

Kanser günümüzün en sık karşılaşılan hastalıklarından birisi haline gelmiştir. Organların işlevlerini bozarak yaşamı tehlikeye atan kanser, tüm dünyada en çok ölüme neden olan iki hastalıktan biridir (diğeri koroner kalp hastalığıdır) [Aydın, 2008]. Kanser tedavisinin yanı sıra önlenmesine yönelik deneysel çalışmalarda, alternatif yöntemlerin ortaya konulmasının önemi vurgulanmaktadır. Antikanser çalışmalarında alternatif olarak kullanılan, insanlarla karşılıklı yarar sağlama çerçevesinde canlılıklarını devam ettiren çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır [Rolfe, 2000]. Probiyotik olarak adlandırılan bu mikroorganizmalar, “yeterli miktarda verildiğinde konak üzerinde olumlu etki bırakan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır [FAO/WHO, 2001]. Probiyotik olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* cinsine ait türler) ile *Propionibacterium* cinsine ait türler ve *Saccharomyces boulardii*'dir [Ljungh ve Wadström, 2006].

Probiyotik mikroorganizmaların etkinliğini gösterebilmesi için gastrointestinal sistem (GİS) mikroflorası ile temas halinde ve belirli bir kütlede olması gerekmektedir. GİS gıdaların sindirilerek, bileşenlerin absorbe edildiği, posa kısımlarının dışkı olarak atıldığı bir organ sistemi olmasının yanı sıra, baştan sona diffüz bir lenfoid doku özelliğinde olan mukozası ile mükemmel bir bağışık sistem organıdır [Rahman ve ark., 2007]. Doğal flora elemanı olan laktik asit bakterileri, kanserli hücreler üzerine gösterdikleri antiproliferatif, apoptozis ve farklılaşmayı indükleyici, anjiyogenezi baskılayıcı ve ilaç direncini azaltıcı etkilerinden dolayı kanser araştırmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [Tuo ve ark., 2010].

Gerek bakteri hücrelerinin gerekse metabolitlerinin ve EPS'lerinin moleküler düzeydeki antiproliferatif etkisi ile kanser araştırmalarında kullanılabilme olanaklarının araştırılması üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görölmektedir. Bu bağlamda çalışmada öncelikle kolorektal adenokarsinoma hücreleri olan HT-29

ve Caco-2 kanser hattında *Lactobacillus* cinsine ait suşların (canlı hücre, metabolit ve EPS), antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrolsüz hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir [Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010]. Herhangi bir kimyasal mutajenin neden olduğu genotoksik etkinin doğal bir kaynak kullanılarak giderilmesi kanserin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda suşların, hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı antigenotoksik etkisinin (antiproliferatif etkinin altındaki mekanizmalardan biri) comet yöntemiyle (tek hücre jel elektroforezi) belirlenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte, antigenotoksik aktiviteye sahip bu suşların gıda endüstrisi ve tıp alanında kullanılmadan önce güvenilirliklerinin test edilmesi gerekir. Bu nedenle çalışmamızda, suşların insan lenfositlerinde herhangi bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Epidemiyolojik ya da deneysel çalışmalardan alınan verilerde probiyotik türlerinin gıda olarak kullanılması ile başta kolon olmak üzere çeşitli kanser türlerinin hafiflediği ve tümör gelişiminin inhibe edildiği gösterilmiştir [Pisani ve ark., 1993]. Tümör mikroçevresi, çeşitli sinyal molekülleri ile tümör ilerlemesine aracılık eden farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Mikroçevrede tümörün ilerlemesinde önemli rol oynayan moleküller sitokinlerdir. Sitokinler kompleks ve birbirini ile ilişkili çalışan sinyal yolağı içinde yer almakta, diğer sitokinlerin ve onların reseptörlerinin sentezlenmesinde rol oynamaktadırlar [Dranoff, 2004]. Bunların içerisinde interlökin (IL)-8 gastrointestinal epitel hücreler ve tümör hücreleri tarafından salgılanmakta ve akut inflamatuvar reaksiyonların başlaması ve yayılmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda kanser, ülseratif kolit gibi kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarının oluşmasına yol açmaktadır [Becker ve ark., 2005; Xie, 2001]. Probiyotik mikroorganizmaların inflamatuvar ortamında IL-8 seviyesini düşürdüğü, IL-10 seviyesini yükselttiği kolorektal kanser hücre hatları ve periferik kan mononükleer hücrelerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [Gackowska ve ark., 2006; Zhang ve

ark., 2005; Morita, 2002]. Organizmada proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretilmesi ve T-yardımcı hücrelerinin denge halinde bulunmasının probiyotikler tarafından düzenlenebilmesi bu mikroorganizmaların klinikte onkoloji ve gastroenteroloji gibi çeşitli alanlarda kullanılmasının önünü açmaya zemin hazırlamıştır [Medina ve ark., 2007]. Probiyotik mikroorganizmaların immünolojik etkileri doğrudan mikrobiyal hücreler ya da peptidoglikanları ve salgıladıkları bileşikler aracılığı ile olabilmektedir [Hoarau ve ark., 2006; Pena ve Versalovic, 2003; Lammers ve ark., 2002]. Bu bağlamda antiproliferatif ve antigenotoksik etkileri ile öne çıkan suşların antiinflamatuvar (antiproliferatif etkinin altındaki bir diğer mekanizma) aktivitelerinin *in vitro* olarak ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda araştırmamızda, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, insan (bebek gaitası) kaynaklı bakteri kültürlerinden, daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış 6 laktik asit bakterisi (*L. brevis* LB63, *L. plantarum* GD2, *L. rhamnosus* E9, *L. rhamnosus* GD11, *L. casei* LB8, *L. fermentum* LB16) seçilmiş ve bu bakterilerle;

- 1) HT-29 ve Caco-2 kanser hücre hatlarında suşların canlı hücrelerinin, metabolitlerinin ve EPS'lerinin antiproliferatif etkisinin araştırılması, bu etkide canlı hücre, metabolit ve EPS'lerden hangisinin daha etkili olduğunun ortaya çıkarılması,
- 2) Biyofilm oluşturmada, kolonizasyonda ve tutunmada rolü olduğu düşünülen EPS üretimlerinin taranarak yüksek ve düşük EPS üreten suşların belirlenmesi,
- 3) Antikanser ajanı olarak kullanımı planlanan suşların (canlı hücre, metabolit ve EPS), genotoksik etkilerinin olmaması güvenilirlikleri açısından önemlidir. Bu nedenle tüm suşların insan lenfositleri üzerinde, genetik hasar oluşturup-oluşturmadığının comet yöntemiyle araştırılması,
- 4) H₂O₂ ile oksidatif DNA hasarına uğratılmış insan lenfosit hücrelerinde, canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin kanseri önleme mekanizmalarından biri olan, antigenotoksik aktivitesinin comet yöntemiyle belirlenmesi,

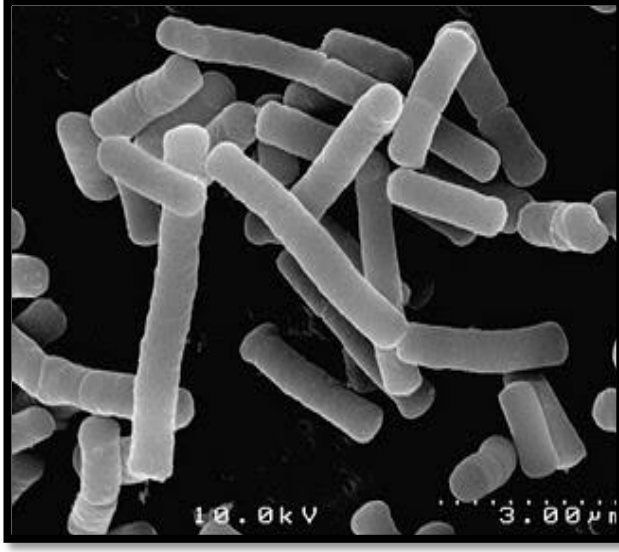
- 5) TNF- α ile inflamasyon ortamı yaratılmış HT-29 ve Caco-2 kanser hücre hatlarında proinflamatuvar sitokin olan IL-8 seviyesine canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin etkisinin araştırılması,
- 6) HT-29 ve Caco-2 kanser hücre hatlarında antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesine canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin etkisinin belirlenmesi,
- 7) Antiproliferatif-antigenotoksik aktivite ve antiproliferatif-antiinflamatuvar aktivite arasındaki ilişkinin araştırılarak, kanseri önleme mekanizmalarının *in vitro* deneyler ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamız ülkemizde ve dünyada doğal gastrointestinal mikroflora elemanı olan probiyotik kültürlerin, kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin belirleneceği ve bu etki ile antigenotoksik ve antiinflamatuvar özelliklerin ilişkilendirileceği ilk çalışma olacağından sonuçları bu alanda yapılacak yeni araştırmalara kaynak oluşturacaktır. Çalışmamızda kullanılan suşların kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemesi ve anti-kanser ajanlarda önemli olabilecek indirekt mekanizmaların (antigenotoksikite ve antiinflamatuvar) ortaya konulması, bu suşların klinik preparatlarda kullanılması bakımından önemli olacaktır. Ayrıca, kanserden koruyucu etkisi son yıllarda sıkça gündeme gelen probiyotik kültürlerin hangi özelliği ile etkin olacağını bilmesi de, daha etkin koruyucu ajan olarak kullanımı açısından önemli bir avantaj sağlayacaktır. Probiyotikler kanserin yanı sıra antiinflamatuvar aktiviteleri ile aşırı immün yanıtı bağli olarak ortaya çıkan ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde de oldukça önemli substratlardır. Ülkemizde son yıllarda bağırsak düzenleyici olarak, probiyotik katkılı gıda ürünleri yaygın kullanılmalarına rağmen, kanser veya inflamatuvar hastalıklardan koruyucu olarak, gıda ve klinik kullanımı mevcut değildir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler doğrultusunda, mevcut suşların bu yönüyle de kullanımı mümkün olabilecektir. Böylece kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların hem profilaksisi hem de aktif tedavisinde, mevcut tedaviye probiyotiklerin eklenmesinin etkili olabileceği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktobasiller, Lactobacillaceae familyasına ait olup laktik asit bakterileri grubundandır. Türe göre değişim göstererek süt ve süt ürünlerinde, insan ve diğer canlıların sindirim sistemleri, vajina, diş ve ağız, ayrıca bazı iç organlar gibi farklı habitatlarda rastlanılabılırler [Ljungh ve Wadström, 2006]. Laktobasiller Gram pozitif (Gr +) ve bir türü hariç hiçbiri spor oluşturmeyan bakterilerdir. Bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir [Çakır, 2003; Gismondo ve ark., 1999]. Laktik asit bakterilerinin “hem” grupları (sitokrom ve katalaz) yoktur. Buna karşın havanın oksijeninde gelişip üreyebilirler [Yücesan, 2002]. Türlerinin çoğu mikroaerofiliktir. Çoğu çubuk (basil) şeklinde olup ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir [Ljungh ve Wadström, 2006] (Şekil 2.1). Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için amino asit, peptit, nükleik asit türevi, vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar [Kao ve ark., 2007; Naidu ve ark., 1999]. 35-40°C sıcaklık ve pH 6,5-6,8’de optimal gelişim gösterirler. Aynı zamanda, bu bakteriler % 1-3 oranında laktik asit oluşturarak pH’yı 3,2-3,5’e kadar düşürürler, bu nedenle asite dayanıklıdırlar [Ljungh ve Wadström, 2006; Arda, 1985]. Canlı mikrobiyal gıda katkı maddeleri olarak probiyotiklerin en iyi bilinenleri laktik asit bakterileridir. Mide asidine ve safra tuzlarına dayanıklı olması, besinlerle alındığı zaman canlı olarak bağırsaklara geçebilmesini sağlamaktadır. Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. türleri; *L. cellebiosus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* ve *L. reuteri*’dir. Teknikte kullanılan laktobasiller hastalıklara sebep olmazlar [Tunail, 2009].



Şekil 2.1. *Lactobacillus* sp. bakterisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü
[www.dribrook.blogspot.com]

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolitleri

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır ve laktatın sentezinde rol alan laktat dehidrogenaz enzimine sahiptirler [Tekinşen ve Atasever, 1994; Nessler, 1994]. Laktik asit bakterileri laktik asit fermentasyonu ile oluşturdukları ürünlerin cins ve miktarına göre sınıflandırılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, fruktoz di fosfat yolu ile parçalayarak, fermentasyon sonunda % 99 oranında laktik asit, % 1 oranında diğer bileşikler meydana getirirler. Heterofermentatif laktik asit bakterileri, glukozu heksoz mono fosfat yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu % 70 laktik asit üretir. % 30 oranında da diğer bileşikler, özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksiti (CO_2) oluştururlar. Bunun yanı sıra bazı laktik asit bakterileri asetaldehit, diasetil, H_2O_2 , ekzopolisakkarit, bakteriyosin, bakteriyosin benzeri metabolitler ve şeker alkoller gibi diğer yan ürünleri de sentezleyebilirler [Yetişmeyen, 1995; Daeschel, 1989; Drinan ve ark., 1976]. Bunlara laktik asit bakterilerinin metabolitleri denir. Yapılan bir çalışmada, laktik asit metabolitlerinin yüksek konsantrasyonunun normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü engellediği, ayrıca laktik asit bakterilerinin oluşturduğu H_2O_2 'in kanserli hücreleri

tekrar eski haline dönüştürdüğü düşünülmektedir [Bauer, 2001]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit metabolitinin ise, kalın bağırsakta indol ve skatol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve hatta kanser başlangıcına neden olan bakterilere karşı engelleyici, bağışıklık sistemini güçlendirici, vücudu koruyucu ve enfeksiyonları engelleyici, kadınlarda hamilelik süresince ve sonrasında kan basıncını düzenleyici etkisi olduğu belirtilmektedir [Canan ve ark., 2004].

2.2.1. Ekzopolisakkaritler (EPS)

Probiyotik mikroorganizmaların çoğalmaları sırasında ya da sekonder metabolit olarak ortama saldıkları polisakkarit yapıda, yüksek moleküler ağırlıklı polimerler olan EPS'ler gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, pıhtı azaltıcı olarak kullanılmaktadır [Kodali ve Sen, 2008; Welman ve Maddox, 2003; Cerning, 1990]. EPS'ler çok sayıda bakterinin yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlerdir [Ruas-Madiedo ve ark., 2006]. Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal EPS'leri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (Lipopolisakkarit, LPS) ve dış çevreye salınan yada hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir [Shoji ve ark., 2013; Leigh ve Walker, 1994]. CPS ve LPS genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS'lerin, hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma, biyofilm oluşturma ve yüzey tutunmasında yapıstırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir [Schurr, 2013; Cerning ve ark., 1994]. EPS'nin suşlara sağladığı bu avantajlarının yanında suşların otoagregasyon ve koagregasyonunda da etkili olduğu düşünülmektedir. EPS'nin laktik asit bakterilerine sağlamış olduğu bu özellik ve avantajları dikkate alınacak olursa, EPS üretimi bir suşun hem starter hem de probiyotik olarak kullanımının çok önemli avantajı olacaktır.

Yapılmış çalışmalarda EPS'lerin probiyotik mikroorganizmaların sağlığa faydalı bilinen etkilerinin oluşmasında doğrudan ya da dolaylı rolleri olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda EPS'lerin antiinflamatuvar, antigenotoksik ve antitümör etkinlik gösterdiği ve EPS'lerdeki fosfat gruplarının makrofaj ve lenfositlerin aktivasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir [Liu ve ark., 2011; Welman ve Maddox, 2003; Kitazawa ve ark., 1998].

2.3. Probiyotik Bakteriler

Probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir [Marteau ve Jian, 2002; Fuller, 1989]. Birleşmiş Milletler-Dünya Sağlık Örgütü Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO/WHO) tarafından yapılan son bildiriye göre ise probiyotikler; “yeterli miktarda verildiğinde konak üzerinde olumlu etki bırakan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır [FAO/WHO, 2001]. Probiyotik bakterilerin çoğunluğu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* türlerine ait cinsler, *Aspergillus niger*, *A. oryza* gibi bazı küflerdir [Akalın ve ark., 2000; Yılsay ve Kurdal 2000] (Çizelge 2.1). Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli özellikleri taşıması gerekmektedir.

Probiyotik özellik için belirlenmiş bir kriter olmamasına karşın, probiyotik olarak izole edilecek ya da tanımlanacak suşun aşağıdaki özellikleri taşıması gerekmektedir:

- Safra tuzu, asit, enzim ve oksijene karşı stabil kalması,
- İntestinal mukozaya tutunabilmesi,
- Gastrointestinal kanalda kolonize olabilmesi,
- Antimikrobiyal maddeler üreterek patojen bakterilerin gelişimini engelleyebilmesi,
- Etkin ve güvenli olması [Kailasapathy ve Chin, 2000].

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Ljungh ve Wadström, 2006]

Cinsler	Türler
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. cellebiosis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. cereus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes</i>	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermanii</i> , <i>P. freudenreichi</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i>
<i>Candida</i>	<i>C. torulopsis</i>

2.3.1. Probiyotik bakteriler ve kanser

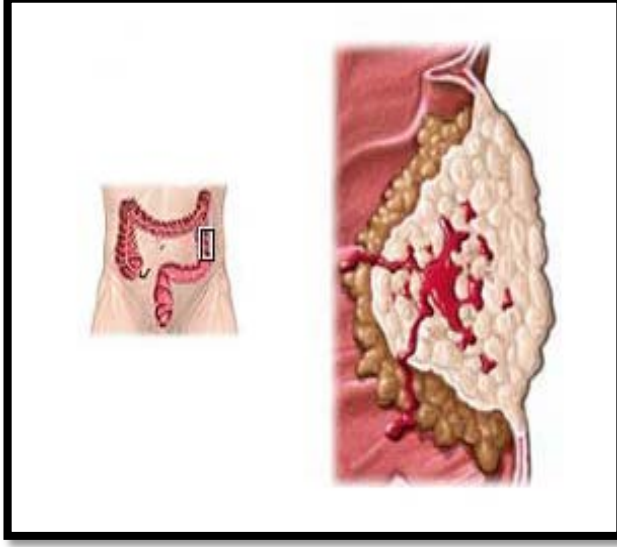
Kanserin gelişiminde flora ve immün sistemin rolü olduğundan, teorik olarak kanseri önlemede probiyotiklerin kullanılabilceği düşünölmektedir [Gill ve Guarner, 2004]. Hayvan deneylerinde kanserin oluşumunda rolü olan enzim ve mutajenlerin azaltılmasında probiyotiklerin rolü ortaya konulmuştur. β -glukoronidaz, nitroredüktaz ve azoredüktaz gibi fekal mikrobiyal enzimler, çeşitli bileşenlerden mutajenler, karsinojenler ve tümör promotörleri ortaya çıkarır. Probiyotikler ile bu enzimlerin aktivitesinin azaltılmasının, hayvanlarda tümör sıklığını azalttığı gösterilmiştir [Reid ve ark., 2003]. Çeşitli hayvan deneyleri, bazı laktobasil suşlarının kullanımı ile transplante veya kimyasal olarak oluşturulmuş tümörün yerleşmesi, büyümesi ve metastazının etkilenebileceğini düşündürmektedir [Yan ve Polk, 2004]. İnsanlarda probiyotiklerin prokarsinojenlerin aktif karsinojenler haline dönüşünü engelleyerek, mutajenik bileşikleri bağlayarak ya da inaktive ederek, antimutajenik maddeler salgılayarak, prokarsinojen bakterilerin çoğalmasını baskılayarak, mutajenlerin bağırsaklardan absorpsiyonunu azaltarak ve immün sistemi güçlendirerek kanser gelişimini önlediği bildirilmektedir [Commane ve ark., 2005].

2.4. Kanser

2.4.1. Kanser biyolojisi

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açan kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize edilmiş olan neoplazinin (patolojik anlamda yeni doku oluşumu) daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte neoplazinin kanser olabilmesi için malign (habis, kötü huylu) özellik göstermesi, diğeri bir ifade ile kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya yakın-uzak mesafelere yayılabilmesi (metastaz; herhangi bir organdaki kanser hücrelerinin vücudun başka bir bölümüne atlaması) özelliğine sahip olması gerekmektedir (Tümörler metastaz yapmıyorsa kanseröz değildir ve bu durumda, benign (iyi huylu) tümör olarak adlandırılır [Nussbaum ve ark., 2005].

Tümör, normal dokuların gelişmesini aşan, normal dokulara uyum göstermeyen ve kendisini oluşturan uyarının yok olması durumunda bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir (Şekil 2.2). Kanser ise, tüm kötü huylu tümörleri kapsayan bir terimdir.

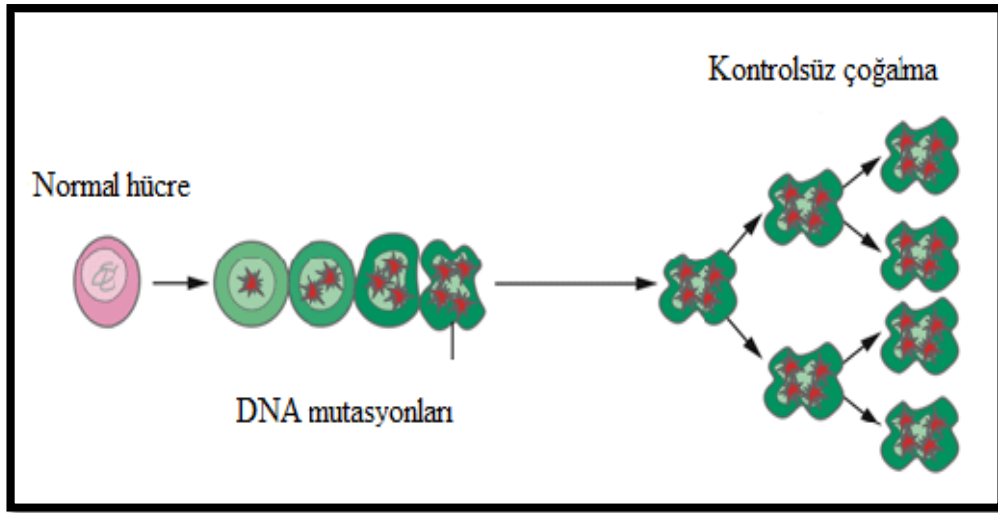


Şekil 2.2. Kolonda tümör dokusu [<http://www.cancer.gov>]

2.4.2. Kanserinin genetik yapısı

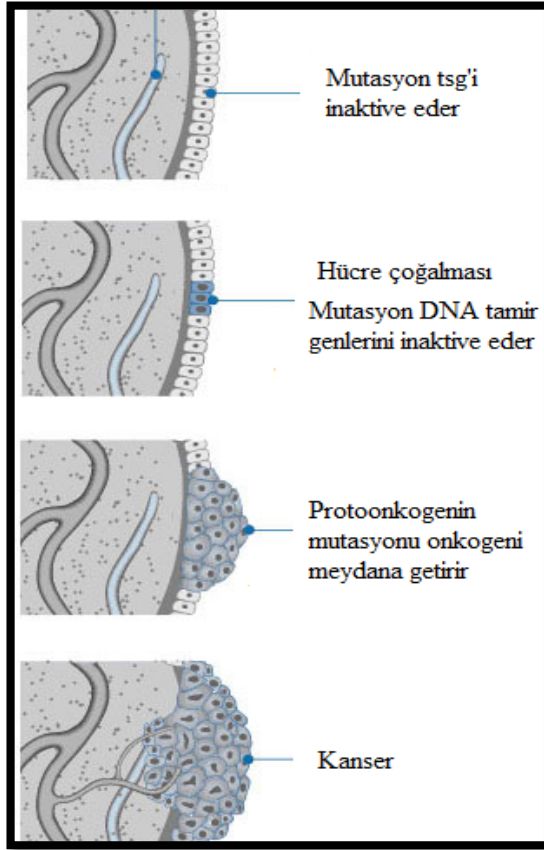
Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğunu göstermiştir. Birçok kanserde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açarlar [Pritchard ve Grady, 2011]. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılamaz. Ancak, kanser vakalarının % 1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur. Hangi durumda olursa olsun, kanser hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir [Öner, 2003]. Mekanizması ne olursa olsun

kanser bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırır. Tüm bu olaylar zinciri, en iyi şekilde kolon kanserinde gösterilmesine karşın diğer kanser türlerinin hepsinde olmasa da bazılarında yer almakta ve şematik olarak Şekil 2.3.'de gösterilmektedir [Nussbaum ve ark., 2005].



Şekil 2.3. Genetik değişikliklerin birikmesi sonucu kanser oluşumu
[<http://www.cancer.gov>]

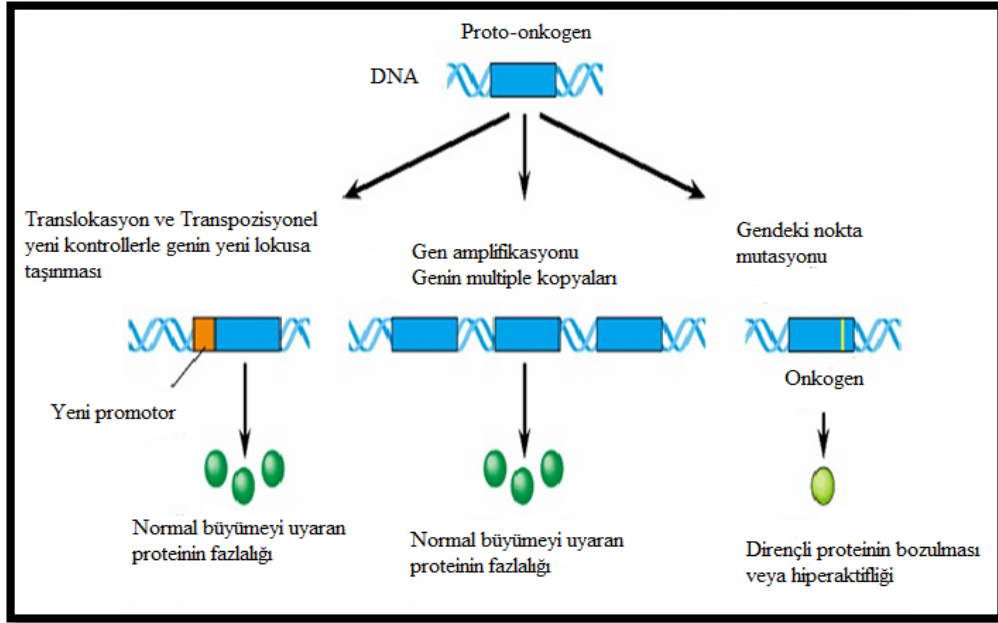
Kansere neden olan genler, iki temel alt gruba ayrılmaktadır: onkogenler ve tümör supresör genler (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kanser genetik oluşumu (Tsg; Tümör supresör gen)
[<http://totalvue.com>]

Onkogenler

Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogen adını verdiğimiz normal hücresel genlerin mutant (aktif olan) allelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya apoptozisi (programlı hücre ölümü) bloke eden genler de olabilirler (Şekil 2.5). Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon özelliğine sahip olup, proliferasyonu stimüle etme, tümörün kanlanması artırma ve apoptozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir [Ross, 1998].



Şekil 2.5. Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü [<http://praxis-kwasniok.de>]

Tümör supresör genler

Tümör supresör genler adlarından da anlaşılacağı gibi hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör supresör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve defektif apoptozise neden olmaktadır [Cooper, 1995]. Tümör supresör genler, hücre büyümesini kontrol eder veya baskılar. Bu fonksiyonu mutasyon yoluyla kaybettiğinde hücre büyümesi kontrol edilemez. Genin tamamen kaybı ya da hasar görmemesi için her iki allelde tümör supresör gene ihtiyaç duyar, böylece hasar veya kayıp birkaç yolla oluşur [Rupnarain ve ark., 2004].

DNA tamir genleri

Son zamanlarda, tümör supresör gen kategorisi yeni bir gen sınıfını kapsamakta olup bu genler, DNA tamir genleri olarak adlandırılmaktadır. Bu büyük gen ailesi, mutajenik kimyasalların ve ışın gibi ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamirden ve hücredeki genomik yapının korunmasından sorumludur [Hara ve ark., 2013;

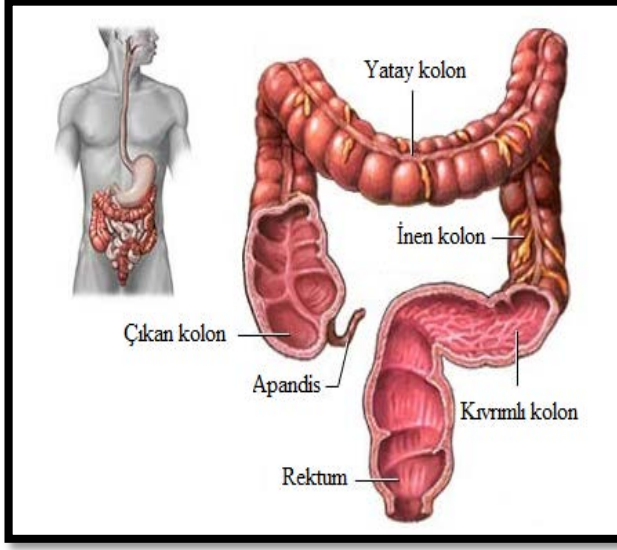
Wyllie, 1997]. DNA tamir genlerinin fonksiyonu, mutasyonel hasar veya DNA replikasyonun her ikisinde oluşan DNA hataları ile bağlantılıdır. Hata tamir edilemezse, bu genler apoptozisi indükler veya DNA hasarını tamir eder [Hendon ve Dipalma, 2005]. DNA tamir genlerinin fonksiyonel etkilerinin inaktivasyonu doğrudan değildir, bu genler tümör supresör olarak sınıflandırılır, çünkü fonksiyonlarının kaybı, kanser artışında önemli etki yapmaktadır. DNA tamir fonksiyon kaybına örnek, kolon ve meme kanserlerinin araştırılmasından elde edilmiştir [Burkovics ve ark., 2013; Warren ve Shields, 1997].

2.4.3. Kolon kanseri

İnce bağırsak kalın bağırsağa, sağ alt karın bölgesinden bağlanır. Kalın bağırsağın en uzun bölümü kolondur. Kolon yaklaşık beş cm kalınlığında veya çapında kaslı tüptür. Kolonda, besin maddelerinden su ve mineral maddeler absorbe edilir [Ward ve ark., 2005].

Kolon dört bölüme sahiptir;

- a) İlk bölüm, çıkan kolon olarak adlandırılır. Kolona ince bağırsağın eklendiği yerden başlar ve kişinin üst sağ karın bölgesine kadar uzanır.
- b) İkinci bölüm, vücudu sağdan sola doğru geçen bölüme kadar olan yerdir ve buraya yatay kolon adı verilir.
- c) Üçüncü bölüme inen kolon adı verilir, sol tarafın altına kadar uzanır.
- d) Dördüncü bölüm, S biçiminden dolayı kıvrımlı olarak bilinir [Ward ve ark., 2005] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kolonun bölümleri [<http://www.dogaltedavi.net>]

Büyük bağırsakta bir kanser formu, kolon veya rektum duvarının içinde ve astarlanma yoluyla gelişmeye başlayabilir. Hücresel sıvı ve atıkları taşıyan kanallar olan lenf damarları veya kan damarlarında gelişebilen kanserler duvarları istila ederler. Kanser hücreleri, enfeksiyonlarla mücadeleye yardım eden lenf nodları yakınına süzülürler. Kanser hücreleri metastaz olarak adlandırılan bu süreçlerle, kan veya lenfatik damarlar yoluyla vücudun uzak bölümlerine taşınırlar [Kinzler ve Vogelstein, 1996]. Kolon kanseri genellikle uzun yıllar boyunca yavaş yavaş ilerler. Kanser gelişiminden önce, kansere dönüşen nonkanserojen polipler gelişir. Polip, kolon veya rektum hattında dokunun büyümesidir [Boland ve ark., 1998].

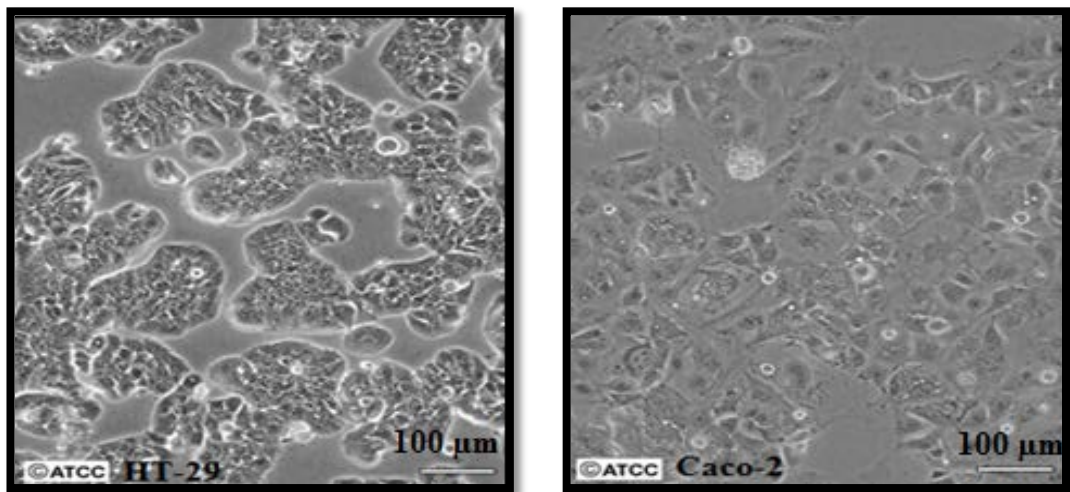
Kolon kanseri hücre hatları

HT-29 ve Caco-2 hücreleri enterosit farklılaşmasının temel karakterini gösterir (Şekil 2.7). İnsan kolon adenokarsinoma hücrelerinden izole edilen Caco-2 hücre tabakası, özellikle insan bağırsak hücrelerinin işlevleri ve organizasyonu, laktik asit bakterilerinin yapışması çalışmalarında kullanılmıştır. HT-29, insan adenokarsinomasından izole edilen bir diğer hücre tabakasıdır. Bu hücre tabakalarının enterosit farklılaşması açıkça ayırt edilebilir. Apikal ve bazal membran birbirinden dar bileşimle ayrılan iki nüfuz alanının biçimlenmesini içerir. Bu nüfuz

alanlarında protein ve lipit kompozisyonlarından kaynaklanan ultra yapısal farklılık göze çarpar. Örneğin apikal yüzey (fırça kenar) peptidaz ve disakkaritleri içerir, bazolateral nüfuz alanı intestinal hidroelektrik salgılanmasının kontrolünü gerektiren birkaç peptit reseptörü içerir. Dar bileşim alanları ise, bu bölgeye özel proteinler içerir. Buradaki karakterler bu hücre tabakalarının, probiyotik bakterilerin *in vitro* yapışma ve kolonizasyon çalışmalarına uygun olmasını sağlar [Gopal ve ark., 2001; Sillanpaa, 2001].

Çizelge 2.2. HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarının karşılaştırılması
[<http://www.lgcstandards-atcc.org>]

HT-29	Caco-2
Organizma: <i>Homo sapiens</i>	Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Doku: Kolon	Doku: Kolon
Morfoloji: Epitel	Morfoloji: Epitel benzeri
Kültür Özelliği: Adherent	Kültür Özelliği: Adherent
Hastalık: Kolorektal adenokarsinoma	Hastalık: Kolorektal adenokarsinoma
Yaş: 44	Yaş: 72
Cinsiyet: Kadın	Cinsiyet: Erkek
Medium Değişimi: Haftada 2-3 kere	Medium Değişimi: Haftada 1-2 kere



Şekil 2.7. Enterosit farklılaşmasının temel karakterini gösteren HT-29 ve Caco-2 hücreleri [<http://www.lgcstandards-atcc.org>]

2.4.4. Kanserin tedavisinde kullanılan uygulamalar

Kanser, hücrelerin bir şekilde kontrolsüz çoğalması, invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapması ile karakterize öldürücü bir hücre hastalığıdır. Kanserin tedavi edilmesinde 4 temel yaklaşım vardır. Bunlar cerrahi, radyoterapi, ilaç (kemoterapi) ve immünoterapidir [Komaki ve ark., 2012].

Kanserin tedavisinde kullanılan ilaçlar antineoplastikler olarak bilinmektedirler. Mevcut kanser ilaçlarının birçok yan etkisi olmakla beraber en önemli problemlerden birisi, bu ilaçların yalnızca kanser hücrelerine öldürücü etkisi değil, aynı zamanda normal hücrelere de öldürücü etkilerinin olmasıdır. Antineoplastik ilaç insan vücuduna girdikten sonra vücut sıvılarında dolaşır ve organizmanın pek çok doku hücreleriyle etkileşir. Hızlı bölünme durumunda olan normal hücreler için kanser ilaçları önemli riskler taşımaktadır. Bu hücreler saç folikül hücreleri, intestinal kanal hücreleri ve kemik iliği hücreleridir [Di Leva ve ark., 2012]. Lenfotoksik etki, immünosupresyon, embriyotoksik, teratojenik, karsinojenik ve mutajenik etki ile alerjik reaksiyonlar antineoplastik ilaçların diğer yan etkilerini oluşturur. Tümör biyolojisi ve tümör-ilaç etkileşmesi, ilacın farmakokinetiği ile farmakolojisi, ilaca rezistans ve hasta ile ilgili faktörler ise kanserin ilaçla tedavisinde başarı şansını kısıtlayan faktörlerdendir [Koontongkaew, 2013].

Kanserin ilaçla tedavisinin yanı sıra cerrahi müdahalelerde, çok küçük bir tümör, akciğer, karaciğer ya da beyine geçmişse, tümörü tek başına çıkartmanın hiç bir anlamı yoktur. Yayılmış bir kanser formunun örneğin, lösemnin ameliyatla tedavisi mümkün değildir. Radyoterapi, ameliyata oranla daha başarılı sonuçların alındığı bir yöntem olmasına rağmen, iyonize radyasyonun tüm formlarının belli koşullar altında kansere neden olabilmesi nedeniyle her zaman bazı kısıtlamalara açıktır. Kanserin ortaya çıkmasında vücudun bağışıklık sisteminde görülen zayıflamanın da etken olduğu düşüncesinden hareketle, özellikle vücudun kendi defans mekanizmasını stimüle ederek, ameliyatlardan, radyoterapiden ya da kemoterapiden sonra vücutta kalabilecek az sayıdaki kanser hücresinin tahrip edilebileceği gösterilmiştir. Bu tür tedavi şekline nonspesifik immünoterapi adı verilmektedir. Nonspesifik denilmesinin

nedeni, hastanın tümörüne özgü bir antijenin kullanılmamasıdır. Çocuk lösemisi, erişkin lösemisi, baş, boyun, göğüs, deri ve bağırsak kanserlerinde kemoterapiye oranla daha uzun süreli hafifletici etkinliği vardır. Ancak, kemoterapiden önce uygulanırsa hafifletme oranı ortaya çıkmamaktadır [Chabner ve Longo, 2011; Wolchok ve ark., 2009].

Bilimsel tıbbi tedavi yöntemleri olan kemoterapi, cerrahi tedavi ve radyoterapinin belirli yan etkilerinin bulunması ve başarı şansının nispeten düşük olması sebebiyle hastalar tamamlayıcı ve alternatif uygulamaları tercih etmektedirler [Molassiotis ve ark., 2005].

Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi, tamamlayıcı ve alternatif tedavileri, henüz konvansiyonel tıbbın bir parçası olarak kabul edilmeyen sağlık bakım sistemleri, ürünleri ve uygulamaları olarak tanımlamaktadır [Ades ve Yarbro, 2000].

Amerikan Kanser Birliği ve Ulusal Kanser Enstitüsü, alternatif tedavileri hastalığın geleneksel tedavisinin yerine kullanılan uygulamalar şeklinde tanımlarken, tamamlayıcı tedavileri ise, modern tıp ile birlikte kullanılan tedavileri tamamlayıcı yaklaşımlar olarak tanımlamaktadır. Ancak bugün tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin sınırları tam olarak belirlenmiş değildir. Bu konudaki tartışmalarda tamamlayıcı ve alternatif tedaviler genellikle birlikte kullanılmaktadır [Ernst ve Cassileth, 1998].

Amerikan Kanser Birliği ve Ulusal Kanser Enstitüsü, tamamlayıcı ve alternatif tedavileri beş başlık altında toplayarak gruplandırmıştır [Ades ve Yarbro, 2000].

- 1) Alternatif ve medikal sistemler,
- 2) Beden-Zihin müdahaleleri ,
- 3) Biyolojik temelli,
- 4) Manipülatif ve beden temelli tedaviler,
- 5) Enerji tedavileri.

Kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığı ile ilgili yapılan çalışmalarda; 13 ülkede 26 çalışmanın incelendiği bir sistematik derlemede kanser hastaları arasında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığının % 7 ile % 64 arasında (ortalama % 31, 4) değiştiği bulunmuştur [Ernst ve Cassileth, 1998]. Hastanede yatarak tedavi alan Norveçli kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanımı % 20 olarak bulunmuştur [Risberg ve ark., 1997]. Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu 14 Avrupa ülkesinde kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığının incelendiği bir çalışmada, kanser hastalarının tamamlayıcı ve alternatif tedavileri kullanma oranı % 36 olarak (% 15-73 arasında değişen aralıkta) bulunmuştur [Molassiotis ve ark., 2005].

Türkiye'de kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanım sıklığını Ceylan ve arkadaşları % 60, Samur ve arkadaşları % 50, Oğuz ve Pınar % 80, Taş ve arkadaşları % 47, Gözüm ve arkadaşları % 41, Işıkhani ve arkadaşları % 39, Algier ve arkadaşları % 36 şeklinde değişen oranlarda bulmuşlardır [Algier ve ark., 2005; Kav ve ark., 2008].

Biyoteknolojik olarak bitkiler kanserin birçok formunun tedavisi için kullanılan ve yüksek oranda etki gösteren geleneksel ilaçların birincil kaynağıdır. Bitkisel kaynaklı terapötik ajanlar birçok hastalığın tedavisinde ve hastalıklardan korunmada kullanılmaktadır. Antikanser terapisi için kullanılan birçok ajan bitkilerden türevlenir [Tan ve ark., 2011]. Epidemiyolojik çalışmalar bitkilerle yapılan tedavilerin yanı sıra, yüksek miktarda probiyotik alımının insanlarda düşük kanser prevalansı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Karsinogen inaktivasyonu, antiproliferasyon, hücre döngüsünün askıya alınması, apoptozis ve farklılaşmanın indüksiyonu, anjiyogenezin baskılanması, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması ya da tüm bu mekanizmaların kombinasyonu probiyotiklerin kansere karşı etki mekanizmalarını oluşturur [Liu ve ark., 2013].

2.4.5. Laktik asit bakterilerinin antiproliferatif etkisi

Kanserlerin özellikle kolon kanserinin oluşmasında yağ oranı yüksek ve az lifli gıdaların tüketilmesi gibi yanlış beslenme alışkanlıklarının büyük rolü olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, GİS hastalıklarının oluşmasında bağırsak mikroflorası önemli rol oynamaktadır [Precott ve ark., 2005; Mital ve Garg, 1995]. Bazı probiyotik suşların kolon kanseri tümör hücrelerinin gelişimini azalttığı ve apoptoza götürdüğü ya da önlediği öne sürülmektedir [Altonsy ve ark., 2010; Thirabunyanon ve ark., 2009].

Laktik asit bakterilerinin antiproliferatif etkisi doğrudan mikrobiyal hücreler ya da peptidoglikanları ve sentezledikleri bileşikler aracılığı ile olabilmektedir [Ruas-Madiedo ve ark., 2010; Lammers ve ark., 2002]. Laktik asit bakterilerinin kanseri doğrudan baskıladığına dair deneysel kanıtlar olmamasına rağmen, dolaylı olarak kanser üzerine etkili olduğu bildirilmektedir. Ancak, mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlar;

- Konak immün sisteminin aktivasyonu,
- Antimutajenik aktivite,
- Bağırsak mikroflorasının düzenlenmesi,
- Tümörün baskılanması [Burns ve Rowland, 2000; Sanders, 1994].

Konak immün sisteminin aktivasyonu

Tümör mikroçevresi, tümörün ilerlemesi ve yayılmasında yer alan pek çok farklı hücreden ve bunların salgıladıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bu moleküllerin içerisinde tümör oluşumunda ve yayılmasında en fazla rolü olan sitokinlerdir. IL-8 normal hücrelerden olduğu kadar tümör hücrelerinden de salınmakta ve akut inflamatuvar reaksiyonların başlamasında rol almaktadır. Tümör mikroçevresinde artmış IL-8, tümör ilerlemesinde ve metastazda önemli bir faktördür. Antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'un antimetastatik ve antitümör aktiviteye sahip olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir [Wang ve ark., 2010; Kundu ve ark., 2005;

Huang ve ark., 1999]. Laktik asit bakterilerinin immün sistem üzerindeki etkileri, antikor üretimini ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivitesini arttırmak, nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) yolağını modüle etmek ve T hücre apoptozisini indüklemekten oluşmaktadır. Laktik asit bakterileri genellikle IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi intestinal antiinflamatuvar sitokin üretimini arttırırken, TNF- α , interferon-gama (IFN- γ) ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin üretimini düşürürler [Maassen ve ark., 2000]. Laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar özellikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Borruel ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada, Chron hastalığına sahip kişilerin ileal örneklerinin *L. casei* DN114001 ve *L. bulgaricus* LB10 ile *ex vivo* muamele edilmesinden sonra TNF- α üretiminde düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç T yardımcı-1 (Th1) hücreleri ilişkili inflamasyonun probiyotiklerce düşürüldüğünü göstermektedir. Perdigon ve arkadaşları (2001) ise, bazı probiyotiklerin salgısal T yardımcı-2 (Th2) tip yanıtı aktive ettiğini ve böylece antiinflamatuvar mekanizma ile antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Antimutajenik aktivite

Laktik asit bakterilerinin antimutajenik aktivitesinin temelinde, mutajenik bileşiklere fiziksel bağlanma vardır [Naidu ve ark., 1999]. Bağlanmada bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanları ile polisakkaritler önemli rol oynamaktadır [Bolognani ve ark., 1997]. Fernandes ve arkadaşları (1987) yaptıkları çalışmada, nitritden nitrozaminin oluşumunu laktik asit bakterilerinin düşürdüğünü göstermişlerdir. Probiyotik laktobasil suşlarının, mutajen ve kanserojen etkiye sahip olan β -glukoronidaz, nitroredüktaz ve azoredüktaz gibi fekal mikrobiyal enzimlerin miktarını azalttığı rapor edilmiştir [Roberfroid, 2000]. *L. acidophilus*'un tümör hücrelerini inhibe ettiği ve prokarsinojenleri kanserojen maddelere dönüştürebilen mikroorganizmalara karşı antagonistik etkide bulunduğu bildirilmektedir. Ayrıca *L. acidophilus*'un antitümör etkiye sahip olduğu da bilinmektedir. Probiyotik bakteriler, kansere sebep olan enzimler veya kansere sebep olan kaynakları ortamdaki uzaklaştırabilirler. Kansere öncesi kanser yapıcı etkilerin probiyotik bakteriler tarafından uzaklaştırılması, üretilen nitrozamin oranının azaltılmasını içerebilir. Bunun dışında laktik asit

bakterilerinin ürettikleri metabolitlerin kanserin gerilemesi üzerindeki rolü; farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) tümör gelişimini azaltmadaki rolü dikkat çekicidir. Bu mikroorganizmalar KZYA'den asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asit üretmektedirler [Lee ve Puong, 2002; MacFarlane ve Gibson, 1995]. KZYA'den asetik asit Gram negatif bakteriler üzerinde etkin bir antagonistik aktivite göstermektedir. Lankaputhra ve Shah (1998b) tarafından Ames *Salmonella* testi kullanılarak yapılan çalışmada; asetik asidin, laktik, pürivik ve bütirik asitten daha fazla antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu asitlerin üretimi bağırsak pH'sını düşürmekte, bazı patojen ve çürükçül bakterilerin gelişimini engellemektedir. HT-29 kolon kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin hücrelerin gelişimini önemli derecede azalttığı gözlenmiştir [Villarante ve ark., 2011; Baricault ve ark., 1995].

Bağırsak mikroflorasının düzenlenmesi

Laktik asit bakterileri kolondaki diğer bakteriler ile substratların fermentasyonu için yarış halindedirler. Bu substratlar, sindirilmemiş karbonhidratlar, ölü epitelyum hücrelerinin protein ve lipidleri, gastrointestinal salgılarından müsin ve ölü bakterilerin komponentleridir [Howarth ve Wang, 2013; Pornare ve ark., 1985]. Probiyotiklerin ürettiği antimikrobiyal moleküller patojen mikroorganizmaların çoğalmasını sınırlar. Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriyosin gibi etken maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler [Ouweland ve ark., 1999]. *In vitro* olarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; laktobasillerin bir çoğu asetik asit ve laktik asit gibi metabolitlerinden ve pH'yı düşürmelerinden dolayı bakteriyel patojenlerin çoğalmasını engeller [Lo ve ark., 2004]. Probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturarak, epitelyal hücrelerin bu mikroorganizmalarla bağlanma derecesini azalttığı düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin intestinal epitelyal hücrelerle adezyonunu sağlayan çeşitli yüzey determinantları bulunmaktadır. Bu bakterilerin mikrobiyal adezyonu pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik ve sterik kuvvetlerle, lipoteikoik asit ve lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkilidir [Servin ve Coconnier, 2003]. Ayrıca laktik asit bakterisi tarafından üretilen nötral ya da asidik yapıda olan

EPS'ler de bu mikroorganizmaların genel yüzey özelliklerini belirler. Birçok laktobasil suşu intestinal müsin (MUC)-3 ve MUC-2 ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Örneğin; *Lactobacillus* GG suşunun intestinal epitel hücrelerinin apoptozisine engel olarak bariyer fonksiyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [Yan ve Polk, 2002]. Bazı probiyotik ajanlar, Toll-like reseptör-spesifik (TLR-spesifik) immün stimülatör etkiye sahiptirler. Böylece intestinal epitelyal bariyeri düzeltirler ve konağı korurlar. Probiyotiklerin epitelyal bariyer fonksiyonunu TLR-2 ilişkisiyle modüle ettiği düşünülmektedir. TLR-2 ayrıca bakteriyal lipoprotein ve lipoteikoik asiti tanımakta rol oynamaktadır [Ewaschuk ve Dieleman, 2006].

Tümör baskılanması

Laktik asit bakterilerinin tümör inhibe edici ve antitümör etkilerinin biyolojik temeli, birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Bu etkiler konağın immünoestimülasyonunu ya da neoplastik enzim aktivitesini düşürmesi olabilir. Örneğin, *B. infantis*'den izole edilen bir peptidoglikan, lezyon içine enjekte edilen farede % 70 tümör gerilemesine yol açmıştır [Sekine ve ark., 1985]. Hayvanlar ve insanlarda sağlığın korunmasında laktik asit bakterilerinin bağırsaklarda immünmodülatör rolü oynadığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. C3H/He erkek farelerde enterik florada bulunan *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* ve *Clostridium paraputrificum* karaciğer tümörögenезisini desteklemektedir Bu destekleyici etkinin bağırsak bakterileri olan *B. longum*, *L. acidophilus* ve *Eubacterium rectale* tarafından baskılandığı bulunulmuştur [Mizutani ve Mitsuoka, 1980; Mizutani ve Mitsuoka, 1979]. Yapılan bir çalışmada, blastolizinin antitümör aktivitesi, *L. bulgaricus*'un hücre duvarının glikopeptid fragmentlerinden oluşan bir preparatta gösterilmiştir [Bogdanov ve ark., 1977]. Blastolizinin antitümör etkisi farelerde doğal tümörler, karsinoma LIC, melanokarsinoma B-16, adenokarsinoma AKATOL, plazmasitoma MOPC-315, lösemi P-388, sarkoma S-180 üzerinde gösterilmiştir. Blastolizin çok düşük toksisiteye sahiptir ve kan hücrelerinin yapılmasını inhibe etmez. Blastolizinin tümör dokusu üzerindeki etkisi bilinen antitümör kemoterapötik ajanlarına göre önemli ölçüde farklıdır. Başka bir çalışmada, *L. bulgaricus* suşu 51'in lizozim lizatlarından blastolizin fraksiyonu jel filtrasyonu ile

izole edilmiştir. Blastolizinin sarkom S-180'nin hücre proliferasyonu üzerine güçlü bir engelleyici etkisi saptanmıştır. Fraksiyonun tekrar muameleleri sonucunda hayvanlarda tümörün % 15 oranında gerilediği bulunmuştur. Tümör büyümesinin uzun süreli baskılanması sağlanmıştır. Histolojik çalışmalar blastolizin fraksiyonunun tümör hücre nekrozuna neden olma yeteneğini ortaya koymaktadır [Ketlinskii ve ark., 1987]. Yüzeysel mesane tümörlerindeki *L. casei*'nin inhibitör etkileri N-bütil-N-nitrozamin ile indüklenmiş fare mesane kanseri deneysel sistemi ile gösterilmiştir [Tomita ve ark., 1994]. Sonuçlar göstermektedir ki, organ başına tümör hacmi ve mesanenin ağırlığı, *L. casei* ile muamele edilen grupta edilmeyen gruba göre önemli ölçüde daha düşüktür ($p<0,05$). *L. casei* verilen gruplarda *L. casei* ile muamele edilmeyen gruplara göre N-bütil-N nitrozamin ile indüklenmiş tümörlerin malignant derecesi önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Farede *in vivo* koşullarda Bifidobakteri hücre duvarından hazırlanan preparatın hayatta kalma süresini uzatma, tedavi oranlarını ve antitümörün nötürleşme faaliyetlerini artırma yeteneği belirlenmiştir. Tümör aşısı ve hücre duvarı preparatına duyarlı hale getirilen farelerde sadece tümör aşısı verilen farelere göre yaşam süresi ve tedavi oranları sinerjistik olarak artmıştır [Sekine ve ark., 1994]. Laktik asit bakterilerinin kolon kanserindeki antitümör aktiviteleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir. Fermente süt ürünleri tüketen kadınlardaki meme kanser riskinin düştüğünü bazı epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir. Fermente süttten elde edilen beş bakteri suşunun (*B. infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *L. acidophilus* ve *L. paracasei*) MCF7 meme kanser hücre hattı büyümesi üzerine direkt etkileri çalışılmıştır. Fermente süttten elde edilen beş bakteri suşunda büyümeyi inhibe etmeyi indüklediği en etkili olarak (9 günden sonra % 85 inhibisyon oranı) *B. infantis* ve *L. acidophilus*'da bulunmuştur [Biffi ve ark., 1997].

2.5. İmmünoloji

2.5.1. Sitokinler

Sitokinler; makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan ve immün sistem hücrelerinin proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol oynayan ve hücreler arası

iletişimi sağlayan maddelerdir. Yapılan çalışmalar çok sayıda hastalığın patogenezi veya tedavisinde sitokinlerin rolü bulunduğunu ortaya koymaktadır [Habtemariam, 2013; Lewis, 1998]. İmmün sistemi düzenleyen sitokinlerin vücuttaki düzeyleri, yaşlanmaya bağlı olarak azalmakta ve neticede basit bir enfeksiyondan kansere kadar birçok hastalığa duyarlı hale gelmektedir [Habtemariam, 2013; Levinson ve Jawetz, 1998]. Lenfositler tarafından salgılandıkları zaman lenfokinler, monosit ve makrofajlar tarafından salgılandığında ise monokinler, lökositler tarafından salgılandıkları zaman ise interlökin olarak adlandırılmaktadır [Abbas ve ark., 2011]. Temel etkilerine göre sitokinler 4 gruba ayrılırlar.

-Doğal immüniteye aracılık eden sitokinler (Tip I IFN, TNF, IL-1, IL-6 ve kemokinler)

-Lenfosit aktivasyonu, büyüme, diferansiyasyon regülatörleri olarak T lenfositlerinin özel antijenleri tanımlarına yanıtı temin eden sitokinler (IL-2, IL-4, TGF- β)

-Bağışıklık aracılığıyla inflamasyonu düzenleyen sitokinler. Bu grup sitokinler antijenle uyarılmış CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositler tarafından uyarılırlar ve inflamatuvar lökositleri aktive ederler. Bu hücrelerin T hücresi regülasyonuna girmesini sağlarlar (IFN- γ , Lenfotoksin (LT), IL-10, IL-5, IL-12)

-İmmatür lökosit büyüme ve farklılaşmasına aracılık eden mediyatörler (c-kit-ligand, IL-3, Granülosit-makrofaj koloni simülatör faktör (G-MCSF), Monosit-makrofaj koloni uyaran faktör (M-CSF), Granülosit koloni stimülatör faktör (G-CSF), IL-7, IL-9, IL-11) [Rongvaux ve ark., 2013; Farrar ve Schreiber, 1993].

2.5.2. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α)

TNF birçok hücre tipinde salgılanan bir glikoproteindir. TNF'nin hücresel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. İki çeşit TNF vardır. Bunlar; genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (kaşektin) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (lenfotoksin)'dir [Habtemariam, 2013; Oppenheim ve ark., 1994; Abbas ve ark., 1997]. TNF- α nötrofiller, aktive olmuş lenfositler, NK hücreleri, endotelial hücreler ve mast hücreleri tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokindir [Borish ve Steinke, 2003]. LPS'ler, monositlerden TNF- α salınımına neden olan en

güçlü uyarıcıdır. TNF- α 'nın birçok fonksiyonu vardır. TNF- α , endojen pirojen etkiyle ateşi yükseltir. Bu etkiyi IL-1 ile yapar [Habtemariam, 2013]. Nötrofil ve monositler için kemotaktiktir. TNF- α polimorfonükleer lökosit (PMNL) tutunmasını arttıran bir sitokindir ve endotel hücrelerinden interselüler adezyon molekülü sentezini ve ekspresyonunu arttırmaktadır [Habtemariam, 2013; Dustin ve Springer, 1989]. TNF- α , fagostoza arttırarak ve süperoksitlerin salınımına yol açarak solunumun bozulmasına neden olur. Bunun dışında, lökositleri uyararak mikroorganizmalara ve tümör hücrelerine karşı etkinin ortaya çıkmasına neden olur [Borish ve Steinke, 2003; Samlaska ve Winfield, 1994]. TNF- α , monositlerin IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri yapma kapasitesini artırır. TNF- α , nötrofillerin damar çeperlerine tutunmasını ve kemotaksisini arttıran güçlü bir aktivatördür [Rongvaux ve ark., 2013; Klebanoff ve ark.,1987].

2.5.3. Kemokinler ve interlökin-8

Kemokinler farklı hücre tiplerini aktive eden ve selektif olarak onlarla ilişki içerisinde olan bir polipeptid ailesidir [Horuk, 2001; Baggiolini ve Dahinden, 1994]. Kemokinler, mononükleer fagositik hücrelere ek olarak T lenfositlerinden, NK hücrelerinden, nötrofillerden, keratinositlerden, hepatositlerden, endotel ve epitel hücrelerinden de sentezlenmektedir. Miktar olarak oldukça fazla üretilirler [Agaugue ve ark., 2008]. Kemokin ailesi içinde üzerinde en çok çalışılan IL-8'dir. IL-8'in kaynağı monositler, makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleridir. Kemokinler hedef hücrelerin dominant olarak büyümelerinden ziyade fonksiyonlarını etkiler [Oppenheim ve Ruscetti, 1997]. IL-8'in hedef hücreleri ise nötrofillerle T hücreleridir. Nötrofillerin mobilizasyonunu, aktivasyonunu ve degranülasyonunu sağlar, anjiyogenezde rolü vardır. Primer olarak mononükleer fagositlerden, endotelial ve epitelyal hücrelerden kaynaklanan IL-8, aynı zamanda T hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, fibroblastlar, keratinositler, hepatositler ve kondrositlerden de salgılanabilir [Greene, 2013; Oppenheim ve Ruscetti, 1997]. IL-8 sentezi LPS'ler, IL-1, TNF ve virüsler tarafından da aktiflenebilir. IL-8 nötrofiller için en potent kemotaktiklerden biridir. Aynı zamanda polimorfonükleer nötrofillerin degranülasyonunu (özellikle solunum yollarında) ve endotel hücrelerine adezyonunu

sağlar [Greene, 2013; Brown ve ark., 1993]. İnflamatuvar yanıtta diğer kemotaktiklerle karşılaştırıldığında IL-8 daha geç ortaya çıkar [Adkinson ve ark., 2003].

2.5.4. İnterlökin-10

IL-10 insan immün yanıtında bulunan en önemli antiinflamatuvar sitokindir. Primer olarak T lenfositleri, monositler, makrofajlar, B lenfositleri ve nötrofiller tarafından sentezlenen ve supresif bir sitokin olan IL-10 konakçının gram negatif sepsiste organ yetmezliği ve ölümden korunmasında kritik bir rol oynar. IL-10 koruyucu aktivitesini IL-1 β , TNF- α , IL-8, IFN- γ , IL-6 ve prostaglandin metabolitleri gibi inflamasyon mediyatörlerini inhibe ederek gösterir. IL-10 immün cevabın önemli bir regülatörüdür. IL-10 birçok sistemik hastalıkta ve inflamatuvar durumlarda dolaşımında ölçülebilir. Otoimmün, malign, enfeksiyöz hastalıkları disregüle ettiği düşünülen önemli bir sitokindir [Opal ve DePalo, 2000; Weiss ve ark.,1989]. IL-10 ilk kez fare yardımcı T (tip 2) lenfositlerinden köken alan sitokin olarak tanımlanmış ve Th1 hücrelerinde sitokin yapımını inhibe etmesi nedeniyle "Sitokin yapımını inhibe eden faktör" olarak isimlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar Th2 ve CD8⁺ T lenfositlerinin, monosit/makrofajların, aktive olmuş B lenfositleri ile Epstein Barr virüsü tarafından transforme edilen B lenfositlerinin IL-10 üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir [Clambey ve ark., 2013; Oppenheim ve ark., 1994; Burdin ve ark., 1993]. IL-10'un hematopoetik hücre dizileri üzerine multiple biyolojik etkileri vardır. İnsanlarda B lenfositleri için büyüme ve differansiye edici faktör olarak, fare modellerinde T lenfositleri için büyüme faktörü olarak etki gösterir. Bu özellikleri dışında immünosupresif etkileri de belirlenmiştir. Th1 hücrelerinden IL-2 ve IFN- γ yapımını, antijen spesifik T hücre aktivasyonunu bloke eder, ayrıca monosit/makrofajlardan sitokin yapımını inhibe edebilir [Tahvanainen ve ark., 2013; Oppenheim ve ark., 1994]. IL-10 miktarının artması sonucunda hücresel immün cevapta azalma gözlenir. Bağışık yanıtın baskılanmasına aracılık eden sitokinlerin üretimindeki ince farklılıklar T lenfositlerinin Th1 veya Th2 yönündeki farklılaşmasında anahtar bir rol oynayabilir. IL-10, bazı hastalıkların gelişimine zemin hazırlayan diğer bağışık yanıt araçlarının üretimini düzenleyebilir. Doku nakli

sonrası doku reddinde yüksek IL-10 seviyesi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur [Tadokera ve ark., 2013].

2.5.5. Bazı hastalıklar ile immün sistem arasındaki ilişki

Sitokinler, inflamatuvar yanıtta ve kanserin patogeneğinde önemli bir rol alırlar. Elde edilen veriler, sistemik inflamasyonun kolorektal kanser için makul bir mekanizma olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Araştırmalar IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi inflamasyonla ilişkili genlerdeki genetik varyasyonların, kolorektal adenom ve kolorektal kansere yatkınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir. IL-6 ve IL-8'in hücre büyümesini uyararak ve apoptozisi inhibe ederek parakrin ve otokrin bir mekanizma ile tümör oluşumunu artırdığı görülmüştür. Bunun yanında IL-6 ve IL-8 seviyelerinin hastalık durumunu yansıttığı ve yaygın metastatik hastalık ile ilişkisi bulunduğu saptanmıştır [Wang ve ark., 2010]. TNF- α , NO üretimini artıran ve diğer inflamatuvar sitokinleri uyaran NF- κ B yolunun aktif eder. IL-6, TNF- α ve C-reaktif proteinin (CRP) yüksek düzeyleri ile karsinogenez gelişmesi arasında ilişki olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Ayrıca, yapılan bir çalışmada, serum IL-6, IL-8, TNF- α ve CRP düzeyi yüksekliği ile tümör büyüklüğü arasında da ilişki olduğu gösterilmiştir [Kocabaş ve ark., 2007]. Tümör mikroçevresi, tümörün yayılmasında yer alan pek çok farklı hücreden ve bunların salgıladıkları sinyal moleküllerinden meydana gelmektedir. Bu moleküllerin içerisinde tümör oluşumunda ve yayılmasında en fazla rolü olan sitokinlerdir. Bunların içerisinde IL-8 normal hücrelerden olduğu kadar tümör hücrelerinden de salınmakta ve akut inflamatuvar reaksiyonların tetiklenmesinde rol oynamaktadır. Tümör mikroçevresinde artmış IL-8, tümörün gelişiminde ve metastazda önemli bir etkidir. Organizma bir inflamatuvar süreçte proinflamatuvar sitokinlerin üretiminden ayrı olarak inflamasyonu baskılayan antiinflamatuvar etkili sitokinler de üretmekte ve böylece denge oluşumunu sağlamaktadır. Antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'un antimetastatik ve antitümör faaliyete sahip olduğu *in vivo* olarak kanıtlanmıştır [Kundu ve ark., 1996; Huang ve ark., 1999].

Gastrointestinal sistemde *Helicobacter pylori* enfeksiyonu konakta sistemik spesifik ve nonspesifik bir dizi yanıt oluşmasına neden olan bir hastalıktır. Bakteriye karşı nonspesifik savunma mekanizmaları mukus, sindirim enzimleri, lizozim, laktoferrin ve oral kavite ile midedeki diğer antimikrobiyal bileşenlerdir. *H. pylori* midenin mukus bariyerini, spiral yapısı ve flagellası ile geçerek mide mukozasına ulaşmayı başarır. *H. pylori* mide mukozasına ulaştıca, epitel hücrelerinin birbirlerine temas ettikleri yerlere yapışır. Serbest kalan bakteriyel antijenler, kemotaksinler ve diğer bileşenler özellikle PMNL ve makrofajları aktive eder. Daha sonra IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- β salgılanır. *H. pylori* antijenleri olgunlaşmamış B lenfositlerine sunulur. İlk antikor yanıtı immünglobulin (Ig) M şeklindedir. Daha sonra IgA ve IgG antikorları salgılanır. Sistemik antikor yanıtının en önemli bileşeni IgG, özellikle de IgG₁'dir. IgA'nın ise alt sınıfı IgA₁'dir. IgA antikorları *H. pylori*'nin mide epiteline yapışmasını engellerken, IgG, kompleman fiksasyonu ve aktivasyonunda yol oynar. Kısa ömürlü olan IgG₂ ve IgG₄ yanıtları yeni bir enfeksiyon lehine değerli bir bulgudur [Sandıkçı ve Köksal, 1996; Brooks ve ark., 1995].

Hepatik ensefalopati, son evre karaciğer sirozu ve fulminan karaciğer yetmezliğinin önemli bir komplikasyonudur. Bu kompleks sendrom "hepatik yetersizlik nedeniyle merkezi sinir sisteminin fonksiyonundaki bir bozukluk" olarak tanımlanmaktadır. [Bleia ve Córdoba, 2001]. Karaciğer Kupffer hücreleri, özellikle proinflamatuvar sitokinler olarak bilinen TNF- α , IL-1 ve IL-6'yı üretir. Karaciğer aynı zamanda dolaşımdaki serbest sitokinleri azaltarak onların sistemik etkilerini sınırlar. Hepatik ensefalopatide yetersiz klirens nedeni ile sitokin düzeylerinde bazı değişiklikler meydana gelir [Tilg ve ark., 1992]. Hastalarda Kupffer hücreleri deprese olurken, bağırsak permeabilitesi artar, hepatik detoksifikasyon ve eliminasyon azalır, sitokinlerin aşırı üretimi başlar [Dinarello ve Moldawer, 2000].

Atopik dermatit, çoğunlukla bebek ve erken çocukluk döneminde başlayan, genetik faktörlerin eşlik ettiği, çeşitli alerjenlerle tetiklenebilen, kronik, tekrarlayıcı yangısal bir cilt hastalığıdır [Kristal ve Klein, 2000]. Atopik dermatitte dendritik hücreler IgE taşırlar ve yüksek afiniteli reseptörleri eksprese ederler [Novak ve Bieber, 2005]. Cilt lezyonlarında güçlü antiviral aktiviteye sahip IFN- γ sentezi yapan plazmasitoid

dendritik hücreler her zaman mevcut değildir [Wollenberg ve ark., 2002]. Aksine miyeloid dendritik hücrelerin iki popülasyonu olan langerhans hücreleri (LH) ve yangısal dendritik epidermal hücreleri vardır [Wollenberg ve ark., 1996]. Atopik dermatitte alerjenlerin özgün IgE ve yüksek afiniteli reseptörlere bağlanmasıyla LH aktive olur. Langerhans hücreleri (LH) monosit kemotaktik protein-1 ve IL-16'yı üretmektedir. Alerjenlerden elde edilen peptitler, LH tarafından T hücrelerine sunulmakta ve Th2 hücre profilini indüklemektedir. Deriye göçten sonra toplanmış monositler yangısal dendritik epidermal hücrelere dönüşür ve önyangısal IL-1-6 sitokinlerini ve TNF- α 'yı üretirler. Bu hücrelerin IL-12 ve IL-18 üretmeleri Th2'den Th1 hücre baskınlığının oluşumuna katkıda bulunur ve böylece hastalığın kronik faza ilerlemesine yol açmaktadır [Haagerup ve ark., 2004].

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, gastrointestinal kanalın kronik, idyopatik inflamasyonu ile karakterize hastalıklardır; Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki major klinik formdan oluşur. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında, Th1 tipi hücrelerin uyarılması ile IL-1, IL-2, TNF- α , IFN- γ gibi Th1 tipi sitokinler daha çok salgılanarak Crohn hastalığı gelişir. Burada hücrel immün aktivitenin daha fazla artışı, azalmış apoptozisle aşırı artan hücrelerin ortadan kaldırılmayışı ve lenfosit birikimi söz konusudur. Ülseratif kolitte ise IL-4, IL-5, 6, 10 gibi Th2 tipi sitokinler, Th1 tipi sitokinlerden daha fazla salgılanarak B lenfositlerinden aşırı miktarda IgG salgılamasına neden olurlar. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında daha çok otoantikorlar yoluyla bir otoimmün yanıt söz konusudur [Özkan, 2003].

Alerjik rinit gibi hastalıklarda, immün yanıt patogenezinde alerjen spesifik CD4⁺ T hücreleri anahtar bir role sahiptir. Bu hücreler yalnızca alerjen duyarlılanması için değil bunun yanında alerjik hastalıkların bütün inflamatuvar süreçlerinin ortaya çıkışı için gereklidir. Aktive olmuş özgül T hücreleri alerjik hastalarda çok yüksek oranda bulunurlar [Larche ve ark., 2003; Romagnani, 2000]. Alerjene özgül CD4⁺ T hücreler IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi Th2 tipinde sitokin profili ile alerjik inflamasyonu düzenler [Romagnani, 2000; Umetsu ve Dekruyff, 1997]. İmmün çevrede bu tür Th2 tipinde sitokinlerin yüksek düzeyde bulunması patogenezin

alerjik hastalığa doğru kaymasını sağlar [Broide, 2001; Kay, 2001; Romagnani, 2000].

Kemokin ve inflamatuvar sitokin üretilmesinde ortak yol NF-κB olup, etkin duruma gelmesi ile IL-6, IL-8 ve TNF-α sentezlenmesini sağlamaktadır. Bu yolağı, patojen mikroorganizmalar ve stres uyarmaktadır. NF-κB, apoptozise olan direnci de düzenlemektedir. NF-κB 'nin düzenlenmesi antiinflamatuvar tedavilerde amaç haline gelmiş ve yeni doğal ajanlara ilgi oluşmuştur [Schiffrin ve Blum, 2002].

2.5.6. Laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar etkisi

Laktik asit bakterilerinin immün sistem üzerinde uyarıcı ya da baskılayıcı özelliklere sahip olduğu ve bu özelliklerini GİS epitel hücre yüzeyine tutunarak gerçekleştirdiği bilinmektedir. GİS mukozal immün sistemi kommensal ve yabancı antijenler arasındaki ilişkilerin sonucu oluşan kompleks bir sinyal ağından oluşmaktadır. Bunlar, epitel hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler, goblet hücreleri ve Paneth hücreleridir. Mukozal epitel hücreleri savunma mekanizmalarının oluşmasında önemlidir. Ortamdaki sinyallere; kemokinler ve sitokinler salgılayarak cevap vermektedirler. Salgılanan bu kemokin ve sitokinler doğal ve kazanılmış immün sistem hücrelerinin aktivitesini yönlendirmektedirler [Kaleli, 2007]. Laktik asit bakterilerinin immün sistem üzerindeki etkileri, antikor üretimini ve NK hücrelerinin aktivitesini arttırmak, NF-κB yolağını modüle etmek ve T hücre apoptozisini indüklemekten oluşmaktadır [Maassen ve ark., 2000].

Laktik asit bakterilerinin bağırsak immün uyarımında yer alan önemli mekanizması IgA⁺ B lenfositlerinin klonal olarak yayılması ve kazanılmış immün yanıtıdır. Bu uyarımın önemi, inflamatuvar immün yanıtı arttırmamasıdır. Bu bakteriler, bağırsak homeostazisini korumak için kazanılmış immün cevabın artması ya da baskılanmasını düzenlemektedir [Galdeano ve ark., 2007]. İmmün sistemin uyarılmadan dengenin sağlanması inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve kanser tedavilerinde çok önemlidir [Riedel ve ark., 2006].

Laktik asit bakterileri; M hücreleri ve epitel hücreleri arasında yer alan dendritik hücreler ile etkileşime geçebilmektedirler (Şekil 2.8). Dendritik hücreler bağırsak boyunca bulunan, antijen sunan hücrelerdir. Enterik antijenleri naiv T hücrelerine sunarlar. Böylece T hücre aktivasyonu ve değişimine yol açmaktadır. Dendritik hücreler değişik mikrobiyal suşlar arasında ayırım yapabilme yeteneğine sahiptirler. Mikroorganizmalar dendritik hücreleri stimüle ederler. Bunun sonucunda Th1, Th2, Treg hücre cevabı oluşmaktadır. Probiyotik bakteriler, IL-12 ve IL-10 düzeyini artırarak dendritik hücre maturasyon paternini indüklemektedir. IL-10 üretimindeki artış ile direkt antiinflamatuvar etki oluşmakta ve Treg hücrelerinin jenerasyonu zenginleşmektedir. Böylece probiyotik bakteriler ile dendritik hücreler arasındaki ilişki immün regülasyona neden olmaktadır [Madsen, 2006]. Epitel hücrelere tutunmuş probiyotik bakteriler ya da fragmentleri ise hücre içine alınmaktadır. İlk uyarılan hücreler barsağın lamina propriasında yer alan antijen sunan hücreler (APC), makrofajlar ve/veya dendritik hücrelerdir [Galdeano ve ark., 2007; Bernet ve ark., 1993]. Makrofajlar ya da dendritik hücreler probiyotik bakterileri ya da fragmentlerini fagosite ederek ortama TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinler salgırlar. TNF- α ve IFN- γ salgılanması epitel hücrelerin IL-8 salınmasını uyarak tüm immün hücrelerin harekete geçmesini başlatır. IL-10 sitokini ise sinyal yolağını arttırmak için üretilir. Sindirilen bakteri ya da partikülleri fagositik alanda makrofaj ya da nötrofiller tarafından elimine edilirler. Böylelikle lamina propriada IgA⁺ B hücrelerinin sayısı artar [Bai ve Ouyang, 2006; Macpherson ve Harris, 2004].

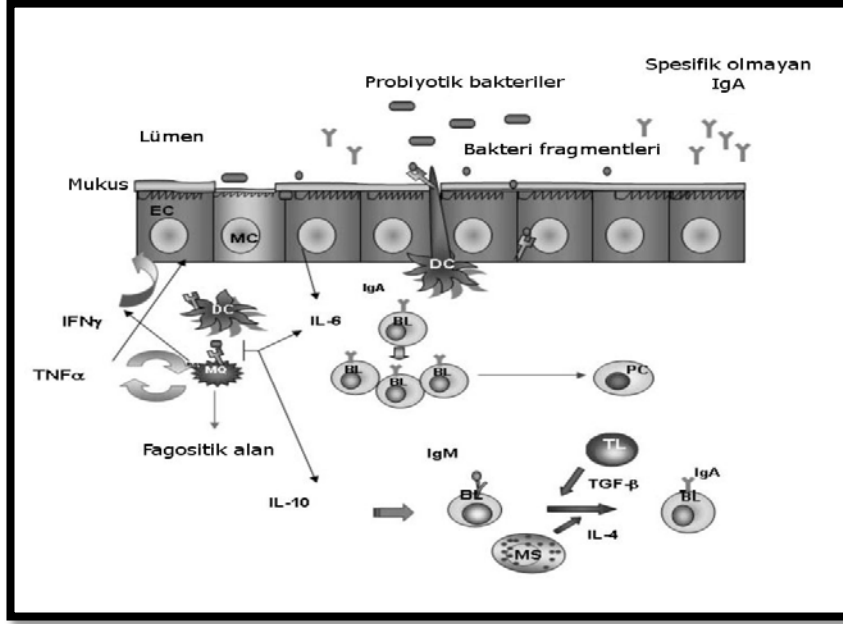
Probiyotik bakteriler sistemik immün yanıtın düzenlenmesinde de etkilidir. Bunu; Peyer plaklarındaki immün hücrelerden biri ile etkileşime girerek gerçekleştirir (Şekil 2.9). Probiyotik uyarımının IgA⁺ döngüsünü tetiklemesi ile IgA⁺ hücrelerinin bağırsaktan uzaktaki mukozal alanlarda sayısının artması sağlanır. IgA⁺ hücreleri mezenterik lenf nodlarına göç eder ve torasik kanal aracılığı ile döngüye katılır ve bronşlar ve meme bezlerine ulaşır. Peyer plaklarındaki probiyotik uyarımı ile salınan sitokinler sistemik immün yanıtı aktif hale getiren kompleks sinyal ağının biyolojik habercileridir [Bai ve Ouyang, 2006; Bernet ve ark., 1993]

Laktik asit bakterileri genellikle IL-10 ve TGF- β gibi intestinal antiinflamatuvar sitokin üretimini arttırırken, TNF- α , IFN- γ , IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin üretimini düşürürler [Morita ve ark., 2002; Maassen ve ark., 2000]. İleoanal anastomozu olan hastalarda probiyotik tedavisi sonucunda, TNF- α ve IL-8 seviyelerinde düşme ile PMNL sayısında azalma görülmüştür [Imaoka ve ark., 2008; Lammers ve ark., 2004]. Probiyotik tedavisi aynı zamanda proinflamasyonu olan hastalarda IFN- γ üretiminde düşmeye, indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentezinde ve jelatinaz aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır [Ménard ve ark., 2004].

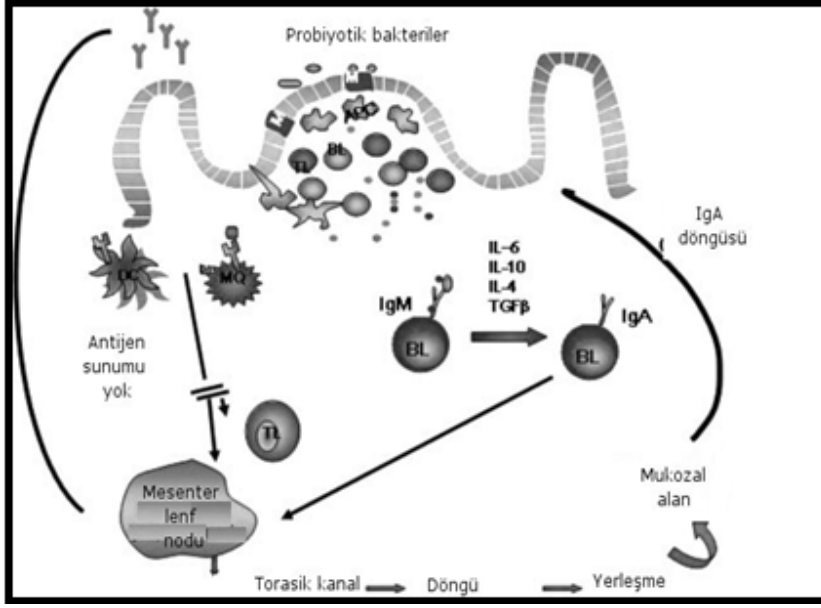
Probiyotikler epitel hücreleri üzerine etki ederek sitokin üretimini değiştirmektedirler. Probiyotik mikroorganizmaların, epitelyal hücreler tarafından IL-8 üretimi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar genellikle patojen bakteriler kullanılarak yapılmıştır. LPS, flagellin ya da peptidoglikan ile uyarılan Caco-2 hücreleri probiyotik mikroorganizmalar ile muamele edilmiş ve IL-8 salınımı değerlendirilmiştir. Gr (+) olan probiyotik mikroorganizmaların ve Gr (-) patojen bakterilere ait hücre komponentlerinin ve kendilerinin IL-8 uyarımını farklı uyardığı gösterilmiştir. Patojen mikroorganizma ve komponentleri IL-8 uyarımını arttırırken probiyotik mikroorganizmalar IL-8 uyarımını azaltmıştır [Lammers ve ark., 2002; Madsen ve ark., 2001].

İlginç olarak probiyotiklerin oral alınması kolondaki bakteri sayısını değiştirmemektedir. Bu sonuçlar probiyotiklerin kolondaki kolonizasyonu değiştirmekten çok immün sistem üzerine etki ettiğini desteklemektedir [Morita ve ark., 2002]. Probiyotik mikroorganizmaların, bağ dokusunda yer alan makrofaj ve T lenfositlerinin aracılığı olmadan bağırsak epitel hücre düzeyinde inflamasyon NF- κ B yolağını inhibe ederek düzenleyebildiği ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu yolağın inhibe edilmesi ile sitokinlerin indüklediği apoptozisi de durdurmaktadırlar [Schiffrin ve Blum, 2002]. Bu mekanizmanın anlaşılması için patojenler ile Caco-2, HT-29 ve periferik kan mononükleer hücrelerinden oluşan bir insan *in vitro* modeli oluşturulmuştur. *L. johnsonii* La1 ve *L. sakei* LTH 681'in bağırsak epitelyal hücreleri ve lökositlerin sitokin salınımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *E. coli* ile kültür edilen Caco-2 hücresinde

proinflamatuvar sitokin olan IL-8'in salınımının arttığı ancak buna karşılık *L. sakei*'nin Caco-2 hücrelerini uyarmadığı tespit edilmiştir. *L. johnsonii* La1'in ise immün düzenleyici özelliğe sahip TGF- β salınımını uyardığı görülmüştür [Brooker ve ark., 2000].



Şekil 2.8. Laktik asit bakterilerinin immün sistem hücreleri ile etkileşimi (MC: M hücreleri; EC: bağırsak epitel hücresi; DC: dendritik hücreler; MQ: makrofaj; TL: T-lenfosit; BL: B-lenfosit; MS: mast hücreleri; PC: plazma hücreleri) [Bernet ve ark., 1993]



Şekil 2.9. Bağırsak ilişkili immün sistemin laktik asit bakterileri tarafından düzenlenmesi (DC: dendritik hücre, MQ: makrofaj; APC: antijen sunan hücre; TL: T-lenfosit; BL: B-lenfosit) [Bernet ve ark., 1993]

H. pylori enfeksiyonunun tedavisinde probiyotiklerin etkileri, salgıladıkları bakteriyosinler ve organik asitler yoluyla *H. pylori*'nin çoğalmasını inhibe etmeleri, epitel hücrelerine bakterinin adezyonunu azaltmaları ve gastrik bariyer stabilizasyonunu arttırmaları yoluyla oluşur [Hamilton-Miller, 2003; Canducci ve ark., 2002]. Klaritromisine dirençli *H. pylori* vakalarında, eradikasyon belirgin olarak zayıflar. Ushiyama ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus gasseri*'nin, hem klaritromisine dirençli *H. pylori*'nin *in vitro* üremesini, hem de epitel hücrelerinden IL-8 salınımını baskıladığını göstermişlerdir. Buna ek olarak, *in vivo* bir fare modelinde *H. pylori* kolonizasyonu, *L. gasseri* ile belirgin olarak azalmıştır [Ushiyama ve ark., 2003].

Hepatik ensefalopati'nin tedavisinde probiyotiklerle ilgili önemli mekanizma; probiyotiklerin hepatik hücrelerdeki inflamasyon ve oksidatif stresi azaltarak, amonyak ve diğer toksinlerin karaciğerden daha etkin bir şekilde temizlenmesine yardımcı olmasıdır. Karaciğerdeki söz konusu hasarlar, karaciğer hücrelerinin normal fonksiyonlarını bozmakta ve mitokondriyal oksidatif strese neden olmaktadır. Böylece karaciğerdeki toksin detoksifikasyonunda azalma meydana gelmektedir.

Probiyotikler intestinal floranın çeşitli yollarla karaciğerde yol açtığı inflamasyon ve hücre hasarına karşı koruyucu rol oynayabilmektedir. Yapılan bir çalışmada oral yolla probiyotik verilen farelerin karaciğerindeki çok sayıda moleküler inflamasyon göstergesinin (NF- κ B ve TNF- α gibi) iyileştiği belirlenmiştir [Solga, 2003]. Model sistemde yapılan bir çalışmada, *L. plantarum* DSM 9843'ün intestinal mikroflorayı düzenlemesi, karaciğer hücrelerinin daha kısa süre zarar görmesini sağlamıştır [Adawi ve ark., 1997]. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda farklı laktobasiller ve bir bifidobakteri türünün bakteriyel translokasyon ve hepatik hücre hasarı üzerine farklı etkileri olduğu gözlenmiştir. *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ve *L. rhamnosus* ile *L. plantarum* kültür karışımları bakteriyel translokasyonu ve hücre hasarını azaltmıştır [Adawi ve ark., 2001].

Probiyotiklerin atopik dermatite neden olan potansiyel alerjen yapıları modifiye ettikleri ve immünojenitelerini düşürdükleri gösterilmiştir. Laktobasil GG suşlarının 5-28 gün süre ile alımının IL-10 düzeyini yükselttiği ve alerjik bulguları azalttığı vurgulanmıştır [Kalliomaki ve ark., 2001]. Probiyotikler TLR modüle etmekte ve dendritik hücre aktivasyonu ile Th2 cevabın oluşumuna yol açmaktadır [Flinterman ve ark., 2007; Taylor ve ark., 2006]. *İn vitro* çalışmalarda alerjik hastalıklarda probiyotiklerin inflamatuvar sitokinleri azalttığı ve intestinal permeabiliteyi düzelttiği görülmüştür [Michail, 2009].

İnflamatuvar bağırsak hastalığının, duyarlı genler, luminal mikroflora ve bozulmuş immün sistem arasındaki karşılıklı etkileşim sonucu ortaya çıktığı öngörülmektedir. Probiyotikler lümeninde; antimikrobiyal aktivite, immün yanıtı uyarır, epitel katında; mukus sekresyonunu artırır, epiteller arası bağlantıları güçlendirir, epitele patojenlerin tutunmasına ve translokasyonuna mani olur, lamina propriada; immün hücrelerin fonksiyonlarını düzenlerler. TNF- α ve IFN- γ sekresyonunu azaltırlar, IL-10 ve TGF- β sekresyonunu artırırlar, Treg hücrelerini uyarırlar, T hücre apoptozisini indüklerler ve dendritik hücre aktivasyonunu regüle ederler [Özden, 2008].

Alerjik rinit tedavisinde probiyotiklerin etkinliği ile ilgili farklı görüşler vardır. Wang ve arkadaşları (2004), 80 perineal rinokonjunktivit çocuk hastaya 30 gün boyunca

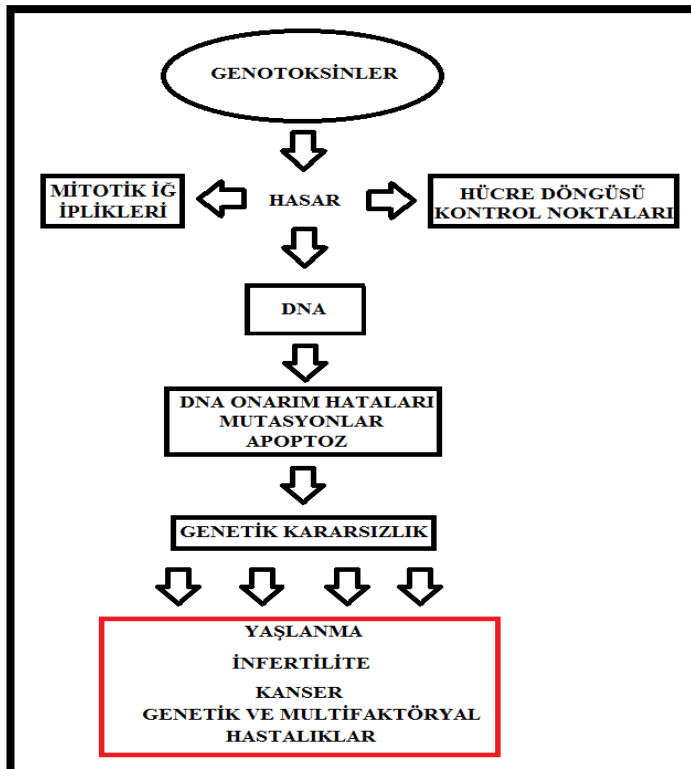
Lactobacillus paracasei vermişlerdir. Tedavi sonucu yaşam kalitesinde belirgin düzelme görülmüştür [Wang ve ark., 2004]. Son yıllarda perineal alerjik rinitli infantlara *Lactobacillus gasseri* TMC0356 suşu içeren fermente sütler verildiğinde, serum IgE düzeyinin azaldığı ve Th1 cevabında artma görülmüştür [Xiao, 2006].

2.6. Genotoksisite-Antigenotoksisite İle Bazı Hastalıklar Arasındaki İlişki

Genotoksisite kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanın genetik materyalde hasar yaratabilme özelliği olarak tanımlanabilir. Bir ajanın genotoksisitesi, birçok değişik hastalıkla sonuçlanabilir ancak, kanser en sıklıkla rastlanılanıdır. Birçok insan karsinojeninin genotoksik olduğu, sağlam verilere dayanmaktadır. Bundan dolayı, kimyasal genotoksisite ve karsinogenezis arasındaki ilişki iyi bağdaştırılmıştır ve genotoksisitenin, kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Karsinogenezite, DNA'daki değişikliklerin, bir hücrenin uygun olmayan şekilde büyümesine ve bölünmesine yol açması anlamına gelir [Wataha, 2000]. Karsinogen ise, biyolojik sistemlerde kanser oluşturan herhangi bir etken için kullanılmaktadır. Bu etkenler kimyasal maddeler, fiziksel etkenler veya virüsler olabilir. Kimyasal karsinogenler spesifik toksik etkilerini insanlarda kanser oluşturarak gösterirler. Bu olaya kimyasal karsinogenezis denir [Vural, 1996]. Karsinogenezite mutasyonlar sonucu oluşur [Wataha, 2000]. Bir maddenin karsinogenik potansiyeli, mutajenik kapasitesi ile yakından ilgilidir [Vural, 1996]. Genotoksisite ve karsinogenezite arasında çok yakın bir ilişkinin ve genotoksik testlerin karsinogenleri tespit etmede etkinliğinin olması, genotoksisite araştırmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [Dolar, 1998].

Canlılarda, kimyasal süreçler özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşması gibi bazı istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan kimyasal türlerdir. Organizmada biyolojik olarak önemli 3 tip serbest radikal vardır. Bunlar; oksijen türleri (süperoksit), hidroksil radikali ve reaktif nitrojen türleridir [Klaunig ve ark., 2010]. Metabolik süreçlerden ya da çevreden gelen radyasyon, sigara, alkol gibi fiziksel uyum ile oksijeni aktive ederek oluşan süperoksit anyonu birincil reaktif oksijen

türleri (ROT) olarak adlandırılırken, oluşan bu anyonların başka moleküller ile etkileşime geçmesi ile oluşan radikallere de ikincil ROT adı verilmektedir [Valko ve ark., 2007]. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller hücrelere ve dolayısıyla da canlıya zarar verebilirler [Soffler, 2007]. Kanserin pek çok tipi, serbest radikaller ve DNA arasındaki mutasyonla sonuçlanan reaksiyonlar sonucu hücre döngüsünün bozulmasına bağlı olarak oluşmaktadır. Damar sertliği gibi yaşlanma belirtileri ve karaciğerde alkolle indüklenmiş hasar, organizma tarafından üretilen çeşitli kimyasalların serbest radikaller ile oksidasyonuna bağlı olarak oluşmaktadır. Serbest radikaller aynı zamanda, doku hasarı, diyabet, infertilite, kalp-damar hastalıkları, alzheimer hastalığı, parkinson, omurilik hasarları ve epilepsi gibi nörolojik hastalıklarda da rol almaktadır [Mateuca ve ark., 2006]. (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar sonucu meydana gelen hastalıklar [Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011]

DNA üzerinde hasarlara yol açan genotoksik maddelerin etkinliğini azaltan ya da tamamen yok eden maddeler genel olarak antigenotoksik ya da antimutajenik maddeler olarak adlandırılmaktadırlar. Antigenotoksik maddeler etki şekillerine göre

biyoantimutajenler ve desmutajenler olarak iki grup altında toplanırlar. Biyoantimutajenler doğal olarak ortaya çıkan ve mutasyonu DNA onarımı ve replikasyonu sürecinde müdahale ederek baskılayan maddelerdir. Biyoantimutajenler mutasyon sürecini değiştirdiklerinden dolayı gerçek antimutajenler olarak adlandırılırlar [Kuroda, 1990]. Desmutajenler ise genotoksik maddeleri kimyasal ya da enzimatik modifikasyonlara uğratmak suretiyle inaktive ederler ve mutasyon oranını DNA onarımı veya replikasyonu dışında kalan mekanizmalarla indirgeyen maddelerin tümü olarak tanımlanırlar [Kohlmeier ve ark., 1995]. Bu mekanizmalar arasında enzim indüksiyonu, mutajen süpürülmesi veya mutajen aktivasyonunun baskılanması sayılabilir. Bilinen desmutajenlerin sayısı biyoantimutajenlere oranla çok daha fazladır. Desmutajenler mutantların ortaya çıkmasını baskırlar ancak bu etkiyi biyoantimutajenlerin aksine genetik materyali etkilemeksizin gösterirler. Bu etki, temel olarak normal hücrelere ulaşan mutajen miktarının düşürülmesi ve bunun sonucunda da hücre başına düşen hasarlı DNA oranının azaltılması ile gerçekleştirilir [Ferguson, 1994].

2.6.1. Laktik asit bakterilerinin antigenotoksik etkisi

Probiyotiklerin kansere karşı koruyucu özellikleri için daha fazla doğrudan kanıt, hayvanlarda ya da hücre kültürlerindeki mutasyonlar ve DNA hasarını önlemek için kültürlerin yeteneği değerlendirilerek elde edilmiştir. Mutasyonların indüklenmesinde laktik asit bakterilerinin etkileri çeşitli model karsinojenler ile Ames *Salmonella* testi kullanılarak *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Aflatoksin B1, N-metil N-nitrozüre heterosiklik aminler, N-nitroz bileşikler, N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin (MNNG) içeren karsinojenler kullanılmıştır. Tüm sonuçlar göstermektedir ki çeşitli laktik asit bakterileri *in vitro* koşullarda besinlerdeki karsinojenlerin genotoksik etkisini inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun derecesi büyük ölçüde türlere bağımlıdır. Örneğin; Pool-Zobel ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışmada, *L. casei* ve *L. lactis*'in nitrozlanmış etin mutajenik aktivitesini % 85 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Ancak, *L. confusus* (*Weissella confusa*) ve *L. sake* hiçbir etki göstermemiştir [Zhang ve Ohta, 1991; Bolognani ve ark., 1997]. *In vivo* koşullarda böyle bir mekanizma faaliyeti, bağlanmanın yüksek pH'ya bağımlı

olması, bağlanmanın kolayca tersine dönmesi ve bağırsaktan karsinojenlerin alımını etkilememesinden kaynaklı olarak sorgulanabilir. Karaciğerde de mutajenite üzerine *in vivo* koşullarda belirgin bir etkisi saptanamamıştır [Bolognani ve ark., 1997]. Pool-Zobel ve arkadaşları (1996), Comet assay tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada MNNG ya da 1,2-dimetilhidrazin karsinojenleri ile muamele edilen farelerin kolon mukozasındaki DNA hasarını çeşitli laktik asit bakterilerinin inhibe etme yeteneğinde olduklarını bulmuşlardır. Laktobasil ve Bifidobakterilerin tüm suşları test edilmiştir (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *B. breve*, *B. longum*). Suşların MNNG ile indüklenmiş DNA hasarını, karsinojenden 8 saat önce 10^{10} hücre/kg vücut ağırlığı dozunda verildiğinde önledikleri tespit edilmiştir. Ayrıca *L. acidophilus* 606'dan elde edilen çözünebilir polisakkaritlerin de antiproliferatif aktivitesi gösterdiği ve HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklediği bulunmuştur [Choi ve ark., 2006]. *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* ve *S. thermophilus* suşlarının HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve canlılığı düşürdüğü belirlenmiştir [Ewaschuk ve Dieleman, 2006]. *L. plantarum* ve *Bifidobacterium* Bb12 suşunun fekal su ekstraktı tarafından indüklenen DNA hasarını önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir [Burns ve Rowland, 2004]. *Lactobacillus* cinsine ait suşların yüksek oranda (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. plantarum*) 4-nitroquinolin N-oksit'in (4-NQO) mutajenitesi üzerine inhibitör etki gösterdikleri tespit edilmiştir [Caldini ve ark., 2005]. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC19258'in bağırsak 407 hücrelerini, H₂O₂ oksidanının genotoksik etkisine karşı koruduğu bulunmuştur [Ou ve ark., 2006]. Buna ilaveten genotosik etkileri indükleyen karsinojenleri laktik asit bakterilerinin önlediği bulunmuştur [Wollowski ve ark., 2001]. Bunun yanı sıra *in vitro* koşullarda bakteri hücrelerinin mutajenlere bağlanması deneyleri, tanımlanmış 31 türden 3 *S. lactis* subsp. *cremoris* türünün güçlü desmutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Laktik asit bakterilerinin bu koruyucu etkileri doza bağlıdır. MNNG ile indüklenmiş DNA hasarını düşürmede *L. acidophilus*'un % 50 ve % 10'luk dozları orjinal dozdan daha az etkilidir. Isı ile muamele edilen *L. acidophilus*'un antigenotoksik potansiyeli ortadan kalkmıştır. Canlı hücrelerin önemini bu çalışma göstermektedir. DNA hasarı yapan ajan olarak 1,2-dimetilhidrazin verilen farelerde laktik asit bakterisi suşları test

edildiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bütün laktobasil ve bifidobakteriler kolon mukozasındaki DNA hasarını önemli ölçüde inhibe etmişlerdir. Fakat *S. thermophilus* daha az etkilidir. Antigenotoksik etkiler suş farklılığına dayanır. *S. thermophilus*'un 3 suşundan ikisi etkisizken, birisi DNA hasarına karşı koruma göstermiştir [Rowland ve ark., 1998].

H₂O₂ gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmalarda kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar etkilerini genel olarak radyasyon ya da bir kimyasala maruz kalma sonucunda oluşan, düzensiz oksijen türevlerine elektron vermek suretiyle gösterirler [Somogyi ve ark., 2007]. Antioksidan desmutajenlerin en iyi bilinenlerinden biri de probiyotiklerdir.

Gastrointestinal sistem içerisinde oksidan/antioksidan reaksiyonları denge halinde sürekli oluşmaktadır. Bu dengenin çeşitli dış (yanlış beslenme alışkanlıkları, radyasyon, kemoterapi ilaçları, uzun süreli antibiyotik kullanımı vb.) ve iç etkenler (bozulmuş mikroflora, inflamasyon vb.) ile bozulması halinde kanser, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, karaciğer bozuklukları gibi ciddi hastalıklara yol açmaktadır [Ross, 1998].

Oksidatif hasar kanser, siroz, damar sertliği, artritlerin oluşması ile ilişkili olup, meydana gelmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Organizmada enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz vb.) ve enzimatik olmayan (β -karoten, α -tokoferol) savunma sistemleri bulunmasına rağmen bu sistemler hasarı önleyecek kadar etkin olamayabilmektedirler. Değişik birçok sentetik rapor edilmiş olmasına rağmen, bunların güvenilirliği ve uzun süreli kullanımı hakkında olumlu görüşler bildirilmemiştir. Bundan dolayı doğal antioksidanlar daha çok tercih edilmektedir. Laktik asit bakterilerinin pek çoğu oksijen radikallerine direnebilmekte ve süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti indirgemektedirler [Kullisaar ve ark., 2002]. Bu mekanizmada laktik asit bakterilerinde genel olarak bulunan sistemin, süperoksit dismutaz ve yüksek konsantrasyonlarda bulundukları +2 değerlikli mangan (Mn^{2+}) olduğu bildirilmiştir. Laktobasillerin bazı türlerinin H₂O₂'i yüksek oranlarda

degrade edebilen hem bağımlı katalaz üretebildikleri rapor edilmiştir. Bazı laktik asit bakterileri aynı zamanda, glutasyon ve tiyoredoksin gibi enzimatik olmayan antioksidan sistemlerine de sahiptir [Wang ve ark., 2012].

2.7. Klinik Uygulamalarda Probiyotiklerin Destek Materyali Olarak Kullanım

Alanları

Probiyotikler rotavirüse bağıli diyare, alerjik hastalıklar (atopik dermatit, alerjik rinit), *H. pylori* enfeksiyonu ile inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (ülseratif kolit, Crohn hastalığı) tedavisi ve önlenmesinde, diyabet başlama yaşını artırmada, irritabl kolon semptomlarını, kolon kanseri oranını azaltmada ve serum kolesterolünün düşürülmesinde etkilidirler. Ayrıca sepsise bağıli pankreatitin ve majör cerrahi sonrası oluşan sepsisin şiddeti ve insidansını azaltmakta etkili oldukları saptanmıştır [Yeşilova ve ark., 2010; Burns ve Rowland, 2000].

Şase, kapsül, damla ve çiğneme tableti şeklindeki preparatlar; antibiyotik kullanımı ile ortaya çıkan yan etkileri azaltmak, bağırsak mikroflorasını düzenleyerek bariyer etkisini güçlendirmek, belirli maddelerin sindirimine katkıda bulunmak, belirli vitaminleri sentezlemek, sindirim mukozasının fonksiyonunun iyi bir şekilde devamlılığını sağlamak, organizmanın diğeri mikrofloralarını düzenlemek: vajina, ağız, belirli alerjenlere verilen yanıtı düzenlemek, organizmanın savunma sistemini uyarmak (immün sistem) gibi birçok fonksiyona sahiptir. Bunun yanı sıra probiyotikler inflamatuvar bağırsak hastalıkları, irritabl kolon semptomlarında ve *H. pylori* enfeksiyonunda adjuvan olarak kullanılmaktadır [Kaur ve ark., 2002]. Son yıllarda probiyotik bakterilerde genetik değışiklikler yapılarak, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir ürünlerin sentez ve sekrete edilmesi gündemdedir. *Lactococcus lactis*'deki timidilat sentetaz geni, sentetik insan IL-10 geni ile yer değıştirilerek timidilat sentetaz negatif, insan IL-10 pozitif *Lactococcus lactis* suşu elde edilmekte, bu da IL-10 salgılamaktadır. Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 yüksek konsantrasyonda mukoza yüzeyine geçince kolit oluşmasını da önlemektedir. Hayvan deneyleri başarılı sonuç vermiş olsa da modifiye edilmiş bu probiyotikler pilot çalışmalarda etik kurallara uyularak kullanılmaktadır [Özden, 2008]. Yoğurt

tüketimi ile serum kolesterol düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. Probiyotiklerin hangi mekanizma ile serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Düşünülen olası mekanizmalar arasında kolesterolun bakteri hücresi tarafından asimilasyonu, bakteriyel asit hidrolazlar ile safra asitlerinin dekonjugasyonu, kolesterolun bakteri duvarına bağlanması, hepatik kolesterol sentezinin inhibisyonu veya kolesterolun plazmadan karaciğere doğru yön değiştirmesi vardır [Hlivak ve ark., 2005].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş suşlar içerisinde, fizyolojik testleri ve biyokimyasal testleri Analitik Profil İndeks 50 CHL (API, Bio Merieux, France) test kiti ile yapılmış, 16S rRNA/rDNA'na göre moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiş, 6 laktobasil kültürü çalışmaya alınmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış olan suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin antiproliferatif ve antigenotoksik etkileri araştırılmış olup, çalışmanın devamında antiproliferatif ve antigenotoksik etkisiyle öne çıkan 3 laktobasil kültürünün (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*) antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. İzolatların mikroskobik, kültürel, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları ile DNA dizi analizleri Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM) yaptırılmıştır. İzolasyon ve tanımlamalar farklı projeler kapsamında yapıldığı için sonuçlar verilmemiştir. Seçilen suşlar ve izole edildikleri kaynaklar Çizelge 3.1'de verilmiştir. 46/2012-03 kodlu BAP projesinde bu suşlarla çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyon kaynağı ve tür adları

Kodlar	İzolasyon Kaynağı	Tür adı
LB63	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus brevis</i>
GD2	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E9	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LB8	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus casei</i>
GD11	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LB16	Yenidoğan gaitası	<i>Lactobacillus fermentum</i>

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve tamponlar

Bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde, De Man Rogosa and Sharp Broth (MRS, Merck) kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan MRS sıvı besiyeri içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. MRS sıvı besiyeri

Maddeler	g/L
Pepton	10,00
Beef Ekstrakt	10,00
Yeast Ekstrakt	5,00
Glukoz	20,00
Sodyum Asetat	5,00
Tri Amonyum Sitrat	2,00
Magnezyum Sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,20
Manganez Sülfat ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,05
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	2,00
Tween 80	1 mL

Maddeler tartılıp, distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. pH’sı $6,2 \pm 0,02$ ’ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında Agar (Merck) ilave edilmiştir. Besiyeri $121^\circ C$ ’de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Çalışmada kullanılan Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. PBS tamponu içeriği

Maddeler	g/L
Sodyum klorür (NaCl)	8,00
Di potasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	5,20
Di sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	7,10
Potasyum klorür (KCl)	2,00

Maddeler tartılıp, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. pH 7,2 ± 0,02'ye ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada GİS epitel hücrelerine bir model olarak kullanılan kolorektal adenokarsinoma kanser hücre hattı HT-29 (ATCC® HTB-38™) ile kolorektal adenokarsinoma kanser hücre hattı Caco-2 (ATCC® HTB-37™) hücreleri kullanılmıştır. HT-29 hücreleri Hamamatsu Üniversitesi Patoloji bölümünden (Japonya), Caco-2 hücreleri ise Şap Enstitüsü'nden (Türkiye) temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin hazırlanması

Lactobacillus cinsine ait bakterilerin geliştirilmesinde MRS Broth ve MRS Agar besiortamları kullanılmıştır. MRS Broth içinde 37°C'de 18-20 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Çalışmalarda PBS tamponu içersisinde Grant DEN-1 ile Mc Farland 5 (~8,4-8,6 log cfu/mL)'e, spektrofotometrik olarak ise (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments) (600 nm dalga boyunda ~ 0,600 OD) ayarlanmış canlı hücreler kullanılırken, 0,22 µm por çaplı filtreden (PALL Life Sciences) geçirilmiş metabolitler kullanılmıştır [Villarante ve ark., 2011].

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Bakteriler kendileri için uygun besiortamında art arda iki kez aktifleştirilmiştir. 1 mL gliserol (Merck), kapaklı kriyo tüpler içerisinde 121°C'de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. Aktifleştirilen bakterilerden 1 mL alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilip, -20°C ve -80°C'de muhafazaya alınmıştır. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir [Wang ve ark., 2010; Baer ve Ryba, 1992].

3.2.3. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması

Kriyo tüpler içerisinde sıvı azotta (-196°C) stoklanan HT-29 ve Caco-2 hücreleri, hazırlanmadan önce 37°C'de ılık su banyosunda bekletilmiştir. Hücreler daha sonra içerisinde medium bulunan tüplere aktarılmıştır. Canlı hücre sayısının belirlenmesi için, 50 µl tripan mavisi ile 50 µl hücre karışımı thoma lamı üzerine 2 kenardan konulmuş ve inverted mikroskopta toplam 16 kare sayılmıştır. Sayımı yapılan hücreler T25 ya da T75'lik flasklara aktarılmıştır. Flasklar içerisinde HT-29 hücreleri % 10 fetal sıgır serumunda (FBS, Gibco), % 1 penisilin/streptomisin antibiyotiği (Sigma), % 1 L-Glutamin (Sigma) ve % 40 MCDB (Sigma) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, İnvitrogen) besiortamında; Caco-2 hücreleri ise % 10 fetal sıgır serumunda, % 1 penisilin/streptomisin antibiyotiği, % 1 L-Glutamin içeren DMEM vasatında 37°C'de % 5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde geliştirilmiştir (MCO-18AIC, Sanyo). Her 2-3 günde bir besiortamı değiştirilmiştir. Kültür kaplarında % 80-85 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA (Gibco) çözeltisi ile kaldırılarak sayılmış ve 96 kuyulu mikropklara (Costar) 1x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde aktarılmıştır [Wang ve ark., 2010; Morita ve ark., 2002].

3.2.4. Laktik asit bakterilerinin antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

Kültürlerin antiproliferatif etkisinin belirlenmesinde Hong ve arkadaşlarının (2008) kullandığı metot, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Çalışmada WST-1 Cell Proliferation Assay Kit (Cayman) kullanılmış olup, bu kit canlı hücrelerin miktarı hakkında bilgi vermektedir. Canlı hücrelerde mevcut olan hücresel

mitokondriyal dehidrogenaz, tetrazolium tuzu WST-1'in formazana dönüşümünü sağlamaktadır. HT-29 ve Caco-2 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etki, probiyotik mikroorganizmaların kendisi ve hücre kültürü vasatında geliştirilen bakteri kültürünün metaboliti kullanılarak araştırılmıştır. Kültürlerin ürettikleri çözülebilir maddelerin kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için, bakteri kültürleri hücre kültürü vasatında kendileri için uygun olan sıcaklık ve sürede geliştirilmiştir. Bakteri kültürleri, mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması için 30 dk. 3,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve kültür metabolitleri elde edilmiştir. Elde edilen metabolitler hücrelere uygulanmadan önce 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Santrifüj sonrası canlı hücreler 10 dk. 3,000 rpm'de 2 kez steril PBS ile yıkanmıştır. Mikroorganizmanın kendisinin doğrudan etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için, bakteri kültürleri ~8,4-8,6 log cfu/mL'ye ayarlı olarak kullanılmıştır. Elde edilen canlı hücre ve metabolitler hücre kültürü ortamına eklenmiş, her iki hücre hattında da 24 ve 48 saat olmak üzere 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda WST-1 kiti ile antiproliferatif etki belirlenmiştir. Kit ve hücre süspansiyonu karışımı, canlı hücre miktarını belirlemek üzere 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Epoch, Biotek) ölçülmüştür (Resim 3.1). Canlı hücre ve metabolitler ile muamele edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanılmış ve sadece besi ortamından kaynaklanan sitotoksik etki de göz önüne alınarak, kontrole bağlı yüzde (%) ölüm oranı hesaplanmıştır. Deney 5 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçların hesaplanmasında; % Ölüm = $(1 - \frac{\text{Örnek}}{\text{Kontrol}}) \times 100$ formülü kullanılmıştır.



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan mikropalak okuyucu

3.2.5. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu

Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonunda Tsuda ve arkadaşlarının (2008) kullandığı metot, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Laktobasil kültürleri 37°C’de en az iki kez aktiveleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aktiveleştirilmiş bakteriler 600 nm’de ~0,600 optik yoğunluğa ayarlandıktan sonra kendileri için uygun besiortamlarına % 2 oranında aşılansarak 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler 32 g trikloroasetikasit (TCA) (Merck) ile manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılmıştır. Örneklerin metabolitleri 4,000 rpm’de 10 dk. santrifüjlenerek (NF 400, Nuve) toplanmış ve sıvının en az yarısı (yaklaşık 6–8 saat) kontrollü sıcaklık (70–80°C) ve düşük basınçla dönen evaporatörde (BUCHI) uzaklaştırılmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Çalışmada kullanılan evaporatör

Sıvının uzaklaştırılmasından sonra örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuş ve % 96'lık soğuk etil alkol (Merck) ile 12 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 4,000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip ve EPS'ler toplanmıştır. Toplanan EPS'ler 1 mL steril saf suda çözüldükten sonra liyofilizasyon tüplerine alınıp, liyofilizatör cihazında liyofilize edilene kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılmış EPS'ler liyofilizatör cihazında dondurulup kurutularak toz haline getirilmiştir (Resim 3.3). Liyofilizasyondan sonra vial içindeki EPS'ler çalışmaya alınmıştır (Resim 3.4).



Resim 3.3. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı



Resim 3.4. Liyofilizasyon sonrası toz haline getirilen vial içindeki EPS'ler

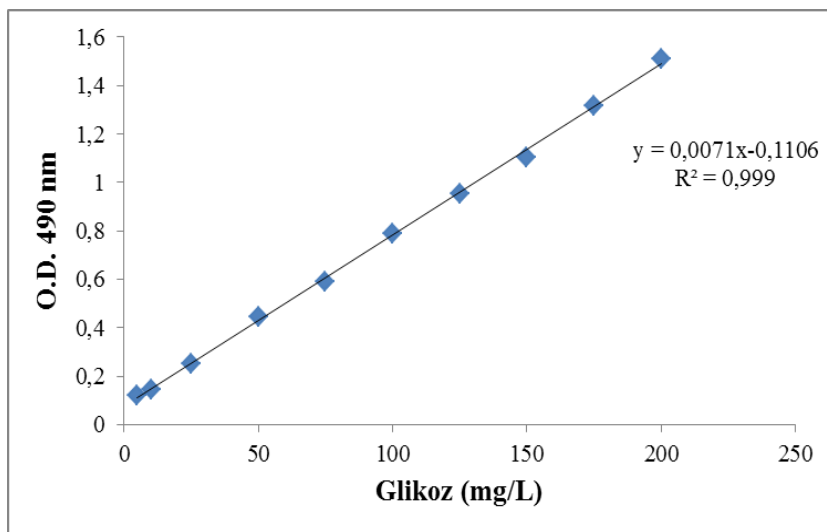
3.2.6. Laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin EPS üretim miktarlarının belirlenmesinde Marshall ve Rawson'nın (1999), metodu kullanılmıştır. Laktobasil kültürleri 37°C'de en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aktifleştirilmiş bakteriler 600 nm'de ~0,600 optik yoğunluğa ayarlandıktan sonra kendileri için uygun

besiortamlarına % 2 oranında aşulararak 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerden 1 mL'lik miktarlar ependorf tüplerine alınarak, 96°C'de 10-15 dk. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. 1 mL'lik örnek üzerine % 85'lik TCA ilave edilerek, 13,000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplanan metabolitler etanol içerisinde 13,000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilerek presipite edilmiştir. Presipite olan örnekler 1mL distile suda çözülmüştür. Çalışmanın devamında, EPS üretim miktarlarının belirlenmesi için Dubois ve arkadaşlarının (1956) fenol sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Bu metot örneklere liyofilizasyon öncesi ve sonrasında uygulanmıştır. Denev 3 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Fenol sülfürik asit metodu

Fenol tüplerindeki örnekler üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL saf sülfürik asit eklenerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30°C'de 15-20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. EPS üretim miktarları, 0-200 mg/L arasında değişen farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz standardına göre hesaplanmıştır [Dubois ve ark., 1956] (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi

3.2.7. EPS'lerin antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

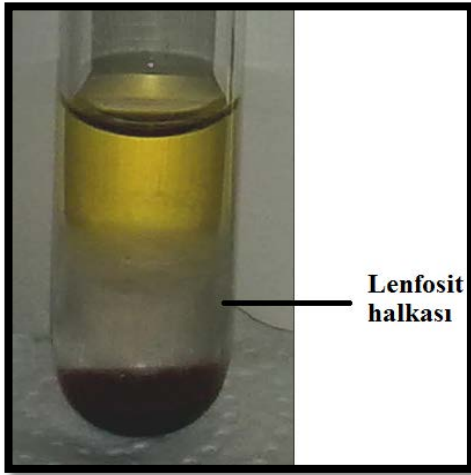
EPS'lerin antiproliferatif etkisinin belirlenmesinde Challouf ve arkadaşlarının (2011) kullandığı metot, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Çalışmada WST-1 kiti kullanılmıştır. HT-29 ve Caco-2 hücreleri 96 kuyulu mikropklarda 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde kültür edilmiştir. Tam yayılma gözlemlendikten sonra hücreler çalışmaya alınmıştır. Liyofilize EPS'ler steril su ile 400, 800 ve 1600 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanıp, 0,45 µm por çaplı filtreden geçirildikten sonra DMEM ile karıştırılıp ortama eklenmiştir. EPS'ler her iki hücre hattında da 24 ve 48 saat olmak üzere 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda WST-1 kiti ile EPS'lerin antiproliferatif etkisi belirlenmiştir. Kit ve hücre süspansiyonu karışımı 450 nm dalga boyunda mikropklak okuyucuda ölçülmüştür. EPS'ler ile muamele edilmemiş hücreler, kontrol grubu olarak kullanılmış ve sadece besiyortamından kaynaklanan sitotoksik etki de göz önüne alınarak, kontrole bağlı yüzde (%) ölüm oranı hesaplanmıştır. Deney 5 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçların hesaplanmasında; % Ölüm = $(1 - \text{Örnek/Kontrol}) \times 100$ formülü kullanılmıştır.

3.2.8. Bakteri kültürleri ile EPS'lerin genotoksik ve antigenotoksik etkisinin belirlenmesi

Lenfositlerin izolasyonu

Kan örnekleri sağlıklı donörlerden damar yoluyla elde edilmiştir. Sağlıklı donörler; herhangi bir hastalığı bulunmayan, sigara, alkol ve rutin ilaç kullanmayan 24-25 yaş arası bireylerden seçilmiştir. Enjektörle donörlerden alınan taze periferik kanın üzerine heparin konularak pıhtılaşması engellenmiştir. Daha sonra kan üzerine eşit miktarda Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) eklenmiş ve süspansiyon edilmiştir. Her bir tüpe 2 mL 1,077 g/mL yoğunluğa sahip lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenmiş ve 4°C'de, 2,400 rpm'de 20 dk. santrifüj (Sigma 3-30K) edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin içerisindeki eritrositlerin üzerinde oluşan beyaz halkanın 2 mL'si alınarak ayrı bir tüpe aktarılmış ve 4°C'de, 2,400 rpm'de 20 dk. D-PBS ile

santrifüj edilerek yıkanmıştır (Resim 3.5). Yıkama işleminden sonra elde edilen lenfositlerin tripan mavisi ile canlılıklarına bakılmış ve çalışma için hücre pelletleri 0,5 mL D-PBS içinde süspansiyon edilmiştir [Mosaffa ve ark., 2006; Park ve ark., 2005].



Resim 3.5. Santrifüj sonrası eritrositlerin üzerinde oluşan beyaz lenfosit halkası

Laktik asit bakterilerinin genotoksik etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmadaki amaç canlı hücre ve metabolitlerin lenfosit hücrelerinin DNA'sında herhangi bir hasar oluşturup oluşturmadığına bakılması yani genotoksik etkisinin belirlenmesidir. Çalışılan her bir bakteri suşu için sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Daha sonra bu lenfosit hücrelerine $\sim 8,4-8,6$ log cfu/mL'ye ayarlı canlı hücre ve 0,22 μm por çaplı filtreden geçirilmiş metabolitler uygulanmıştır. Lenfosit DNA'sında herhangi bir hasar olup oluşmadığına ise comet testi ile bakılmıştır.

EPS'lerin genotoksik etkisinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin genotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan metod, EPS'ler için de geçerlidir. Burada farklı olarak lenfosit hücrelerine steril su ile 800 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanmış ve 0,45 μm por çaplı filtreden geçirilmiş liyofilize EPS'ler uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonunda ependorflar 2,000-

2,400 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip üst kısım atılmış, ancak bu metotda yıkama işlemi yapılmamış ve sonraki işlemlere comet prosedüründeki gibi devam edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin antigenotoksik etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada amaç lenfosit hücrelerinde, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellemede, antiproliferatif etkisi anlamlı bulunmuş canlı hücre ve metabolit konsantrasyonunun etkili olup-olmadığının belirlenmesidir. Lenfosit hücreleri önce 90 dk. belirlenmiş konsantrasyondaki (1. aşamada genotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda) canlı hücre ve metabolitler ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra 15 dk. H₂O₂ (50 µM)'e maruz bırakılmış ve sonraki işlemlere comet prosedüründeki gibi devam edilmiştir. Burada comet prosedüründen farklı olarak yıkama işlemi H₂O₂ ile muameleden sonra yapılmıştır.

EPS'lerin antigenotoksik etkisinin belirlenmesi

EPS'lerin antigenotoksik etkisinin belirlenmesinde, laktik asit bakterilerinin canlı hücreleri ve metabolitlerine uygulanan yöntem kullanılmıştır. EPS'lerin antigenotoksik aktivitesi araştırılırken, genotoksisite çalışmasında lenfositlere herhangi bir hasar vermeyen 800 µg/mL konsantrasyon uygulanmıştır ve comet prosedüründeki diğer aşamalara geçilmiştir.

Comet testi (Tek hücre jel elektroforezi)

Comet tekniği, Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandığı metot bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanırken, detaylarda Noroozi ve arkadaşları (2008) ile Raipulis ve arkadaşlarının (2005) metotlarından yararlanılmıştır. Bu amaçla 0,5 mL D-PBS içinde süspanse lenfositler, ~8,4-8,6 log cfu/ml'ye ayarlı canlı hücre ve 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilmiş metabolitler ile süspanse edilerek, 37°C'de 90 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde ependorflar 2,000-2,400 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip üst kısım atılmış ve 2 kez 1,000 rpm'de 5 dk. D-PBS ile yıkanmıştır. Düşük erime ısıyla agarın (LMA) 75 µl'si, 100 µl lenfositlerle karıştırılıp, önceden

normal erime ısıları agar (NMA) ile kaplanan lamaların üzerine damlatılarak 24x60 mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Bu halde preparatlar 15-20 dk. buzda bekletilmiştir. Lamaların üzerindeki lameller kaldırılıp içerisinde lizis tamponu bulunan şalelere konulmuş ve +4°C'de en az 1 saat bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamalar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka (SciePlus) yerleştirilip, DNA'nın çift iplikli yapısının açılması için 20 dk. bekletilmiştir. Daha sonra 25 V, 300 mA'da 20 dk. elektroforez yapılmıştır (Tanon, EPS 300). Preparatlar, nötralizasyon tamponu (pH 7,5) ile 15 dk. muamele edilmiştir. Nötralizasyon sonrasında preparatlar steril su, % 50, % 75 ve % 99'luk alkol serilerinde 5'er dk. bekletilmiştir. Daha sonra lamaların üzerine 20 µg/mL'lik etidyum bromidin 50 µl'si yayılmış ve 24x60 mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmıştır. Deney 3 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Görüntü analizi ve comet sayımı

Boyanan preparatlar Leica DFC425C (Leica, Germany) marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) altında 40X objektifte incelenmiştir. Her lamda 100-300 hücre, floresan mikroskopunda değerlendirilerek, bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, version 4.0, π Perceptive Instruments Ltd., UK) DNA hasar derecesi kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar % Kuyruk DNA hasarı = $\frac{\text{DNA kuyruk yoğunluğu}}{\text{DNA baş yoğunluğu} + \text{DNA kuyruk yoğunluğu}} \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır [Soltani ve ark., 2009]. Canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin antigenotoksik aktivitesi ise DNA kuyruk yoğunluğundaki düşüşün yüzdesine bakılarak hesaplanmıştır [Sondhi ve ark., 2010].

$$\text{İnhibisyon (\%)} = a - b/a - c \times 100$$

a = H₂O₂ tarafından indüklenen kuyruk yoğunluğu (pozitif kontrol; D-PBS + lenfosit + H₂O₂).

b = Canlı hücre, metabolit ya da EPS ile H₂O₂ varlığında lenfosit kuyruk yoğunluğu

c = Negatif kontrolün kuyruk yoğunluğu (D-PBS + lenfosit)

3.2.9. Laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar etkisinin belirlenmesi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri 96 kuyulu mikropklarda 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde kültür edilmiştir. Tam yayılma gözlemlendikten sonra yeni vasat ile birlikte $\sim 8,4-8,6$ log cfu/mL yoğunluğundaki laktobasil canlı hücreleri hücre ortamına eklenirken, metabolitler 0,22 μ m por çaplı filtreden geçirilip steril edildikten sonra hücre ortamına eklenmiş ve 1 saat 37°C 'de % 5 CO_2 'li inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda 10 ng/mL TNF- α (Millipore) eklenerek hücrelerin IL-8 sitokinini salgılamak üzere uyarılması sağlanmıştır. 24-48 saat inkübe edildikten sonra kültür ortamları toplanarak, IL-8 sitokin seviyeleri ölçülene kadar -20°C veya -80°C 'de bekletilmiştir. Daha sonra sitokin seviyeleri ELISA kit (İnvitrogen) yöntemi ile 450 nm'de mikropklak okuyucuda belirlenmiştir. IL-10 sitokin seviyesinin tespiti için de kullanılan bu metot, çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Kanseri hücreleri TNF- α ile uyarılmadan IL-10 seviyeleri ölçülmüş, daha sonra canlı hücre ve metabolitler uygulanmış ve tekrar IL-10 seviyeleri ölçülmüştür. Deney 5 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır [Gao ve ark., 2012; Bai ve ark., 2004; Lammers ve ark., 2002].

3.2.10. EPS'lerin antiinflamatuvar etkisinin belirlenmesi

EPS'lerin antiinflamatuvar etkisinin belirlenmesi için, 3.2.9'da kullandığımız metot bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. EPS'lerin HT-29 ve Caco-2 hücrelerinden salınan IL-8 ve IL-10 sitokin seviyelerine etkisi araştırılmıştır. EPS'ler 800 μ g/mL olacak şekilde ayarlanmış ve 0,45 μ m por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. 24-48 saat inkübasyondan sonra sitokin seviyeleri ELISA kit yöntemi ile 450 nm'de mikropklak okuyucuda belirlenmiştir. Deney 5 paralelli 3 tekrarlı olarak yapılmıştır [Wu ve ark., 2010; Palencia ve ark., 2009].

3.2.11. İstatiksel analizler

İstatiksel analizlerde SPSS Inc Software (16.0 versiyon; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Kendall tau ve Spearman'ın korelasyonuna göre, suşların

antiproliferatif-antiinflamatuvar ve antiproliferatif-antigenotoksik aktivite oranları arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca suşların EPS üretimi ile antiproliferatif, antigenotoksik ve antiinflamatuvar aktivite oranları arasında ilişki olup olmadığı incelenmiştir.

Antiproliferatif ve antiinflamatuvar çalışmalarında suşlar arası farka tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Kruskall Wallis testi ile bakılmıştır. Kruskall Wallis testine göre antiproliferatif çalışmasında 6 farklı suştan, antiinflamatuvar çalışması için ise 3 farklı suştan elde edilen ölçümler değerlendirilmiştir. Aynı şekilde EPS çalışmalarında da örnekler arası fark Kruskall Wallis testi ile ortaya konulmuştur.

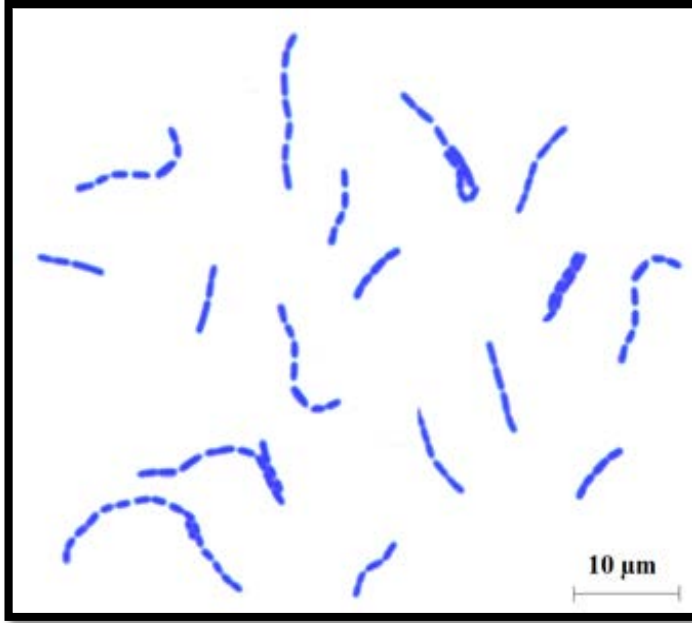
Tek hücre jel elektroforez deneyinde, lenfositlerde DNA hasarının istatistiksel değerlendirmesi Kruskall Wallis testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar negatif kontrol (D-PBS+lenfosit) ve pozitif kontrol (H_2O_2 +lenfosit+D-PBS) ile karşılaştırılmıştır.

Tüm çalışmalar her çalışma için paralel sayısı değişmekle beraber, üç tekrarlı yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

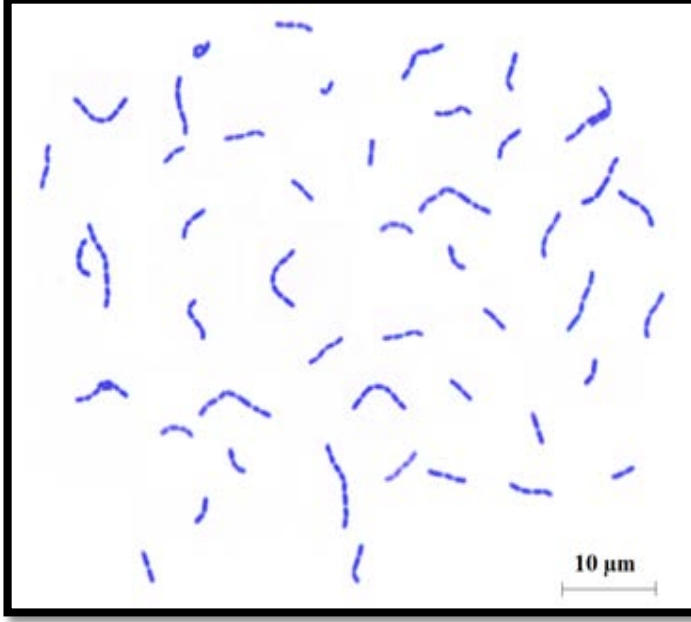
4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş, *Lactobacillus* cinsine ait 6 farklı suş çalışmaya alınmıştır. Bu çalışma için, daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış olan suşlar tercih edilmiştir. Suşların mikroskopik, kültürel, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları farklı projeler kapsamında yapıldığı için sonuçlar tezde verilmemiştir. Suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin antiproliferatif ve antigenotoksik etkileri araştırılmış olup çalışmanın devamında antiproliferatif ve antigenotoksik etkisiyle öne çıkan 3 laktobasil türüne ait suşun (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*) antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Çalışmalarda en iyi sonuç veren *L. brevis* LB63 ve *L. rhamnosus* GD11 suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri Resim 4.1 ve Resim 4.2'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. *Lactobacillus brevis* LB63 bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü

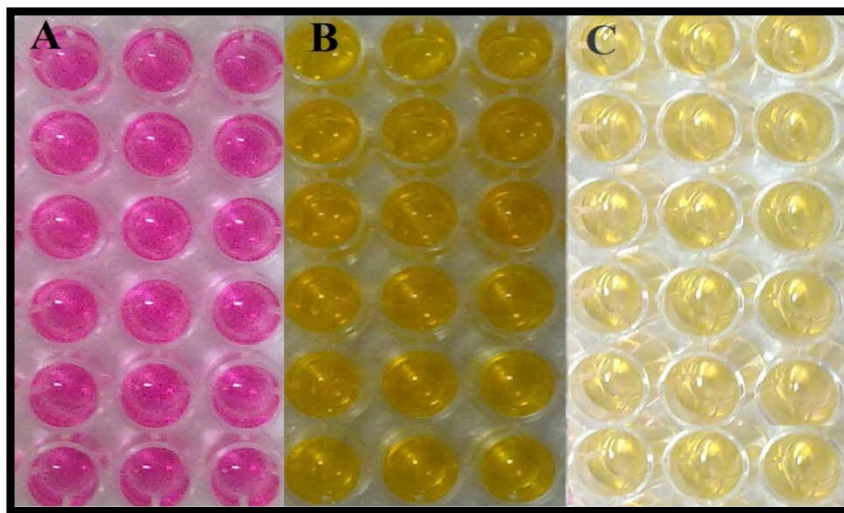


Resim 4.2. *Lactobacillus rhamnosus* GD11 bakterisinin ışık mikroskobu görüntüsü

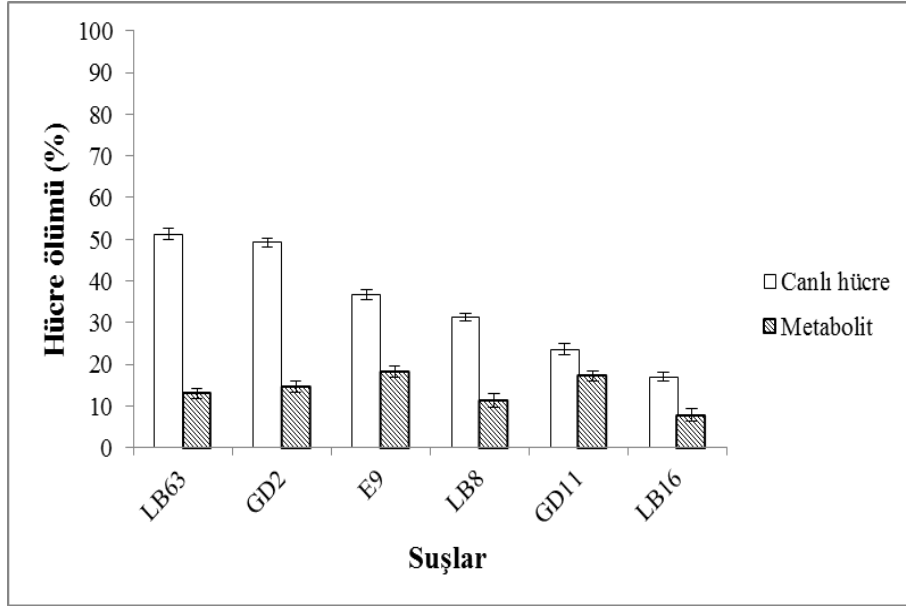
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antiproliferatif Etkisi

Çalışmada antiproliferatif aktivite WST-1 kiti ile belirlenmiştir (3.2.4). Uygulamada kullanılan kontrol grubu için, medium içerisine kanser hücreleri eklenmiştir. Kontrol grubuna hücre canlılığını belirleyen, bir tetrazolium tuzu olan WST-1 eklenmediğinde herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı gözlenmiştir. Aynı kontrol grubuna WST-1 eklendiğinde ise, mevcut canlı kanser hücreleri WST-1'i renkli formazana dönüştürmüştür. Oluşan rengin tonu mikroplaklarda bulunan canlı hücrelerin yoğunluğuna göre değişmektedir. Mevcut canlı kanser hücrelerinin yoğunluğu, bakteri canlı hücresi ya da metabolitlerin eklenmesi ile azalmaktadır. Buna bağlı olarak WST-1'in formazana dönüşümü azalmakta ve rengin tonu açılmaktadır (Resim 4.3). Çalışmada $\sim 8,4-8,6$ log cfu/mL yoğunlukta canlı hücrelerin ve bakteriler tarafından sentezlenmiş metabolitlerin etkisine bakılmıştır. Hem metabolit hem de canlı hücrelerde antiproliferatif etki gözlenmekle birlikte, canlı hücrelerin aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. HT-29 hücre hattında canlı hücreler 24 saat, metabolitler 48 saat inkübasyon sonrası daha etkili olurken, Caco-2 hücre hattında canlı hücre ve metabolitler 48 saat inkübasyon sonrası daha etkili olmuştur. Bakteri kültürlerinin (canlı hücre ve metabolit) HT-29 hücre hattında,

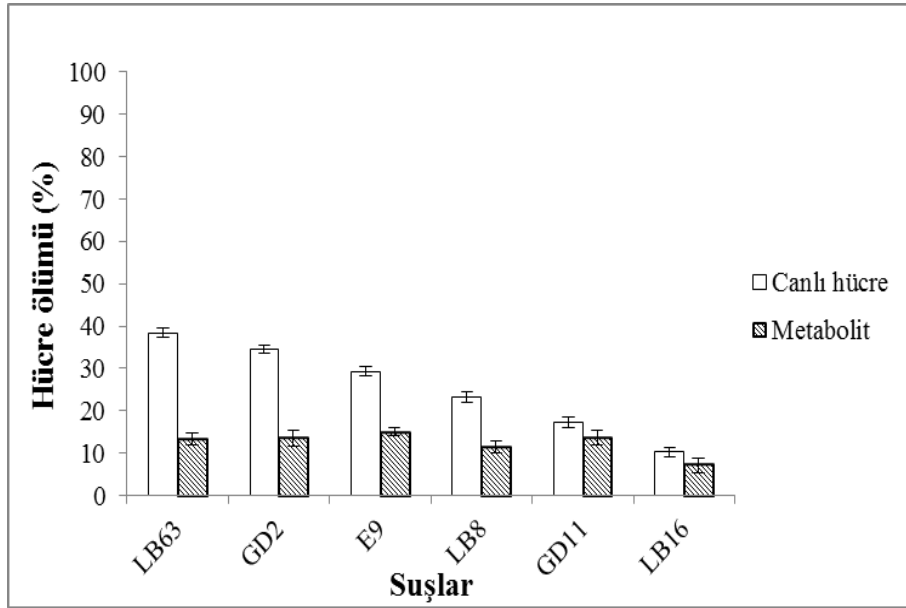
Caco-2 hücre hattına göre daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). HT-29 hücre hattı ile yapılan çalışmada en yüksek etki, *L. brevis* LB63 suşunun (% 51,2 ± 1,4 hücre ölümü), *L. plantarum* GD2 suşunun (% 49,2 ± 1,1 hücre ölümü) ve *L. rhamnosus* E9 suşunun (% 36,8 ± 1,2 hücre ölümü) canlı hücrelerinden elde edilmiştir. Caco-2 hücrelerinde ise, LB63 suşunun (% 38,4 ± 1,0), GD2 suşunun (% 34,5 ± 0,9) ve E9 suşunun canlı hücreleri (% 29,3 ± 1,0) ölü hücre oranı ile belirgin bir antiproliferatif etki göstermiştir ($p<0,05$). Suşların her iki hücre hattında da metabolitlerinin canlı hücrelerine göre daha düşük etkili olduğu görülmüştür. Metabolitlerin uygulandığı, HT-29 hücre hattında en yüksek etkiyi E9 suşu (% 18,3 ± 1,4), *L. rhamnosus* GD11 suşu (% 17,3 ± 1,2), GD2 suşu (% 14,7 ± 1,4) ve LB63 suşu (% 13,0 ± 1,3) göstermiştir. Caco-2 hücrelerinde metabolitlerin etkisi ise, E9 suşu (% 15,0 ± 0,9), GD11 suşu (% 13,7 ± 1,6), GD2 suşu (% 13,6 ± 1,8) ve LB63 suşu (% 13,4 ± 1,3) olarak tespit edilmiştir. Örnekler arasında anlamlı fark olup olmadığı veri sayısı dikkate alınarak incelenmiş ve non parametrik testlerden Kruskal Wallis testi ile karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlara göre en yüksek ölçümlerin bulunduğu örnek *L. brevis* olurken, en düşük ölçümlerin bulunduğu örnek *L. fermentum*'dur ($p<0,05$).



Resim 4.3. WST-1 kiti ile mikrobiyal canlılık testi sonuçları A) Kontrol grubu (Kit muamelesinden önce kanser hücresi) B) Kit ile muamele edilmiş kontrol grubunda canlılığı gösteren renk değişimi C) Kit ile muamele edilmiş deney grubunda (bakteriyel canlı hücre) canlılığı gösteren renk değişimi



Şekil 4.1. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin HT-29 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi



Şekil 4.2. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin EPS Üretme Kapasiteleri

6 laktobasil suşunun EPS üretimleri 3.2.6.'da verilen metoda göre tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada tüm suşlarda EPS üretimi gözlenmiş, ancak suşlara bağlı olarak

üretileen EPS miktarlarında farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Yüksek EPS üreten suşlar GD11 ($200,1 \pm 4,1$ mg/L), E9 ($186,2 \pm 3,2$ mg/L), GD2 ($146,3 \pm 2,4$ mg/L), LB63 ($132,2 \pm 2,0$ mg/L) iken düşük EPS üreten suşlar *L. casei* LB8 ($59,1 \pm 2,2$ mg/L) ve *L. fermentum* LB16 ($52,4 \pm 2,4$ mg/L) olarak belirlenmiştir. Yüksek EPS üreten suşların saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası EPS miktarları da ölçülmüş olup bunlar, suşların EPS üretme miktarları ile beraber Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS miktarları

Kodlar	Tür adı	EPS ¹ (mg/L)	EPS ² (mg/L)
GD11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$200,1 \pm 4,1$	$302,1 \pm 5,2$
E9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$186,2 \pm 3,2$	$279,2 \pm 4,3$
GD2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$146,3 \pm 2,4$	$221,3 \pm 5,0$
LB63	<i>Lactobacillus brevis</i>	$132,2 \pm 2,0$	$199,1 \pm 4,2$

¹ Kültürlerin inkübasyon sonrası EPS üretim miktarı

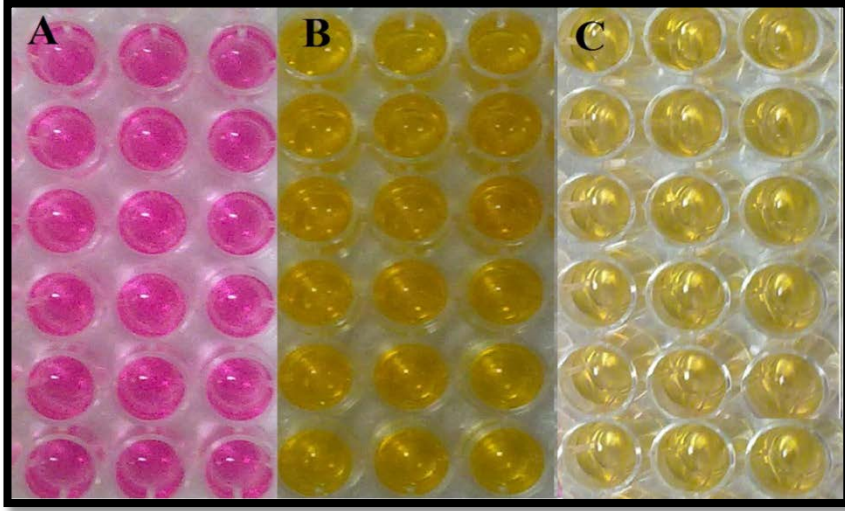
² Saflaştırılmış ve dondurulup kurutulmuş toz halindeki EPS’nin miktarı

4.4. EPS’lerin Antiproliferatif Etkisi

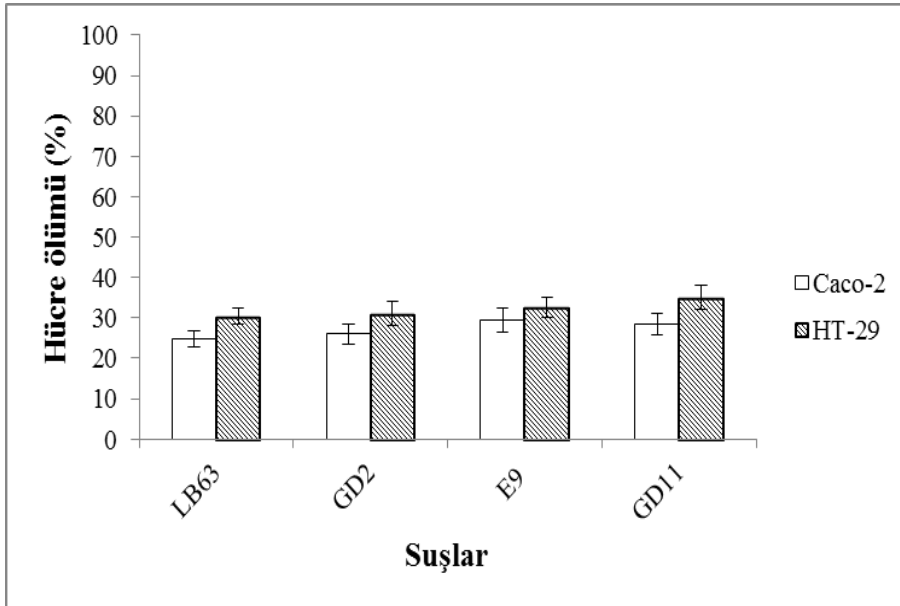
Çalışmada antiproliferatif aktivite WST-1 kiti ile hücre yüzde ölümü esas alınarak belirlenmiştir (3.2.7). Farklı suşların EPS’lerinin uygulanmalarına bağlı olarak, her iki kanser hattında da, hücrelerin canlılığında azalma gözlenmiştir. Canlı hücrelerin azalmasıyla, WST-1’in formazana dönüşümü de azalmış ve rengin tonu açılmıştır. Bu uygulamada, bakterilerin canlı hücrelerinin kullanıldığı uygulamadan daha yoğun bir renk tonu elde edilmiştir. Bu da EPS’nin bakteri canlı hücrelerine göre daha az antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Resim 4.4). Liyofilize EPS’ler steril su ile 400, 800 ve 1600 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanılmıştır. EPS’ler HT-29 hücre hattında 24 saat, Caco-2 hücre hattında 48 saat inkübasyon sonrası daha etkili olmuştur. Liyofilize EPS’ler ile yapılan konsantrasyon denemelerinde 400 µg/mL’den 800 µg/mL’ye kadar bazı EPS’lerin yüksek antiproliferatif etki gösterdiği ancak 1600 µg/mL konsantrasyonda antiproliferatif

etkide anlamlı bir artışın olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmaya en iyi sonucu elde ettiğimiz 800 µg/mL konsantrasyonla devam edilmiştir. EPS'ler canlı hücrelerden daha düşük antiproliferatif etki göstermelerine rağmen, metabolitlerden daha yüksek antiproliferatif etki göstermiştir. Ayrıca, canlı hücrelerde olduğu gibi EPS'lerin de HT-29 hücre hattında, Caco-2 hücre hattına göre daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3). HT-29 hücre hattı ile yapılan çalışmada en yüksek etkiyi GD11 suşu (% 35,1 ± 3,0 hücre ölümü) ve E9 suşunun (% 32,7 ± 2,5 hücre ölümü) gösterdiği tespit edilmiştir. Caco-2 hücrelerinde ise, E9 suşu (% 29,4 ± 3,0 hücre ölümü) ve GD11 suşu (% 28,4 ± 2,75 hücre ölümü) ölü hücre oranı ile belirgin bir antiproliferatif etki göstermiştir. Yüksek konsantrasyonda EPS üreten suşların EPS'leri, her iki hücre hattında da en yüksek antiproliferatif etkiyi göstermiştir. 4 suşdan elde edilen EPS'ler kontrole göre anlamlı bir antiproliferatif etki göstermiştir ($p < 0,05$). Buna rağmen, suşlara göre elde edilen ölçümler farklılaşmamaktadır ($p > 0,05$).

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, her iki kanser hücre hattında da suşların canlı hücrelerinin, metabolitlerinin ve EPS'lerinin belirgin bir antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. İki kanser hücre hattı karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar, HT-29 kanser hücre hattından elde edilmiştir. Suşlara ait canlı hücreler, metabolitler ve EPS'ler antiproliferatif aktivitelerine göre kıyaslandığında ise, en iyi aktivitenin canlı hücrelere ait olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.4. WST-1 kiti ile mikropatlaklarda bulunan kanser hücrelerinde canlılığın tespiti A) Kontrol grubu (Kit muamelesinden önce kanser hücresi) B) Kit ile muamele edilmiş kontrol grubunda canlılığı gösteren renk değişimi C) Kit ile muamele edilmiş deney grubunda (EPS) canlılığı gösteren renk değişimi



Şekil 4.3. Dört farklı suşun EPS'lerinin Caco-2 ve HT-29 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi

4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Genotoksik Ve Antigenotoksik Etkisi

Çalışmamızda *Lactobacillus* cinsine ait 6 bakterinin canlı hücre ve metabolitlerinin insan lenfositleri üzerinde olası genotoksik ve H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarını önleyici antigenotoksik etkileri comet yöntemiyle incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Laktik asit bakterilerinin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisi

Muamele	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk momenti	Kuyruk yoğunluğu (%)
Negatif kontrol ¹	27,9 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pozitif kontrol ²	58,2 ± 1,6	14,3 ± 0,5	42,6 ± 1,9
LB63 canlı hücresi	29,8 ± 1,6	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
GD2 canlı hücresi	31,4 ± 0,8	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
E9 canlı hücresi	27,1 ± 0,9	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LB8 canlı hücresi	28,6 ± 1,4	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
GD11 canlı hücresi	28,3 ± 1,3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LB16 canlı hücresi	27,8 ± 1,2	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LB63 metaboliti	27,8 ± 1,6	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
GD2 metaboliti	30,4 ± 1,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
E9 metaboliti	29,1 ± 0,9	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LB8 metaboliti	26,6 ± 1,4	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
GD11 metaboliti	28,2 ± 1,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LB16 metaboliti	28,8 ± 1,6	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0

¹ Negatif kontrol, D-PBS ve lenfosit içerir. H₂O₂, canlı hücre ve metabolit ile muamele yapılmamıştır.

² Pozitif kontrol, D-PBS, lenfosit ve 50 µM H₂O₂ içerir. H₂O₂ uygulanarak, genetik hasar yaratılmaya çalışılmıştır.

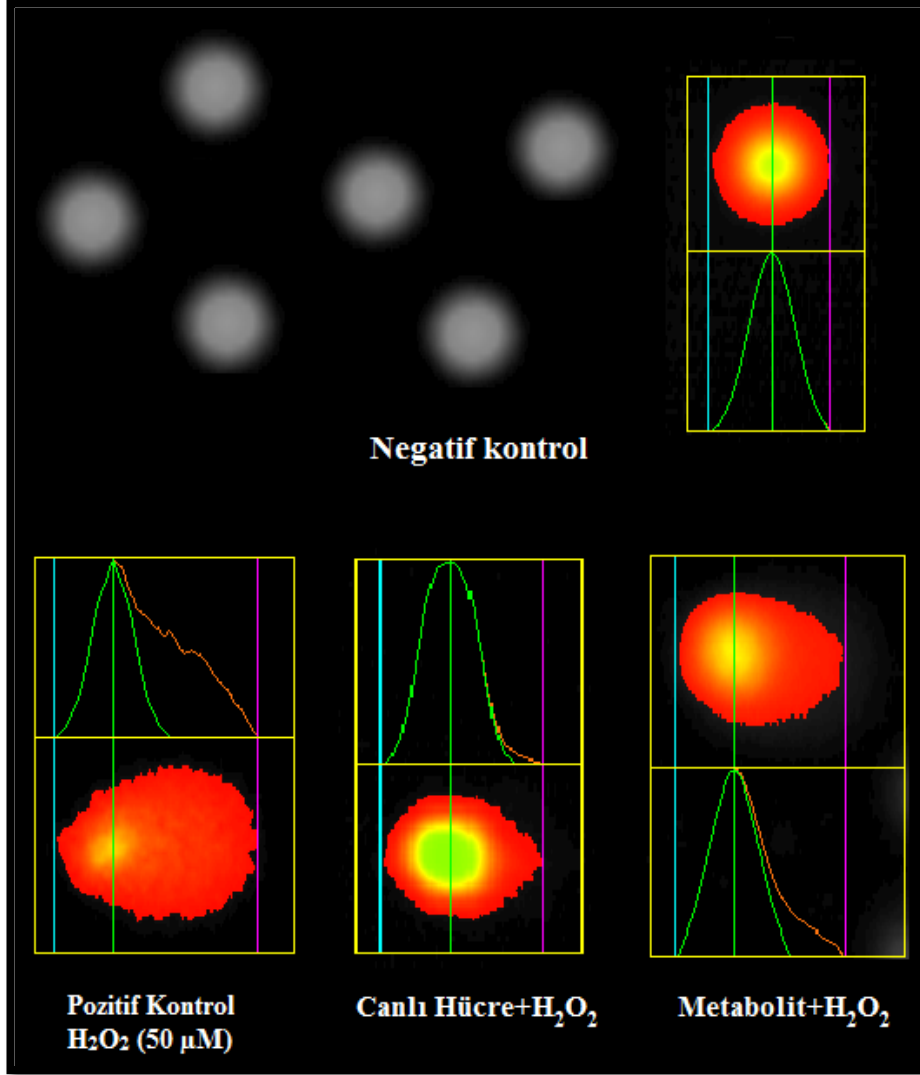
Canlı hücre ve metabolitlerin genotoksik etkisi incelendiğinde, suşların herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmiştir. H₂O₂ muamelesi sonucu oluşan hasarlı lenfositlerde kuyruk yoğunluğu % 42,6 ± 1,9 iken, sadece canlı hücre veya metabolitler ile muamele edilmiş lenfositlerde % 0,1 ± 0,0 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Laktik asit bakterilerinin H₂O₂ ile muamele edilmiş insan lenfositleri üzerindeki antijenotoksik etkisi

Muamele	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk momenti	Kuyruk yoğunluğu (%)
Negatif kontrol ¹	27,9 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pozitif kontrol ²	58,2 ± 1,6	14,3 ± 0,5	42,6 ± 1,9
LB63 canlı hücresi + H ₂ O ₂	29,8 ± 1,1	7,3 ± 0,7	22,2 ± 0,9
GD2 canlı hücresi + H ₂ O ₂	31,1 ± 1,7	7,6 ± 0,5	23,0 ± 0,7
E9 canlı hücresi + H ₂ O ₂	33,5 ± 1,6	8,2 ± 0,6	24,7 ± 1,1
LB8 canlı hücresi + H ₂ O ₂	35,9 ± 1,5	8,8 ± 0,9	26,4 ± 0,7
GD11 canlı hücresi + H ₂ O ₂	36,8 ± 1,4	9,1 ± 0,8	27,2 ± 0,8
LB16 canlı hücresi + H ₂ O ₂	39,6 ± 1,2	9,7 ± 0,6	29,8 ± 0,6
E9 metaboliti + H ₂ O ₂	43,3 ± 0,9	10,6 ± 0,5	31,9 ± 0,5
GD11 metaboliti + H ₂ O ₂	44,5 ± 1,1	10,9 ± 0,5	32,8 ± 0,7
GD2 metaboliti + H ₂ O ₂	46,2 ± 0,8	11,3 ± 0,4	34,1 ± 0,7
LB63 metaboliti + H ₂ O ₂	47,4 ± 1,2	11,5 ± 0,7	34,9 ± 0,9
LB8 metaboliti + H ₂ O ₂	49,1 ± 1,5	11,9 ± 0,8	36,2 ± 0,8
LB16 metaboliti + H ₂ O ₂	51,2 ± 1,4	12,4 ± 0,6	37,9 ± 0,6

¹ Negatif kontrol, D-PBS ve lenfosit içerir. H₂O₂, canlı hücre ve metabolit ile muamele yapılmamıştır.

² Pozitif kontrol, D-PBS, lenfosit ve 50 µM H₂O₂ içerir. H₂O₂ uygulanarak, genetik hasar yaratılmaya çalışılmıştır.

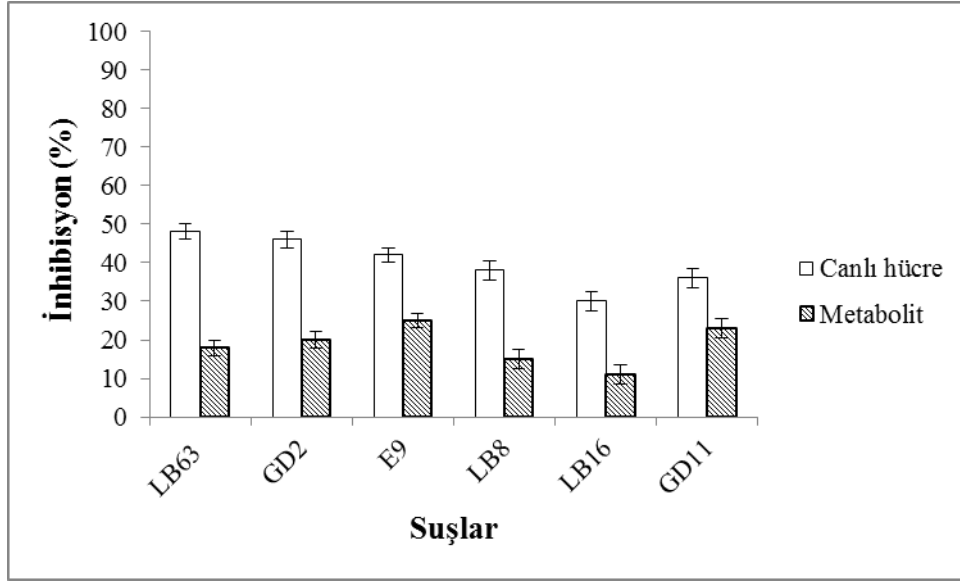


Resim 4.5. Laktik asit bakterilerinin H₂O₂ ile muamele edilmiş insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genetik hasarı önleyici etkisinin kuyruk yoğunluğuna göre belirlenmesi

İnsan lenfosit hücrelerinin H₂O₂ ajanı ile muamelesinden önce suşların canlı hücre veya metabolitleri ortama verilerek, bu maddelerin DNA'yı koruma etkisine bakılmıştır. Comet yönteminde kullanılan negatif kontrolde, hasarsız lenfosit hücreleri yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümüne (çekirdek) sahiptir. Bu hücrelerin görünümü kuyuksuz olarak değerlendirilir. H₂O₂ ile muamele edilen lenfosit hücrelerinin bulunduğu pozitif kontrolde, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm kazanmış ve

lenfositler kuyruklu yıldız şeklini almışlardır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu kuyruk uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir. H_2O_2 'in dışında bakteri canlı hücresi veya metabolitlerin uygulandığı deney gruplarında ise sadece düzensiz bir kenar oluşumu mevcut olup, pozitif kontroldeki lenfositler gibi bir kuyruk oluşumu yoktur (Resim 4.5). Çizelge 4.3'deki kuyruk yoğunluğu verilerine göre, en iyi sonucu LB63 suşunun canlı hücresi ($\% 22,2 \pm 0,9$) ve E9 suşunun metaboliti ($\% 31,9 \pm 0,5$) göstermiştir. Canlı hücre ve metabolitlerin hasarlı lenfositlerin kuyruğundaki DNA yoğunluğunda ve kuyruk uzunluğunda azalmaya neden olduğu görülmüştür. Yani suşların canlı hücre ve metabolitleri H_2O_2 'in indüklediği oksidatif DNA hasarını önemli oranda azaltmışlardır ($p < 0,05$).

Negatif kontrol grubunda hasarsız DNA'lar görünmekte iken, H_2O_2 uygulaması sonucu hasarlı DNA'ların oluştuğu görülmektedir. H_2O_2 'in indüklediği oksidatif DNA hasarı pozitif kontrol grubunda $\% 42,6 \pm 1,9$ olarak tespit edilmiştir. Bu hasarı LB63 suşunun canlı hücresi ($\% 48,2 \pm 2,0$ inhibisyon), GD2 suşunun canlı hücresi ($\% 46,1 \pm 2,3$ inhibisyon), E9 suşunun canlı hücresi ($\% 42,1 \pm 1,9$ inhibisyon) ve GD11 suşunun canlı hücresi ise ($\% 36,3 \pm 2,1$ inhibisyon) oranında inhibe etmiştir. H_2O_2 'in neden olduğu genotoksisitenin inhibisyonunda, canlı hücrelere göre metabolitler daha az etkili olmuştur. Oluşan hasarı, LB63 suşunun metaboliti ($\% 18,1 \pm 2,3$ inhibisyon), GD2 suşunun metaboliti ($\% 20,2 \pm 2,0$ inhibisyon), E9 suşunun metaboliti ($\% 25,4 \pm 1,9$ inhibisyon) ve GD11 suşunun metaboliti ise ($\% 23,2 \pm 2,2$ inhibisyon) oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. H_2O_2 'in indüklediği DNA hasarına bağlı oluşan genotoksisitenin canlı hücre ve metabolitler tarafından inhibisyonu

4.6. EPS'lerin Genotoksik Ve Antigenotoksik Etkisi

Çalışmamızda *L. rhamnosus* GD11, *L. rhamnosus* E9, *L. plantarum* GD2 ve *L. brevis* LB63 bakterilerine ait EPS'lerin, insan lenfositleri üzerinde olası genotoksik ve H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarını önleyici antigenotoksik etkileri comet yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmalar sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.4'de verilmiştir.

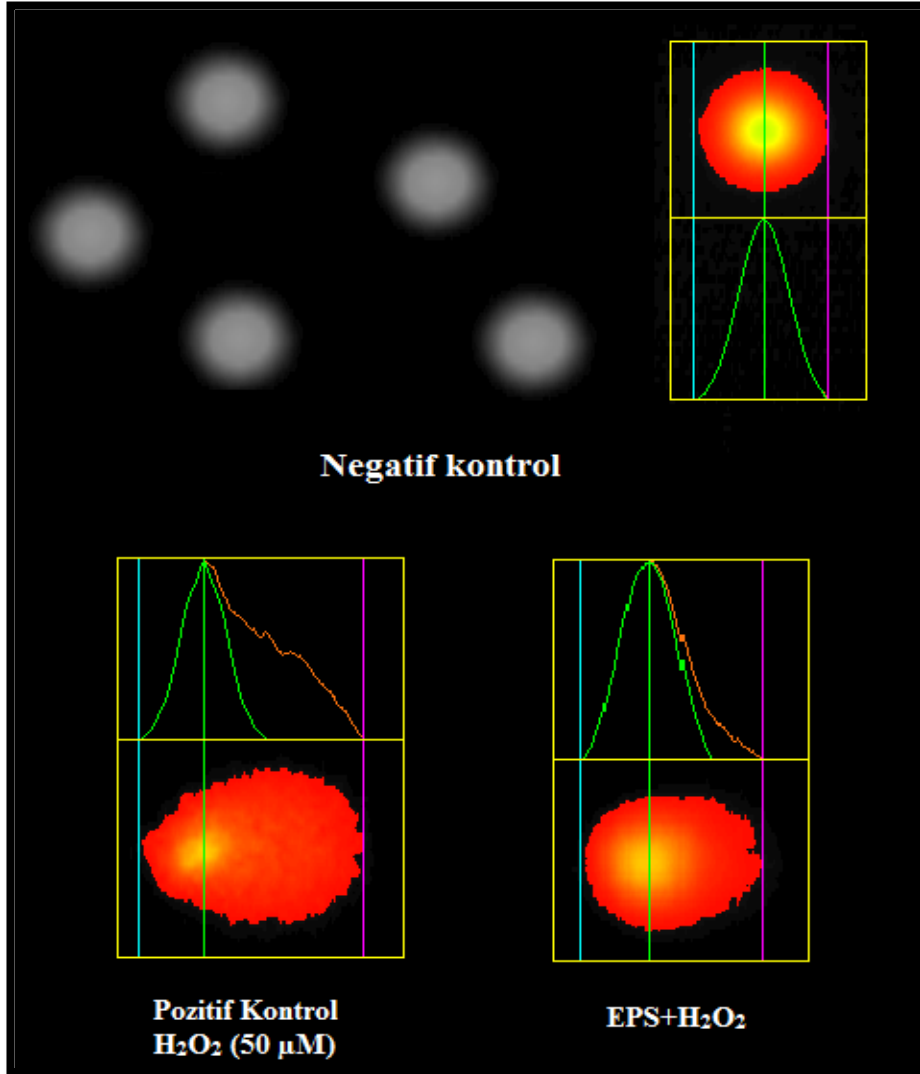
Çizelge 4.4. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkisi

Uygulama	Muamele	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk momenti	Kuyruk yoğunluğu (%)
<i>Genotoksisite</i>	Negatif kontrol ¹	27,9 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	GD11	26,3 ± 1,7	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	E9	30,6 ± 1,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	GD2	27,3 ± 0,7	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	LB63	28,6 ± 1,3	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<i>Antigenotoksisite</i>	Negatif kontrol ¹	27,9 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Pozitif kontrol ²	58,2 ± 1,6	14,3 ± 0,5	42,6 ± 1,9
	GD11 + H ₂ O ₂	33,8 ± 1,1	8,2 ± 0,4	25,1 ± 0,9
	E9 + H ₂ O ₂	34,6 ± 0,7	8,4 ± 0,8	25,8 ± 0,6
	GD2 + H ₂ O ₂	38,7 ± 1,7	9,4 ± 0,6	29,0 ± 1,3
	LB63 + H ₂ O ₂	42,8 ± 1,3	10,4 ± 0,9	31,1 ± 1,2

¹ Negatif kontrol, D-PBS ve lenfosit içerir. H₂O₂ ve EPS ile muamele yapılmamıştır.

² Pozitif kontrol, D-PBS, lenfosit ve 50 µM H₂O₂ içerir. H₂O₂ uygulanarak, genetik hasar yaratılmaya çalışılmıştır.

EPS'lerin genotoksik etkisi incelendiğinde herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmiştir. H₂O₂ muamelesi sonucu oluşan hasarlı lenfositlerde kuyruk yoğunluğu % 42,6 ± 1,9 iken, sadece EPS'ler ile muamele edilmiş lenfositlerde % 0,1 ± 0,0 olarak tespit edilmiştir.

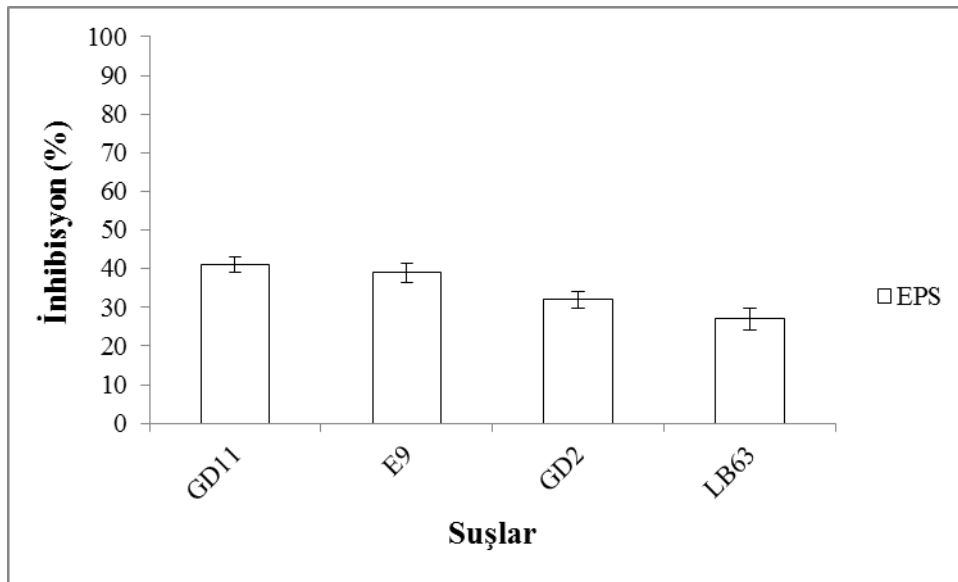


Resim 4.6. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin H₂O₂ ile muamele edilmiş insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genetik hasarı önleyici etkisinin kuyruk yoğunluğuna göre belirlenmesi

EPS'lerin H₂O₂ ile muamele edilmiş insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği antigenotoksik etkisi comet yöntemiyle incelenmiştir. Herhangi bir H₂O₂ uygulaması yapılmamış lenfosit hücrelerinin bulunduğu negatif kontrolde, hasarsız DNA'lar spot şeklinde bir görünüme sahiptir. H₂O₂ ile muamele edilen lenfosit hücrelerinin bulunduğu pozitif kontrolde, DNA fragmanları kuyruklu yıldız görünümündedir. EPS'ler ve H₂O₂ ile inkübe edilen lenfositler ise, düzensiz kenarlara sahiptir ve pozitif kontroldeki lenfositler gibi kuyruk oluşumu yoktur (Resim 4.6).

EPS'lerin hasarlı lenfositlerin kuyruğundaki DNA yoğunluğunda ve kuyruk uzunluğunda azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Yani EPS'ler oksidatif DNA hasarını önemli oranda azaltmışlardır ($p<0,05$).

H₂O₂'in indüklediği oksidatif DNA hasarı kontrol grubunda % 42,6 ± 1,9 olarak tespit edilmiştir. Bu hasarı LB63 suşunun EPS'si (% 27,1 ± 2,7 inhibisyon), GD2 suşunun EPS'si (% 32,2 ± 2,1 inhibisyon), E9 suşunun EPS'si (% 39,1 ± 2,5 inhibisyon) ve GD11 suşunun EPS'si ise (% 41,3 ± 2,0 inhibisyon) oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.5).

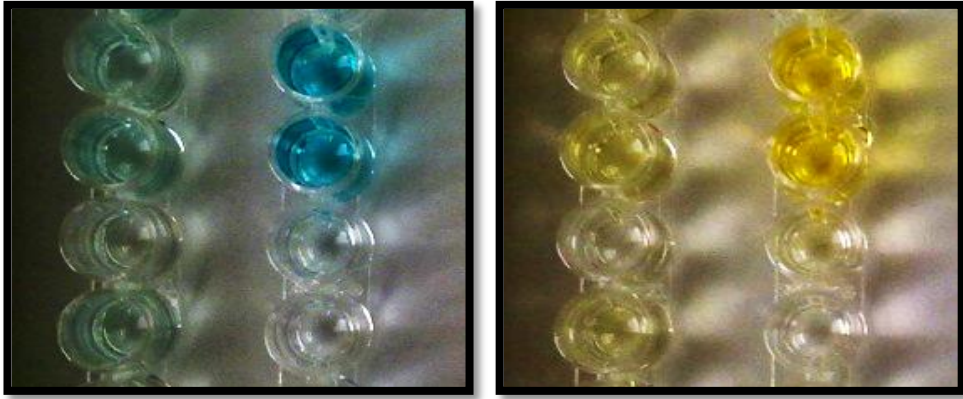


Şekil 4.5. H₂O₂'in indüklediği DNA hasarına bağlı oluşan genotoksisitenin EPS'ler tarafından inhibisyonu

Suşlara ait canlı hücrelerin, metabolitlerin ve EPS'lerin insan lenfosit hücreleri üzerine olası genotoksik etkileri araştırılmış ve üç uygulamanın da herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları tespit edilmiştir. H₂O₂'in indüklediği oksidatif DNA hasarını suşların canlı hücrelerinin, metabolitlerinin ve EPS'lerinin inhibe ettiği tespit edilmiştir. Uygulamalarda belirgin bir antigenotoksik etki belirlenmiş olmakla beraber, en iyi antigenotoksik etkiyi suşların canlı hücreleri göstermiştir.

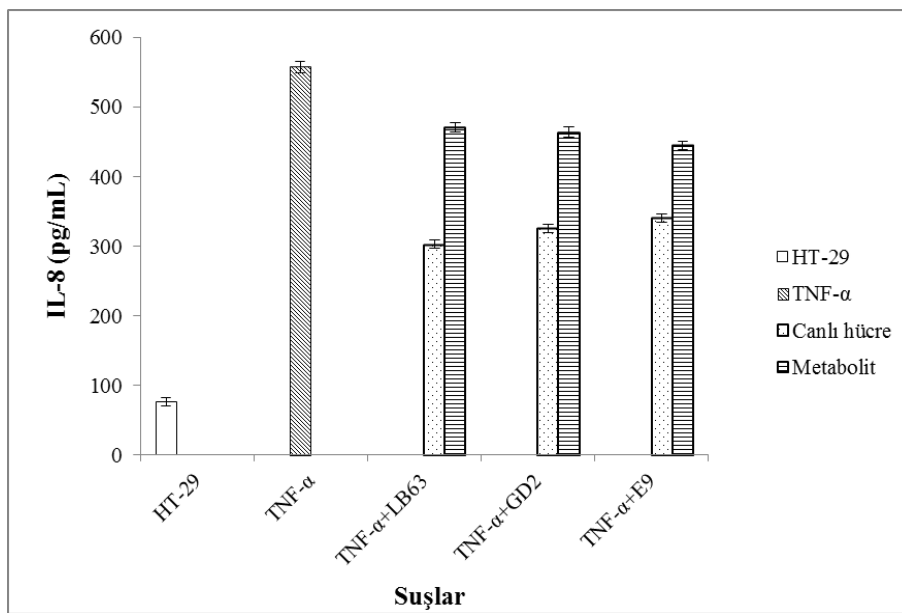
4.7. Laktik Asit Bakterilerinin Antiinflamatuvar Etkisi

Çalışmada HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde TNF- α uygulaması ile (10 ng/mL) inflamasyon ortamı yaratılarak, hücreler tarafından IL-8 sitokininin salgılanması sağlanmıştır. IL-10 için ise TNF- α ile uyarılma yapılmadan sitokin seviyeleri ölçülmüştür. *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin canlı hücrelerinden ~8,4-8,6 log cfu/mL dozunda eklenmiş ve her iki kanser hücre hattında tüm suşların IL-8 seviyesini düşürdüğü, IL-10 seviyesini ise arttırdığı gözlenmiştir. Kullanılan kültürlerin metabolitleri de IL-8 seviyesinde düşüşü sağlarken, IL-10 seviyesinde artışı sağlamıştır. Kontrol grubu olarak metabolit ile muamele edilmemiş hücreler, TNF- α uyarımı olmayan ve bakteri canlı hücreleri uygulanmamış hücreler kullanılmıştır. Ayrıca suşların tek başlarına hücrelerle birlikte kültür edildiklerinde hücrelerde inflamatuvar yanıtı uyarmadığı belirlenmiştir. Uygulamada kullanılan ELİSA kitinin çalışma prensibi, streptavidin ve biyotin arasındaki kuvvetli bağlanma özelliğine dayanır. Bu yöntemde primer antikora bağlanan, biyotin ile işaretlenmiş ikinci antikor kullanılır. Horse radish peroksidaz işaretli streptavidin, biyotinle işaretli ikinci antikora bağlanır. Kromojen/substrat solüsyonu olarak tetrametilbenzidin kullanılır ve dokudaki antijen/antikor/enzim kompleksi etrafında mavi renk reaksiyonu oluşur. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle mavi renk sarıya dönüşür. Ortama salınan IL-8 veya IL-10 miktarına bağlı olarak sarı rengin tonu da değişmektedir (Resim 4.7).



Resim 4.7. HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarında IL-8 veya IL-10 antijeni ile antikorunun etkileşimi sonucu meydana gelen renk değişimi

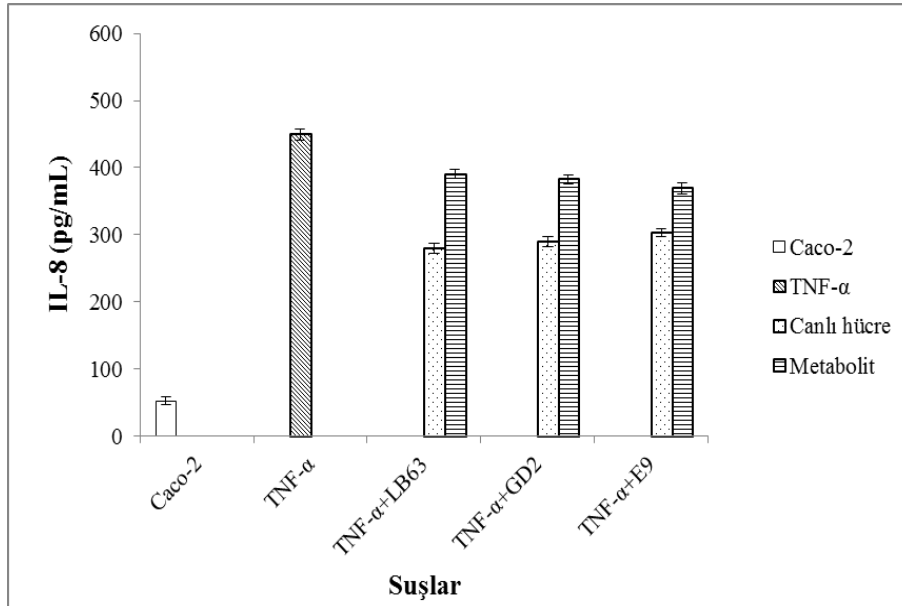
TNF- α uyarımı olmayan HT-29 hücresinde IL-8 seviyesi $76,1 \pm 5,4$ pg/mL olarak tespit edilmiştir. TNF- α ile uyarılan HT-29 hücrelerinde $557,3 \pm 8,1$ pg/mL olarak tespit edilen IL-8 seviyesi, en fazla LB63 suşunun canlı hücresi ile $302,2 \pm 6,2$ pg/mL'ye baskılanmıştır. GD2 suşu ve E9 suşunun canlı hücreleri ile baskılanma, birbirine yakın orandadır. IL-8 salınımına metabolitlerin etkisi incelendiğinde, en iyi baskılanmayı E9 suşunun metaboliti ($445,0 \pm 6,2$ pg/mL) göstermiştir. Diğer iki suşun IL-8 seviyesini baskılamada birbirine yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin TNF- α ile uyarılmış HT-29 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi

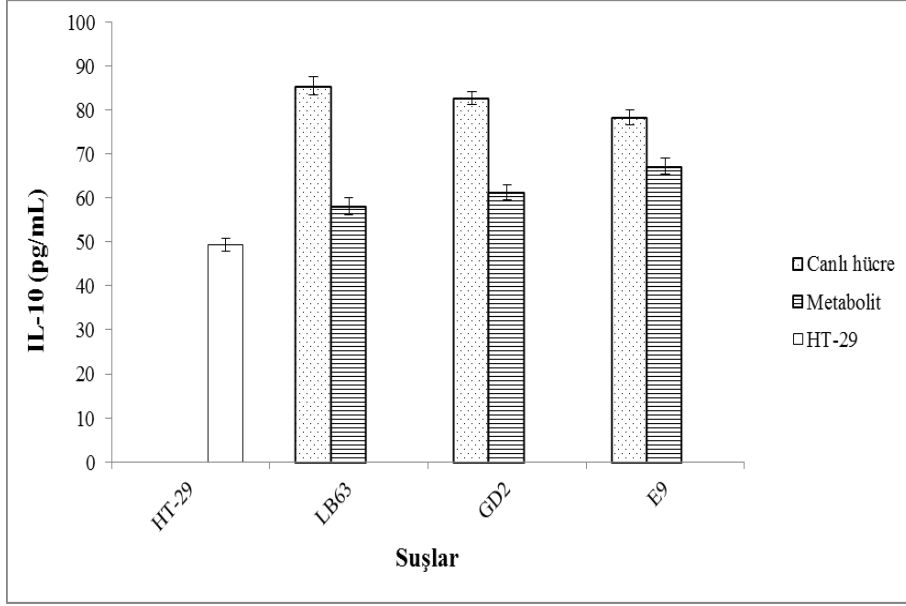
Caco-2 hücrelerinden salgılanan IL-8 miktarı, HT-29 hücrelerine göre daha düşük bulunmuştur. TNF- α uyarımı olmayan Caco-2 hücresinde IL-8 salınımı $53,0 \pm 5,3$ pg/mL olarak bulunmuştur. TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımının $450,0 \pm 8,5$ pg/mL'ye kadar arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada en iyi sonuç, LB63 suşunun canlı hücrelerinden ($280,2 \pm 7,2$ pg/mL) elde edilmiştir. IL-8 seviyesinin baskılanmasında GD2 suşu ile E9 suşunun canlı hücreleri ise, yakın sonuçlar vermiştir. HT-29 hücrelerinde olduğu gibi Caco-2 hücrelerinde de metabolitler, IL-8 salınımını baskılamakta canlı hücrelere göre daha az etkili olmuştur. IL-8 seviyesinin baskılanmasında E9 suşunun metaboliti ($369,1 \pm 7,7$ pg/mL) en iyi sonucu vermiştir. Diğer iki suşun IL-8 seviyesini baskılamada,

birbirine yakın oranlarda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7). IL-8 salınımının baskılanmasına suşların etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre IL-8 seviyesinde anlamlı bir düşüşün olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Buna rağmen suşlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



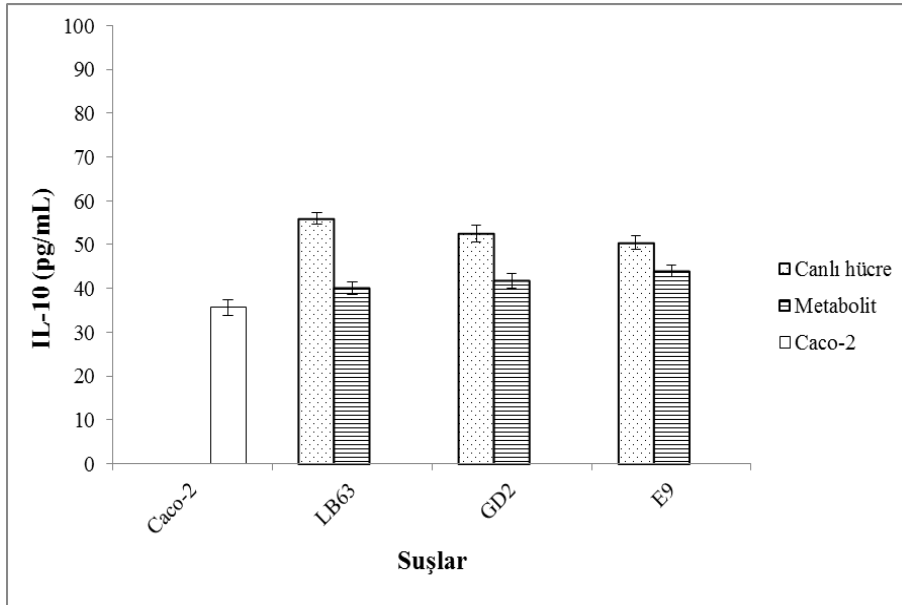
Şekil 4.7. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin TNF-α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi

HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarında antiinflamatuvar etkisi olan IL-10 sitokin seviyelerine laktik asit bakterilerinin etkisi araştırılmıştır. TNF-α uyarımı olmayan HT-29 hücresinde IL-10 salınımı $49,3 \pm 1,5$ pg/mL olarak bulunmuştur. HT-29 hücresinde, IL-10 seviyesini en fazla LB63 suşunun canlı hücreleri $85,4 \pm 2,1$ pg/mL'ye çıkartmıştır. GD2 suşu ile E9 suşunun canlı hücreleri ise, IL-10 seviyesinin artışına yakın oranlarda etki etmiştir. IL-10 seviyesine metabolitlerin etkisi incelendiğinde ise en iyi sonuç, E9 suşunun metabolitinden ($67,2 \pm 1,8$ pg/mL) elde edilmiştir. Diğer iki suşun canlı hücreleri gibi metabolitleri de birbirine yakın sonuçlar vermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin HT-29 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi

Caco-2 hücre hattından salınan IL-10 sitokin seviyesinin, HT-29 hücre hattına göre daha az olduğu tespit edilmiştir. TNF- α uyarımı olmayan Caco-2 hücresinde IL-10 salınımı $35,6 \pm 1,7$ pg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada en iyi sonuç, LB63 suşunun canlı hücrelerinden ($56 \pm 1,4$ pg/mL) elde edilmiştir. GD2 suşu ile E9 suşunun canlı hücrelerinden elde edilen sonuçlar ise, birbirine yakındır. HT-29 hücrelerinde olduğu gibi Caco-2 hücrelerinde de metabolitler, IL-10 salınımını arttırmakta canlı hücelere göre daha az etkili olmuştur. LB63 suşu ile GD2 suşunun metabolitleri IL-10 salınımının artışına yakın oranlarda etki ederken, E9 suşunun metaboliti ise, IL-10 seviyesini $44 \pm 1,4$ pg/mL'ye yükseltmiştir (Şekil 4.9). Suşların IL-10 salınımına etkisi istatistiksel anlamda incelendiğinde, kontrol grubuna göre IL-10 seviyesinde anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer yandan suşlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

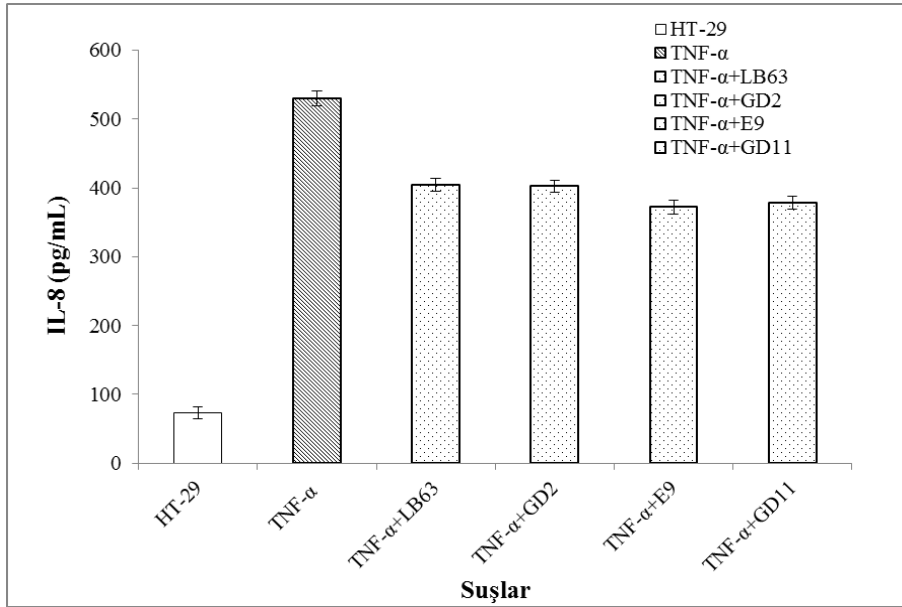


Şekil 4.9. Suşların canlı hücre ve metabolitlerinin Caco-2 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi

4.8. EPS'lerin Antiinflamatuvar Etkisi

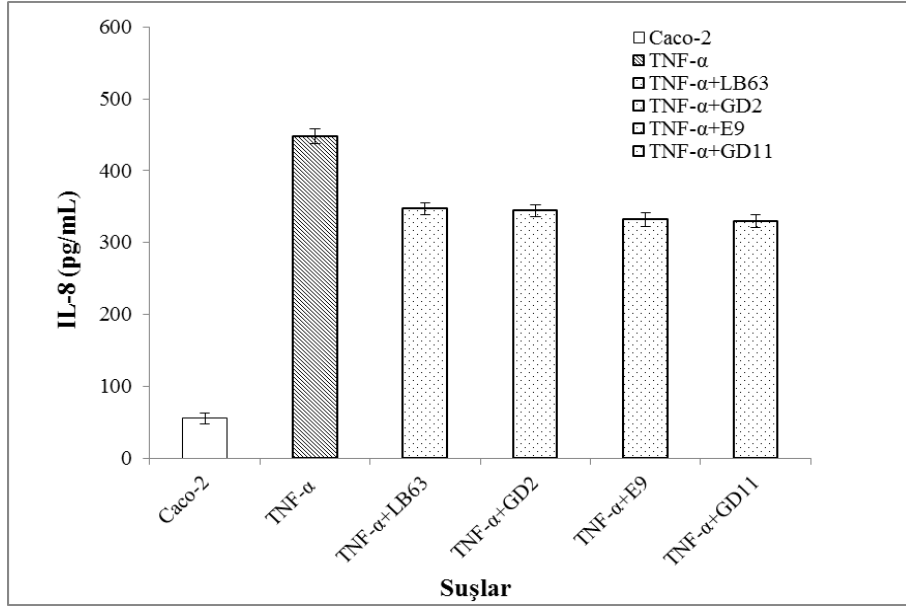
Çalışmada TNF- α uygulaması ile (10 ng/mL) HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde inflamasyon ortamı yaratılarak, hücreler tarafından IL-8 sitokininin salınması sağlanmıştır. *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin liyofilize EPS'leri steril su ile 800 μ g/mL konsantrasyonunda eklenmiş ve IL-8 seviyesinde düşüşün olduğu gözlenmiştir. IL-10 için ise, TNF- α ile uyarılma yapılmadan sitokin seviyesi ölçülmüş ve IL-10 seviyesinde artışın olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak TNF- α uyarımı olmayan ve EPS uygulanmamış hücreler kullanılmıştır. Ayrıca EPS'lerin tek başlarına hücrelerle birlikte kültür edildiklerinde, hücrelerde herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

TNF- α ile uyarılmayan HT-29 hücresinde IL-8 seviyesi $73,1 \pm 8,3$ pg/mL olarak tespit edilmiştir. TNF- α ile uyarılan HT-29 hücrelerinde $530,6 \pm 10,8$ pg/mL olarak tespit edilen IL-8 seviyesi, en fazla E9 suşunun EPS'si ile $372,1 \pm 9,7$ pg/mL'ye baskılanmıştır. GD11 suşunun EPS'si E9 suşu ile yakın sonuç vermiştir. GD2 suşu ve LB63 suşlarının EPS'leri ise, IL-8 seviyesinin baskılanmasında diğer iki suşa göre daha az etkili olmakla beraber, yakın sonuçlar vermiştir (Şekil 4.10).



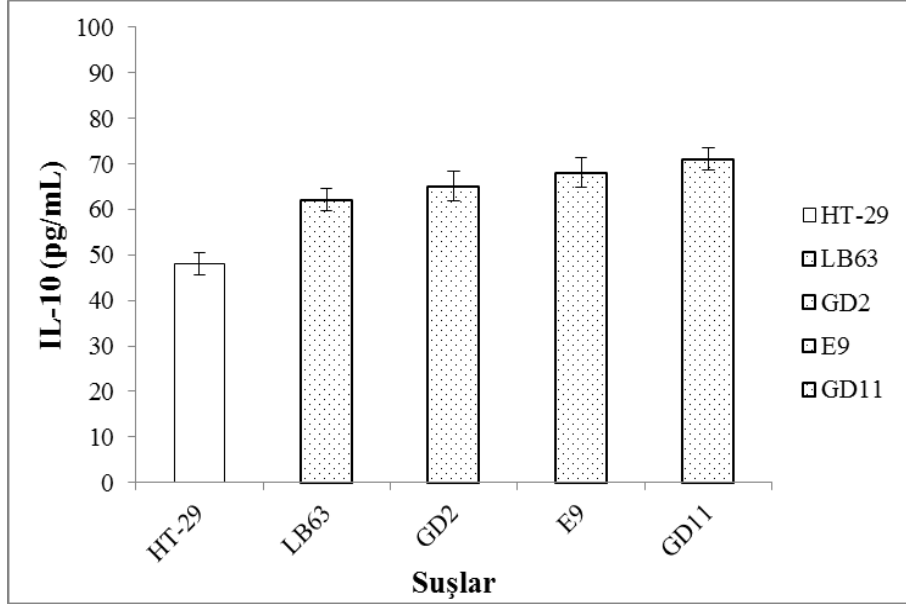
Şekil 4.10. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin TNF- α ile uyarılmış HT-29 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi

TNF- α ile indüklenmeyen Caco-2 hücresinde IL-8 salınımı $55,5 \pm 8,1$ pg/mL olarak bulunmuştur. TNF- α ile indüklenen Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımının $448,1 \pm 10,0$ pg/mL'ye kadar yükseldiği görülmüştür. Caco-2 hücresinden salınan IL-8 seviyesinin baskılanmasında en iyi sonucu, GD11 suşunun EPS'si ($330,0 \pm 8,5$ pg/mL) göstermiştir. E9 suşunun EPS'si ise, GD11 suşu ile yakın sonuç vermiştir. IL-8 seviyesinin baskılanmasında GD2 suşu ile LB63 suşlarının EPS'leri ise, yakın oranlarda sonuç vermekle beraber, diğer iki suşa göre daha az etkilidir (Şekil 4.11). IL-8 salınımına 4 suşun EPS'sinin etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre IL-8 seviyesinde anlamlı bir düşüşün olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Buna rağmen suşların EPS'leri arasında, IL-8 seviyesinin düşürülmesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



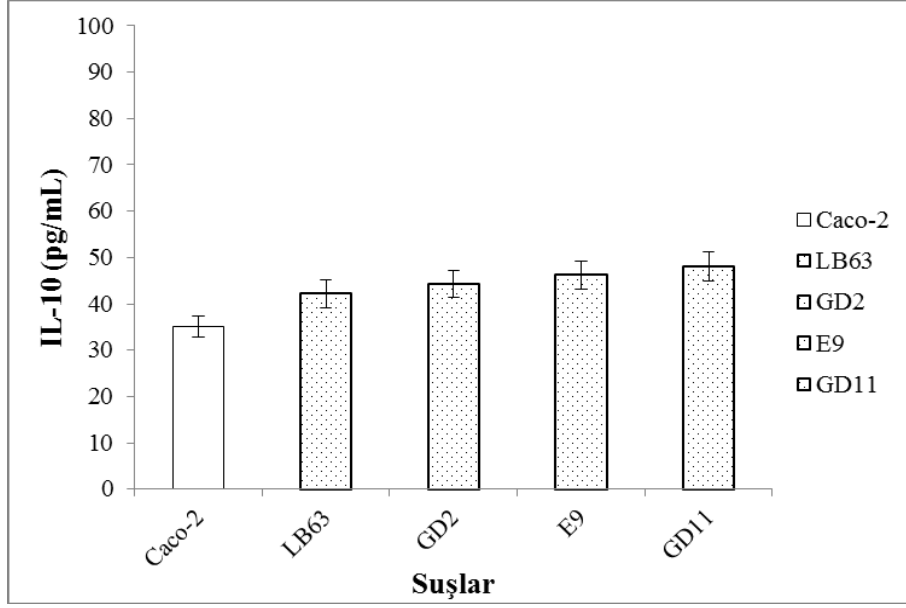
Şekil 4.11. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımına olan etkisi

Antiinflatuvar bir sitokin olan IL-10'un HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarından salınımına EPS'lerin etkisi araştırılmıştır. TNF- α uyarımı olmayan HT-29 hücresinde IL-10 salınımı $48,1 \pm 2,4$ pg/mL olarak bulunmuştur. HT-29 hücresinden salınan IL-10 seviyesini en fazla GD11 suşunun EPS'si $71,1 \pm 2,5$ pg/mL'ye yükseltmiştir. E9 suşunun EPS'si GD11 suşu ile yakın oranlarda IL-10 seviyesine etki etmiştir. GD2 suşu ile LB63 suşlarının EPS'leri ise, IL-10 seviyesini arttırmada diğer iki suşa göre daha az etkili olmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin HT-29 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi

TNF- α uyarımı olmayan Caco-2 hücresinde IL-10 salınımı $35,0 \pm 2,3$ pg/mL olarak bulunmuştur. Mevcut IL-10 seviyesini en fazla GD11 suşunun EPS'si $48,1 \pm 3,2$ pg/mL'ye yükseltmiştir. E9 suşunun EPS'si GD11 suşu ile yakın sonuç verirken, diğer iki suş IL-10 artışında daha az etkili olmuştur (Şekil 4.13). EPS'lerin IL-10 salınımına etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre IL-10 seviyesinde anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ancak suşların EPS'leri arasında IL-10 seviyesinin arttırılması bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.13. Dört farklı suşdan elde edilen EPS'lerin Caco-2 hücrelerinde IL-10 salınımına olan etkisi

Şuşlarla yapılan immünolojik çalışmalardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, her iki kanser hücre hattında da şuşların canlı hücrelerinin, metabolitlerinin ve EPS'lerinin belirgin bir antiinflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. İki kanser hücre hattı karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar, HT-29 kanser hücre hattından elde edilmiştir. Suşlara ait canlı hücreler, metabolitler ve EPS'ler antiinflamatuvar aktivitelerine göre kıyaslandığında ise, en iyi aktivitenin canlı hücrelere ait olduğu tespit edilmiştir. Yani canlı hücreler, her iki kanser hücre hattından salınan IL-8 seviyesini baskılamada ve IL-10 salınımını arttırmada metabolitler ve EPS'lerden daha etkilidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gastrointestinal sistem (GİS) gıdaların sindirilerek, bileşenlerin absorbe edildiği, posa kısımlarının dışkı olarak atıldığı bir organ sistemi olmasının yanı sıra, baştan sona lenfoid doku özelliğinde olan mukozası ile mükemmel bir bağışık sistem organıdır [Rahman ve ark., 2007]. GİS mikroflorası, vücudun dışı ile içi arasında bir köprü işlevi görmektedir [Palmer ve ark., 2007]. Normal mikroflora organizmayı, gıdalar ile alınan patojen bakterilerden ve antijenlerinden bağırsak epitel hücrelerinde oluşturdukları bariyer ile korumaktadır. GİS mikroflorası antijenler, patojenler, oksidatif stres, radyasyon vb. faktörlerle bozulduğunda mikrofloranın oluşturduğu bariyer fonksiyon ortadan kalkmaktadır [Limdi ve Mclaughlin, 2006; Saito, 2004]. Özellikle kolon kanseri ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının oluşmasında yanlış beslenme alışkanlıklarının ve buna bağlı olarak bağırsak flora dengesinin bozulmasının önemli rolü olduğu düşünülmektedir [Sheil ve ark., 2007; Sartor, 2004; Wollowski ve ark., 2001]. Kanser, hücrelerin bir şekilde kontrolsüz çoğalması, invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapması ile karakterize öldürücü bir hücre hastalığıdır [Komaki ve ark., 2012]. Kanser tedavisinde başarılı bir ilaç tedavisi için gereksinimler henüz tam anlamı ile anlaşılmış değildir. Çünkü, kanserli ve normal hücreler arasındaki farklılıklar çok küçüktür. Yan etkilerden arınmış faydalı bir ilaç henüz bulunamamıştır. Hızla bölünen normal vücut hücreleri (gastrointestinal kanal hücreleri, immün defans sistemi içinde yer alan kemik iliği hücreleri) de kullanılan antineoplastik ajanlarla tahrip edilmektedirler. Bu da kemoterapinin yan etkilerini oluşturmaktadır. Bunlar arasında, bulantı, saç kaybı, enfeksiyonlara artmış duyarlılık da sayılabilir. Günümüzün antineoplastik ajanları, bir kaçı haricinde tedavi edici değil, hafifletici olarak rol oynamaktadır [Di Leva ve ark., 2012]. Antikanser terapisi için kullanılan birçok ajan bitkilerden türevlenir [Tan ve ark., 2011]. Epidemiyolojik çalışmalar bitkilerle yapılan tedavilerin yanı sıra, yüksek miktarda probiyotik alımının insanlarda düşük kanser prevalansı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Karsinojen inaktivasyonu, antiproliferasyon, hücre döngüsünün askıya alınması, apoptozis ve farklılaşmanın indüksiyonu, anjiyogenezin baskılanması, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması ya da tüm bu mekanizmaların kombinasyonu probiyotiklerin kansere karşı etki mekanizmalarını

oluşturur [Liu ve ark., 2013]. Mevcut kanser ilaçlarının dışında, cerrahi tedavi ve radyoterapinin yan etkilerinin bulunması ve başarı şansının nispeten düşük olması sebebiyle, alternatif uygulamalara olan ihtiyaç artmıştır. Bu nedenle çalışmamız, kanserle tedavide bir alternatif olan probiyotik mikroorganizmaların GİS’de immünolojik olarak bozulan dengeyi yeniden kurmadaki, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve mutajen ajanların genotoksisitesini inhibe etmedeki rolünün anlaşılmasına yöneliktir.

İnsan GİS mikroflorası bazı probiyotik özellikteki bakteriler de dahil olmak üzere farklı türlerdeki birçok mikroorganizmayı bünyesinde bulundurmaktadır [Duany ve ark., 2012]. Probiyotik bakteriler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “yeterli miktarda verildiğinde konak üzerinde olumlu etki bırakan canlı mikroorganizmalar ” olarak tanımlanmıştır [FAO/WHO, 2001].

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların en önemlileri laktobasiller ve bifidobakterilerdir [Collado ve ark., 2008; Kirjavainen ve ark., 1998]. Probiyotiklerin insan kaynaklı olması, bu mikroorganizmaların, ortama daha kolay adapte olmaları ve konak ile diğer muhtemel ilişkilerini en iyi şekilde gerçekleştirmeleri açısından önemlidir [Fuller, 1989]. Bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızda, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu’nda bulunan, insan (bebek gaitası) kaynaklı bakteri kültürlerinden, daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik özellikleriyle öne çıkmış *Lactobacillus* cinsine ait 6 suş kullanılmıştır. Kullandığımız bu suşların probiyotik olması ve intestinal sistemde bulunması sebebiyle, çalışmamızda kolon kanser hücre hatları kullanılmıştır. *In vivo* çalışmalar çok zor olduğu için bu çalışmalarda genellikle insan bağırsak hücresi benzeri HT-29 ve Caco-2 hücre hattı kullanılmaktadır [Huang ve Adams, 2003]. Çalışmamızda suşların canlı hücrelerinin, metabolitlerinin ve EPS’lerinin her iki kanser hücre hattında da etkili olduğu tespit edilmiştir. Literatür araştırmalarında, laktik asit bakterilerinin canlı hücrelerinin, kültür edilmiş kanser hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir [Wollowski ve ark., 2001]. Çalışmalar genellikle laktik asit bakterilerinin kanser hücrelerinin canlılığını azaltması ve tümör büyüklüğünü düşürmesi üzerine odaklanmıştır. Tuo ve

arkadaşları (2010), HT-29 kolon kanser hücre hattında ısı ile öldürülmüş *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* T3L ve *L. rhamnosus* SB31L suşlarının 68 saat inkübasyon sonrasında, sırasıyla % 30 ve % 19 oranında etkili olduğunu bildirmişlerdir. *L. fermentum* RM28 suşunun Caco-2 hücreleri üzerinde canlı hücre formu kullanılarak hücre canlılığının azalması araştırılmış ve 24 saat inkübasyondan sonra, canlı hücrelerin % 29 oranında ölüme sebebiyet verdiği bildirilmiştir [Thirabunyanon ve ark., 2009]. Buradan yola çıkarak çalışmada canlı bakterilerin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi araştırılmıştır. Suşların canlı hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi WST-1 kiti ile araştırılmış ve Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de ölü hücre yüzdesi verilmiştir. Sonuçlara göre LB63 suşunun canlı hücreleri HT-29 hücrelerinde % 51, Caco-2 hücrelerinde % 38 oranında etkin olmuştur ($p<0,05$). GD2 suşunun canlı hücreleri ise, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde sırasıyla % 49 ve % 35 oranında etkili olmuştur ($p<0,05$).

Araştırmalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen çözünebilir bileşikler olan metabolitlerin, kültür edilmiş kanser hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir [Aso ve Akazan, 1992]. *L. fermentum* RM28 suşunun Caco-2 hücreleri üzerinde, metabolitleri kullanılarak hücre canlılığının azaltılması araştırılmış ve 24 saat inkübasyondan sonra, metabolitlerin % 22 oranında sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [Thirabunyanon ve ark., 2009]. Villarante ve arkadaşları (2011), çalışmalarında bakterilerin sekonder metabolitlerinden olan bakteriyosini esas almışlar ve *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 suşunun bakteriyosini ile HT-29 hücrelerini 96 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonrasında HT-29 hücrelerinde % 55 oranında ölüm tespit etmişlerdir. Bakteriler tarafından üretilen metabolitlerin ortama verildiği göz önünde tutulduğunda, antiproliferatif etkide metabolitlerin muhtemel rolü, bakteri kültürlerinin geliştirildiği hücre kültürü vasatı HT-29 ve Caco-2 hücreleri ile kültür edilerek araştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.1-2). WST-1 kiti ile yapılan çalışmada, metabolitlerin etkisi canlı hücrelere göre daha düşük bulunmuştur. HT-29 hücre hattında en yüksek etkiyi E9 suşunun metaboliti % 18 ile GD11 suşunun metaboliti % 17 gösterirken, Caco-2 hücrelerinde en yüksek etkiyi yine aynı suşlar sırasıyla % 15 ve % 14 oranında göstermiştir ($p<0,05$). Hong ve arkadaşları (2008), bir probiyotik olan *Bacillus subtilis* Natto suşu ile yaptıkları

çalışmada ısı ile muamele edilmiş metabolitlerin 24 saat sonrasında HT-29 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini sırasıyla % 11 ve % 0 olarak tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada, bizim çalışmamızda da olduğu gibi herhangi bir ısı muamelesi yapılmamış metabolitlerin HT-29 ve Caco-2 hücre hatları üzerinde % 54 ve % 53 oranında antiproliferatif etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Hong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları, yöntemdeki bazı farklılıklar ve özellikle hücre sayısı farkı göz önüne alındığında, bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı gibi ısı ile muamele edilmiş canlı hücreler ve metabolitlere göre, bizim çalışmamızda yaptığımız gibi ısı ile muamele edilmemiş canlı hücreler ve metabolitler kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemede daha etkilidir. Bu da laktik asit bakterilerinin doğal ortamı olan GİS mikroflorasında, kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemede önemli derecede etkili olduğunu göstermektedir. Bu görüşümüz bu alanda yapılmış *in vivo* çalışmalarla da desteklenmektedir.

Çalışmada, kullanılan suşların EPS üretme miktarları da dikkate alınmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların çoğalmaları sırasında ya da sekonder metabolit olarak ortama saldıkları polisakkarit yapıda, yüksek moleküler ağırlıklı polimerler olan EPS'ler gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, pıhtı azaltıcı olarak kullanılmaktadır [Kodali ve Sen, 2008; Welman ve Maddox, 2003; Cerning, 1990]. Çeşitli özelliklerinin yanı sıra, EPS'lerin antiinflamatuvar, antijenotoksik ve antitümör gibi probiyotik etkilerde doğrudan ya da dolaylı rolleri olduğu bildirilmektedir [Liu ve ark., 2011; Welman ve Maddox, 2003; Kitazawa ve ark., 1998]. Yapılan literatür araştırmalarında, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp. gibi farklı probiyotik bakterilerin EPS üretilip üretilmediği ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır. Bunlara örnek olarak Tallon ve arkadaşları (2003), mısırdan izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* EP56 suşunun EPS üretimini farklı karbon kaynakları (glukoz, galaktoz, sukroz) kullanarak araştırmışlar ve en yüksek EPS üretimini glukoz karbon kaynağında 114,5 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Audy ve arkadaşları (2010), yine farklı şeker kaynaklarının (glukoz, galaktoz, laktoz, fruktoz) *Bifidobacterium longum*

subsp. *longum* CRC 002 tarafından üretilen EPS üretimini değerlendirmiş ve en yüksek laktoz kaynağında 1080 ± 120 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda en yüksek EPS üretimi GD11 ($200,1 \pm 4,1$ mg/L), E9 ($186,2 \pm 3,2$ mg/L), iken düşük EPS üreten suşlar LB8 ($59,1 \pm 2,2$ mg/L) ve LB16 ($52,4 \pm 2,4$ mg/L) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Çalışmamızda EPS üretiminin suşlar arasında değiştiği gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte GD11 ve E9 suşlarının EPS üretme kapasitelerinin bazı literatür sonuçlarından yüksek olduğu görülmüştür. Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler kompleks bir biyopolimer karışımıdır. Bu polimerler, mikroorganizma hücreleri arasındaki boşlukları doldurarak mikrobiyal agregatların oluşmasını sağlamakta ve biyofilm matriksinin yapısını meydana getirmektedirler [Vu ve ark., 2009]. Probiyotik bakterilerin kolonda başarılı bir şekilde çoğalabilmeleri, asidik ortama direnebilmelerine, safra tuzlarını tolere edebilmelerine ve diğer bağırsak bakterileri ile substrat ve niş yarışında birinci gelmelerine bağlıdır [De Wiele ve ark., 2004]. Bakteriye sağladığı bu avantajların dışında, EPS'lerin antitümör ve antioksidan gibi probiyotik etkilerde doğrudan ya da dolaylı rolleri olduğu bildirilmektedir [Cerning, 1990]. Bu nedenle çalışmamızda, yüksek EPS üreten suşların EPS'lerinin HT-29 ve Caco-2 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisi araştırılmıştır. Buna göre HT-29 hücre hattı üzerinde, GD11 suşu (% 35) ve E9 suşunun (% 33) yüksek antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Caco-2 hücrelerinde de E9 suşu (% 29) ve GD11 suşu (% 28) ölü hücre oranı ile belirgin bir antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.3). Bu suşların EPS üretme kapasitelerinin de yüksek olması dikkat çekicidir. Bundan dolayı çalışmamızda, EPS üretimi ile antiproliferatif etki arasındaki ilişki istatistiksel olarak da tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Liu ve arkadaşları (2011), MTT tabanlı kolorimetrik yöntemi kullanarak, HT-29 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada *L. casei* 01 suşundan elde edilen EPS'nin 24 saat sonrasında % 26 antiproliferatif etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Challouf ve arkadaşlarının (2011), bir *Cyanobacterium* olan *Arthrospira platensis* suşundan elde edilen EPS'nin Caco-2 hücre hattı üzerinde 24 saat inkübasyon sonrasında yaklaşık % 5 antiproliferatif etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Hücre sayısı, kullanılan yöntem ve EPS konsantrasyonu göz önüne alındığında elde ettiğimiz sonuçlar oldukça anlamlıdır.

Yapılan antiproliferatif çalışmalarında farklı inkübasyon sürelerinin olması ve WST-1 kiti ile çalışmış olmamızdan dolayı canlı hücre, metabolit ve EPS'ler hem HT-29 hem de Caco-2 hücreleri ile 24-48 saat inkübasyona bırakılmış olup, HT-29 hücresinde canlı hücre ve EPS'ler 24, metabolitler ise 48 saat inkübasyon sonrası daha etkili olmuştur. Caco-2 hücresinde ise canlı hücre, metabolit ve EPS'ler 48 saat inkübasyon sonrası daha etkili olmuştur.

İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrolsüz hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir [Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010]. Herhangi bir kimyasal mutajenin neden olduğu genotoksik etkinin doğal bir kaynak kullanılarak giderilmesi kanserin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Yapılan deney modellerinde, laktik asit bakterilerinin mide ve kolon mukozasında kimyasal karsinojenlerle yapılan DNA hasarını önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir [Pool-Zobel ve ark., 1993]. Comet tekniği kullanılarak yapılan çalışmada *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *S. thermophilus*, *B. breve* ve *B. longum*, MNNG etkisine karşı antigenotoksik bulunmuştur. Bu bakteriler aynı zamanda 1,2-dimetilhidrazin ile indüklenmiş genotoksisiteye karşı da koruyucu etki göstermiştir [Hirayama ve Rafter, 2000]. Bu nedenle çalışmamızda antiproliferatif etkisini belirlediğimiz suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin, H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı antigenotoksik etkisi comet yöntemiyle belirlenmiştir. Bununla birlikte, antigenotoksik aktiviteye sahip bu canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin gıda endüstrisi ve tıp alanında kullanılmadan önce güvenilirliklerinin test edilmesi gerekir. Bu nedenle çalışmamızda, suşların insan lenfositlerinde herhangi bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığına da bakılmıştır. Suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin genotoksik etkisi incelendiğinde, herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmiştir. Suşlara ait canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturmaması, güvenli bir şekilde bunların kullanılabilceğini göstermiştir. Noroozi ve arkadaşları (2008), rat lenfositleri ile yaptıkları çalışmada 50 µM H₂O₂ ile yaklaşık % 48 DNA hasarı elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda insan lenfositleri kullanılmış olup, yaklaşık % 43 DNA hasarı elde edilmiştir (Çizelge 4.2-3-4). Oluşan DNA hasarını suşların canlı

hücre ve metabolitleri ile EPS'leri önemli oranda azaltmışlardır ($p<0,05$). Wollowski ve arkadaşları (1999), rat kolon hücreleri ile yaptıkları DNA hasar çalışmasında, laktik asit bakterileri (10^{12} hücre/L) ile kolon hücrelerini 2 saat inkübasyon sonrasında 1,2-dimetilhidrazin (15 mg/kg) ile 5.5 saat inkübe etmişlerdir. Oluşan hasarı *L. bulgaricus* 191R suşu % 51 inhibe etmiştir. Koller ve arkadaşları (2008), HT-29 hücresinde H_2O_2 ile DNA hasarı oluşturmuşlardır. Elde edilen hasar 3.10^7 bakteri/mL yoğunluktaki *L. brevis* VM21 suşu tarafından % 30, *L. acidophilus* VM19 suşu tarafından ise % 47 inhibisyona uğratılmıştır. Bizim çalışmamızda ~8,4-8,6 log cfu/mL'e ayarlı canlı hücre ve filtrelenmiş metabolitler ile lenfositler 1.5 saat inkübe edilmiş olup, en iyi etki LB63 suşu % 48, GD2 suşu % 46 ve E9 suşu % 42 inhibisyon oranıyla canlı hücrelerden elde edilmiştir (Şekil 4.4). Liu ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada *Lactobacillus casei* 01 suşundan elde edilen EPS'lerin (50 μ g/mL), 4-NQO ile indüklenen bağırsak 407 hücrelerindeki hasarı inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Hücrelerin sınıflandırılmasına dayalı olarak yaptıkları değerlendirmede 4-NQO ile indüklenen hücreler sınıf 3 ve 4'de yer alırken, EPS muamelesi sonucu hücreler sınıf 2 ve 3'de yer almıştır (Hasarsız DNA (sınıf 0), az DNA hasarı (sınıf 1), orta DNA hasarı (sınıf 2), yüksek DNA hasarı (sınıf 3), oldukça yüksek DNA hasarı (sınıf 4)). Bizim çalışmamızda ise, bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile DNA hasar derecesi kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir. Mevcut DNA hasarını LB63 suşunun EPS'si (800 μ g/mL) % 27, GD2 suşunun EPS'si % 32, E9 suşunun EPS'si % 39 ve GD11 suşunun EPS'si ise % 41 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.5). Yapılan çalışmalarda kullanılan mutajen ajan, canlı hücre ya da EPS konsantrasyon farkı ve inkübasyon süresi farklılıkları göz önüne alındığında, bizim çalışmamızdaki sonuçların oldukça anlamlı olduğu görülmektedir. Sonuç olarak kullandığımız suşların insan lenfositlerinde belirli konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği ve tek başına hasar oluşturmayan konsantrasyonlarda oksidatif DNA hasarını azalttığı görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilere bakıldığında, suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin antiproliferatif etkisi ile antigenotoksik etkisi arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$).

Kolorektal kanser en sık rastlanılan ve en agresif kanser türlerinde biridir. Mevcut kemoterapötiklere karşı direnç göstermektedir. Kolorektal kanserleri immünterapi ile tedavi, yetersiz kalmakta ve başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Antitümör immün yanıt, tümör hücreleri ve tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerden ve çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Sitokinler, tümör antijenlerinin, adezyon moleküllerinin, tümör infiltre eden lenfositlerin ekspresyonunu ve salınımını düzenlemektedir. Aynı zamanda tümör hücreleri tarafından immün baskılayıcı faktörlerin üretilmesini de etkilemektedir. Kolorektal kanserli hastaların serumlarında çok yüksek derecede IL-6, IL-8 ve TNF- α tespit edilmiştir. Proinflamatuvar sitokinlerin çoğunun tümör anjiyogenezisini uyararak tümör ilerlemesinin hızlandığı düşünülmektedir. IL-8, proinflamatuvar sitokin olup, normal hücrelerden olduğu kadar tümör hücrelerinden de salınmaktadır ve akut inflamatuvar reaksiyonların başlamasından sorumludur [Ning ve ark., 2011; Grivennikov ve Karin, 2008; Xie, 2001]. Antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10 koruyucu aktivitesini IL-1 β , TNF- α , IL-8, IFN- γ , IL-6 ve prostaglandin metabolitleri gibi inflamasyon mediyatörlerini inhibe ederek gösterir. IL-10'un antimetastatik ve antitümör aktiviteye sahip olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir [Wang ve ark., 2010; Huang ve ark., 1999; Kundu ve ark., 1996]. Yapılan bu çalışmalara göre tümör mikroçevresinde sitokinlerin lokal üretimi önemlidir. Son yıllarda laktik asit bakterilerinin proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını düzenleyebildiği dikkat çekmektedir [Wittig ve Zeitz, 2003]. Bundan dolayı çalışmada antiproliferatif ve antigenotoksik özellikleri belirlenen suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin HT-29 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki immünolojik özellikleri araştırılmıştır. Bakteri kültürlerinin ve EPS'lerin proinflamatuvar sitokinlerden IL-8, antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10 salınımına olan etkisi belirlenmiştir. HT-29 ve Caco-2 hücreleri *in vitro* ortamda inflamatuvar şartların oluşturulması için TNF- α ile uyarılarak hücrelerin IL-8 salınımını gerçekleştirmesi sağlanmıştır. Antiproliferatif ve antigenotoksik etkisi kuvvetli olan canlı hücrelerin ve EPS'lerin inflamasyonu anlamlı düzeyde düşürmesi dikkat çekmiştir. TNF- α ile uyarılmış HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde IL-8 salınımını hem canlı hücre hem de metabolitler düşürmüş olmakla beraber canlı hücreler daha etkili olmuştur. Buna göre HT-29 hücresinde 557 pg/mL olan IL-8 salınımının, en fazla LB63 suşunun

canlı hücresi ile 302 pg/mL'ye düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.6). TNF- α ile uyarımdan sonra Caco-2 hücresi 450 pg/mL IL-8 salınımı gerçekleştirmiş ve bu miktar en fazla LB63 suşu ile 280 pg/mL'ye inmiştir (Şekil 4.7). Bai ve arkadaşları (2004), HT-29 hücresi ile yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi, TNF- α muamelesinden önce suşlarla (8 log cfu/mL) hücreyi 1 saat inkübe etmişlerdir. Ancak çalışmamızdan farklı olarak TNF- α uygulamasından sonra hücreler 3 saat inkübasyona alınmıştır. Buna göre 639 pg/mL olan IL-8 salınımı *L. bulgaricus* LB10 suşu ile 515 pg/mL'ye düşmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada en iyi sonuç, LB63 suşu canlı hücrelerinden (~8,4-8,6 log cfu/mL) elde edilmiş olup, Bai ve arkadaşlarının elde ettiği IL-8 salınımını düşürme oranından 2 kat fazladır. Lammers ve arkadaşları (2002), HT-29 hücresini TNF- α ile muamele ettikten sonra inkübasyon süresini 32 saat olarak uygulamışlardır. Bizim çalışmamızda inkübasyonun canlı hücre için 24, metabolit için 48 saat uygulanmasının sebebi, antiproliferatif çalışmada da bu zaman dilimini uygulamamız ve buna bağlı olarak iki mekanizmanın (antiproliferatif ve antiinflamatuvar) arasındaki ilişkinin incelenmesi açısından bu sürenin daha uygun olmasıdır. Elde ettiğimiz sonuçlar da bunu desteklemektedir. Zhang ve arkadaşları (2005), Caco-2 hücresi ile yaptıkları çalışmada en fazla IL-8 salınımının 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında olduğunu belirtmişlerdir. Bizde çalışmamızda ise, Caco-2 hücresinde antiproliferatif inkübasyon süresi olan 48 saat tercih edilmiştir. EPS'lerin yaptığımız antiproliferatif ve antigenotoksisite çalışmalarında metabolitlerden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde antiinflamatuvar çalışmamızda da benzer sonuçla karşılaşmıştır. Bu sonucun, EPS elde etme aşamasında bakterilerin daha büyük hacimde üretilmesi ve buna bağlı olarak üretilen metabolitlerin daha fazla olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. TNF- α ile uyarılan HT-29 hücresinde 530 pg/mL olarak tespit edilen IL-8 seviyesi E9 suşunun EPS'si ile 372 pg/mL'ye ve GD11 suşunun EPS'si ile 378 pg/mL'ye düşmüştür (Şekil 4.10). TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücrelerinde ise IL-8 salınımının 448 pg/mL'ye kadar arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan E9 suşunun EPS'si 332 pg/mL'ye ve GD11 suşunun EPS'si ise IL-8 seviyesini 330 pg/mL'ye düşürmüştür (Şekil 4.11).

Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarında, bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesine canlı hücre, metabolit ve EPS'lerin etkisi araştırılmıştır. TNF- α uyarımı olmayan HT-29 hücresinde, IL-10 salınımı üzerinde hem canlı hücre hem de metabolitlerin etkili olduğu çalışmada canlı hücrelerden daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Suşlar uygulanmadan önce HT-29 hücresinde IL-10 salınımı 49 pg/mL olarak bulunurken, en fazla LB63 suşu ile IL-10 salınımı 85 pg/mL'ye yükselmiştir (Şekil 4.8). TNF- α uyarımı olmayan Caco-2 hücresinde ise IL-10 salınımı 35 pg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan LB63 suşu Caco-2 hücresinde IL-10 salınımını 56 pg/mL'ye yükseltmiştir (Şekil 4.9). Gao ve arkadaşları (2012), HT-29 hücresi ve *Clostridium butyricum* ile yaptıkları çalışmada IL-10 salınımına bakteri yoğunluğunun etkisini araştırmışlardır ve en iyi sonucu yaklaşık olarak bizim çalışmamızda kullandığımız 8 log cfu/mL bakteri konsantrasyonundan elde etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız kendi içinde kontrole göre anlamlı olmakla beraber Gao ve arkadaşlarının elde ettiği sonuca göre düşüktür. Bunun sebebinin hücre sayısı farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda EPS'lerin de anlamlı düzeyde antiinflamatuvar etkisinin olduğu tespit edilmiştir. TNF- α uyarımı olmayan HT-29 hücresinde IL-10 salınımı 48 pg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan E9 suşunun EPS'si 68 pg/mL'ye ve GD11 suşunun EPS'si ise 71 pg/mL'ye yükseltmiştir (Şekil 4.12). TNF- α uyarımı olmayan Caco-2 hücresinde IL-10 salınımı 35 pg/mL olarak bulunmuştur. IL-10 seviyesini E9 suşunun EPS'si 46 pg/mL'ye ve GD11 suşunun EPS'si ise 48 pg/mL'ye yükseltmiştir (Şekil 4.13).

Yapılmış çalışmalarda laktik asit bakterilerinin antiinflamatuvar özellikleri farklı kolon kanser hücre hatlarında (HT-29, Caco-2) ve periferik kan mononükleer hücrelerinde gösterilmiştir. Birkaç yıldan beri, probiyotikler diyare, poşitis ve atopik dermatit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Etkinliklerini nasıl gösterdiklerini açıklayan mekanizma henüz rapor edilmemiştir ancak farklı deney modellerinin kurulması ile elde edilen sonuçlar önemli bilgi sağlamaktadır. Zhang ve arkadaşları (2005), *L. rhamnosus* GG (LGG) suşunun ısı ile öldürülmüş ve canlı formlarını TNF- α ile uyarılmış Caco-2 hücreleri ile kültür etmişlerdir. TNF- α ile uyarılan IL-8 salınımı takip edilmiş ve LGG'nin IL-8 salınımını düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin dozu, canlı ya da ölü oluşu ve hücre komponentleri immün yanıt üzerinde farklı etkiler oluşturabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı probiyotik mikroorganizmaların antiinflamatuvar cevabı gösterebilmesi için canlı olması gerektiği gösterilirken, diğerlerinde ısı ile öldürülmüş olanların bu etkiyi gösterdiği savunulmaktadır [Zhang ve ark., 2005]. Hayvan modelinde yapılan *in vivo* çalışmalarda laktik asit bakterilerinin intestinal epitel bariyerinde yer alan dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunabildiği gösterilmiştir. Alerjili ve sağlıklı donörlerin dendritik hücrelerinde *L. casei* ATCC 393 suşunun etkisinin araştırıldığı çalışmada, probiyotik suş ile etkileşimde bulunan ham dendritik hücrelerin olgunlaşmaya başladığı ve IL-10 gibi antiinflamatuvar etkili sitokinlerin salınımını uyardığı gözlemlenirken, yalnızca probiyotik suşların bulunmadığı ortamda alerjik hastaların dendritik hücrelerinin T lenfositlerini daha fazla IFN- γ salgılaması için uyardığı saptanmıştır. Buna göre bir probiyotik olan laktik asit bakterileri alerjik hastalarda, dendritik hücre aktivitesini düzenleyerek, T hücre immün yanıtını değiştirmekte ve düzenleyebilmektedir [Miettinen ve ark., 1996].

GİS, epitel hücreleri, immün hücreler, sindirilmiş besinler ve flora bakterilerinden oluşan bir mikroçevredir. Bu sistem elemanları birbirleriyle sürekli ilişki halinde olup ürettikleri metabolitlerden ve verdikleri reaksiyonlardan farklı şekillerde etkilenmektedir. GİS oluşturduğu mukozal bariyer ile bu sistemi denge halinde tutmaktadır. Özellikle aşırı yağ ve et tüketimi gibi yanlış beslenme alışkanlıkları, stres, radyasyon, sigara ve alkol kullanımı, kemoterapi, antibiyotik kullanımı gibi dış etmenler ve aileden gelen genetik yatkınlıklar ile GİS mikroflora dengesi ve mukozal bariyeri bozulabilmektedir. Bozulan mukozal bariyer patojen mikroorganizmaların epitel hücre sıkı bağlantılarını aşarak bağ dokusuna ulaşmasına ve orada inflamasyona yol açmaktadır. Oluşan inflamasyon makrofaj, dendritik hücre ve T lenfositlerinin bölgede toplanmasına sebep olduğu gibi ürettikleri sitokinler oksidatif hasara da yol açmaktadır. Bunun uzun süre devam etmesi inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kolon kanserinin oluşmasına yol açmaktadır. Antioksidan desmutajenlerin en iyi bilinenlerinden biri olan laktik asit bakterileri, oksijen radikallerine direnebilme, süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti indirgeyebilme gibi özellikleri ile antigenotoksik aktivite göstermektedirler. Bu

aktiviteleri sayesinde, DNA hasarı ve buna bağlı oluşan hastalıklar özellikle de kanser hücrelerinin proliferasyonu engellenmektedir. Diğer yandan oksidatif hasarla ilişkili inflamasyonun ve buna bağlı olarak meydana gelen hastalıkların önlenmesi ya da tedavisinde merkezde yine laktik asit bakterileri vardır. Laktik asit bakterileri antiinflamatuvar özellikleri ile immün sistemi dengede tutmakta ve böylece başta kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemek olmak üzere, çeşitli hastalıklarda etkili olabilmektedir.

Sonuç olarak, laktik asit bakterilerinin canlı hücre, metabolit ve EPS'leri ile yapılan antiproliferatif, antigenotoksisite ve antiinflamatuvar çalışmalarında en iyi sonuç, LB63 suşunun canlı hücrelerinde gözlenmiştir. Kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar, hastada kemik iliği supresyonu, lenfotoksik etki, immünosupresyon ve alerjik reaksiyon gibi çeşitli rahatsızlıklar meydana getirmektedir. Bunun dışında hastanın kanserli hücrelerinin yanında, normal hücrelerine de sitotoksik etki göstermesinden dolayı, bakteri canlı hücrelerinin klinikte şase, kapsül gibi preparatların hazırlanmasında kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmanın bir diğer ilgi çekici tarafı, mevcut suşların canlı hücrelerinin dışında EPS'lerinin de literatürlerle kıyasladığımızda oldukça anlamlı sonuçlar vermesidir. Çeşitli preparatların ya da karışık substratların hazırlanması aşamasında, canlı hücrelerin stabilizasyonunu sağlayamama gibi olası olumsuz durumlara karşı liyofilize EPS'lerin, özellikle de GD11 suşuna ait EPS'lerin kullanımının mümkün olabileceğini öngörmekteyiz. Bu iki suşun, preparat olarak kullanılması halinde GİS mide asidi ve safra tuzlarına dayanabileceklerini, sahip oldukları yüksek EPS retme kapasiteleri ile oluşturacakları biyofilm ile bağırsak epitel hücrelerine kolaylıkla tutunabileceklerini öngörmekteyiz. Ülkemizde yaygın olarak rastlanılan yanlış yanlış beslenme alışkanlıkları, stres ve aşırı alkol tüketimi GİS'de oksidatif hasara yol açmaktadır. Oksidatif hasar uzun süreli ve aşırı miktarlarda olduğunda inflamasyona yol açmakta ve kronik GİS rahatsızlıklarının oluşmasına sebep olmaktadır. Özellikle LB63 suşu sahip olduğu antigenotoksik aktivite ile GİS'de oksidan/antioksidan dengesini düzenleyebilecek özelliğe sahiptir. Oksidatif hasarın meydana getirdiği inflamasyonun baskılanmasında LB63 suşu antiinflamatuvar aktivitesi ile etkili olmuştur. Bu sayede, özellikle LB63 suşunun

kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde destek ajanı olarak kullanılabileceğini önermekteyiz. İmmün sistemdeki dengenin bozulma sebeplerinden biri de, bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. İmmün sistemdeki dengenin bozulmasına bağlı olarak enfeksiyonlara yatkınlık, viral orjinli malignant tümör gelişimi, otoimmün hastalıklar (ülseratif kolit, Crohn hastalığı, atopik dermatit), alerjik hastalıklar ve hepatik ensefalopati gibi birçok hastalık meydana gelmektedir. Çalıştığımız laktik asit bakterileri doğal flora elemanı olmalarına bağlı olarak mevcut immün sistemi bozacak potansiyelde ajan olmadığı gibi, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayarak ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin ise salınımını arttırarak immün sistemi dengede tutmaktadır. Bu da bu bakterilerin gerek hastalık öncesi direnç, gerekse hastalık sürecinde tedavi amacıyla immünoterapi ajanı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tez çıkarımı ve öngürüler

- 1) Probiyotiklerin *in vitro* deneylerde kanserli hücre gelişimini inhibe ettiği ve hayvan denemelerinde kanser gelişimini engellediği, tümörleri küçülttüğü bilinmektedir. Çalışmada bakterilerin canlı hücre ve metabolitlerinin *in vitro* kültürde HT-29 ve Caco-2 hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.
- 2) Laktobasil kültürlerinin EPS üretme kapasiteleri taranarak yüksek EPS üreten 4 suş seçilmiştir.
- 3) Suşlar tarafından üretilen EPS'lerin HT-29 ve Caco-2 hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.
- 4)) Antikanser ajanı olarak kullanımı planlanan suşların (canlı hücre, metabolit ve EPS), insan lenfositleri üzerinde genetik hasar oluşturmadığı comet yöntemiyle belirlenmiştir.
- 5) H₂O₂ ile oksidatif DNA hasarına uğratılmış insan lenfosit hücrelerinde, suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin antigenotoksik aktivitesi comet yöntemiyle ortaya konulmuştur.
- 6) Kanser mikroçevresinde proinflamatuvar sitokinlerin salınımının olması kanser ilerlemesine ve yayılmasına yol açmaktadır. Bunların içerisinde IL-8 en önemli

sitokinlerden biridir. Çalışmamızda *in vitro* ortamda inflamasyon oluşturulmuş hücre kültüründe suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin IL-8 salınımını düşürdüğü gözlenmiştir.

7) HT-29 ve Caco-2 kanser hücre hatlarında antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesine suşların canlı hücre, metabolit ve EPS'lerinin etkisi belirlenmiştir.

8) Yukarıda da belirtildiği gibi bu çalışmada laktobasil kültürlerinin ve EPS'lerin antiproliferatif, antigenotoksik ve antiinflamatuvar özellikleri ve bu özelliklerin arasındaki ilişki ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Sonuçlara göre *L. brevis* LB63, *L. plantarum* GD2, *L. rhamnosus* E9 ve *L. rhamnosus* GD11 suşları kanser hücrelerinin proliferasyonunu önleyici etkiye sahip, antiinflamatuvar ve antigenotoksik suşlar olarak öne çıkmıştır.

9) GD11, E9, GD2 ve LB63 suşları yüksek EPS üreten suşlardır.

10) Üstün özelliğe sahip suşlar olarak belirlenen LB63, GD2, E9 ve GD11 suşları klinik ve gıda uygulamaları için preparat haline getirilebilir.

11) Bu 4 suşun, preparat olarak kullanılması halinde GİS mide asidi ve safra tuzlarına dayanabileceğini, sahip oldukları yüksek EPS üretme kapasiteleri ile kolay agregre olarak oluşturacakları biyofilm ile bağırsak epitel hücrelerine kolaylıkla tutunabileceklerini ve böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu önleyebileceklerini öngörmekteyiz.

12) EPS'lerin antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antigenotoksik gibi probiyotik etkilerde doğrudan ya da dolaylı rollerinin olması oldukça dikkat çekicidir. Bu nedenle, çeşitli preparatların ya da karışık substratların hazırlanması aşamasında, canlı hücrelerin stabilizasyonunu sağlayamama gibi olası olumsuz durumlara karşı liyofilize EPS'lerin, özellikle de GD11 suşuna ait EPS'lerin kullanımının mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

13) Yanlış beslenme alışkanlıkları, stres, aşırı alkol tüketimi ve çeşitli mutajenlere maruz kalma GİS'de oksidatif DNA hasara yol açmaktadır. Oksidatif hasar uzun süreli ve aşırı miktarda olduğunda inflamasyona yol açmakta ve kronik GİS rahatsızlıklarının oluşmasına sebep olmaktadır (ülseratif kolit, Chron hastalığı, kolon kanseri vb.). LB63, GD2, E9 ve GD11 suşları antigenotoksik aktiviteleri ile GİS'deki dengeyi düzenleyebilecek özelliğe sahiptirler.

14) Organizma birbiri ile ilişki halinde olan sistemler bütünüdür. Oksidatif hasar GİS içinde inflamasyona da yol açmaktadır. LB63, GD2, E9 ve GD11 suşlarının inflamasyonu yüksek oranda baskıladığı tespit edilmiştir. Bu sayede inflamatuvar bağırsak hastalıkları, atopik dermatit, alerjik hastalıklar, hepatik ensefalopati ve kolon kanseri tedavilerinde destek ajanı olarak kullanılabilceğini önermekteyiz.

15) Gelecek çalışmalarda antiinflamatuvar özellik *in vitro* ortamda makrofaj, dendritik hücre ya da lenfositlerle birlikte kolon hücrelerinin kültür edilmesi ile araştırılabilir. Böylece bir GİS modeli oluşturulmuş olacak ve bakterilerin bu modeldeki cevabı belirlenmiş olacaktır. Hayvan deney modelleri ile antigenotoksik aktivite, kanser ve immünolojik özellik arasındaki ilişki aydınlatılabilecektir.

16) Probiyotiklerin, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde başarı şansını kısıtlayan faktörler ve mevcut ilaçların yan etkilerinden doğan alternatif tedavi açığını, kapatacak potansiyelde olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Pillai, S., “Cellular and molecular immunology 7th edition”, *Elsevier Health Sciences*, USA, 306-500 (2011).
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Pober, J. S., “Effector mechanisms of T cell mediated immun reactions in cellular and molecular immunology 3rd edition”, *WB Saunders Company*, USA, 13: 286 (1997).
- Adawi, D., Ahrne, S., Molin, G., “Effects of different probiotic strains of Lactobacillus and Bifidobacterium on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model”, *International Journal of Food Microbiology*, 70 (3): 213-220 (2001).
- Adawi, D., Kasravi, F. B., Molin, G., Jeppsson, B., “Effect of *Lactobacillus* administration with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat”, *Hepatology*, 25: 642–647 (1997).
- Ades, T., Yarbrow, H. C., “Alternative and complementary therapies in cancer management”, Yarbrow, H. C., Frogge, M. H., Goodman, M., *Cancer Nursing Principles and Practice 5th edition*, *Jones & Bartlett Publishers*, 617-28 (2000).
- Adkinson, N. F., Yunginger, J. W., Busse, W. W., Bachner, B. S., Holgate, S. T., Simons, F. E. R., “Middleton’s Allergy 6th edition”, *Mosby*, USA, 164-165, 138-139, 205, 314 (2003).
- Agague, S., Marcenaro, E., Ferranti, B., Moretta, L., Moretta, A., “Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells”, *Blood*, 112: 1776-1783 (2008).
- Akalın, S., Gönç, S., Senderya, S., “Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler, VI. süt ve süt ürünleri sempozyumu (süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)”, *Tebliğler Kitabı Rebel Yayıncılık*, 29-38 (2000).
- Algier, L. A., Hanoglu, Z., Ozden, G., Kara, F., “The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patients in Turkey”, *European Journal of Oncology Nursing*, 9 (2): 138-46 (2005).
- Altonsy, M. O., Andrews, S. C., Tuohy, K. M., “Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium* and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway”, *International Journal of Food Microbiology*, 137 (2-3): 190-203 (2010).
- Arda, M., “Genel bakteriyoloji”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 402: 250-256 (1985).

Aso, Y., Akazan, H., “Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer”, *Urologia Internationalis*, 49 (3): 125–129 (1992).

Audy, J., Labrie, S., Roy, D., Lapointe, G., “Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002”, *Microbiology*, 156 (3): 653–664 (2010).

Aydın, A., “Kanser ve beslenme”, *Klasmat Matbaacılık*, 5-16 (2008).

Baer, A., Ryba, I., “Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples”, *International Dairy Journal*, 2: 299-310 (1992).

Baggiolini, M., Dahinden, C. A., “CC chemokines in allergic inflammation”, *Immunology Today*, 15 (3): 127-133 (1994).

Bai, A. P., Ouyang, Q., Zhang, W., Wang C. H., Li, S. F., “Probiotics inhibit TNF- α -induced interleukin-8 secretion of HT-29 cells”, *World Journal of Gastroenterology*, 10 (3): 455-457 (2004).

Bai, A. P., Ouyang, Q., “Probiotics and inflammatory bowel diseases”, *Postgraduate Medical Journal*, 82: 376-382 (2006).

Baricault, L., Denariáz, G., Hourí, J. J., “Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermente milks on colon cancer cell growth and differentiation”, *Carcinogen*, 16: 245-252 (1995).

Bauer, G., “Lactobacilli-mediated control of vaginal cancer through specific reactive oxygen species interaction”, *Medical Hypotheses*, 57 (2): 252-257 (2001).

Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, H. A., Rose-John, S., Neurath, M. F., “IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer”, *Cell Cycle*, 4 (2): 217-220 (2005).

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L., “Adhesion of human Bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen cell interactions”, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12): 4121-4128 (1993).

Biffi, A., Corandini, D., Larsen, R., Riva, L., Di Fronzo, G., “Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line”, *Nutrition and Cancer*, 28: 93–99 (1997).

Bleia, A. T., Córdoba, J., “Hepatic encephalopathy”, *The American Journal of Gastroenterology*, 96 (7): 1968–1976 (2001).

Bogdanov, I. G., Velichkov, V. T., Gurevich, A. I., Dalev, P. G., Kolosov, M. N., “Antitumor effect of glycopeptides from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 84: 709–712 (1977).

Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., Srivastava, S., “A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer”, *Cancer Research*, 58 (22): 5248-5257 (1998).

Bolognani, F., Rumney, C. J., Rowland, I. R., “Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens”, *Food and Chemical Toxicology*, 35: 535-545 (1997).

Borish, L. C., Steinke, J. W., “Cytokines and chemokines”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (2): 460-475 (2003).

Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., Lara, F., Espin, E., Naval, J., Guarner, F., Malagelada, J. R., “Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn’s disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria”, *Gut*, 51: 659-664 (2002).

Broide, D. H., “Molecular and cellular mechanisms of allergic disease”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108: 65–71 (2001).

Brooker, S., Rowlands, M., Haller, L., Savioli, L., Bundy D. A., “Towards an atlas of human helminth infection in sub-Saharan Africa: the use of geographical information systems (GIS)”, *Parasitology Today*, 16 (7): 303-307 (2000).

Brooks, G. F., Janet, S. B., Stephen, A. M., Jawetz, M., “Melnick & Adelberg’s medical microbiology 21th edition”, *Appleton & Lange*, Connecticut, 242-243 (1995).

Brown, D. E., Koenig, T. V., Demorales, A. M., Mossman, K. K., Akina, C. M., Sako, E. K., “Relation of subcutaneous fat distribution to percentage of Polynesian ancestry in native Hawaiian children”, *American Journal of Human Biology*, 5 (1): 9-15 (1993).

Burdin, N., Peronne, C., Banchereau, J., Rousset, F., “Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human IL-10”, *Journal of Experimental Medicine*, 177: 295 (1993).

Burkovics, P., Sebesta, M., Sisakova, A., Plault, N., Szukacsov, V., Robert, T., Pinter, L., Marini, V., Kolesar, P., Haracska, L., Gangloff, S., Krejci, L., “Srs2 mediates PCNA-SUMO-dependent inhibition of DNA repair synthesis”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 32 (5): 742-755 (2013).

Burns, A. J., Rowland, I. R., “Anticarcinogenicity of probiotics and prebiotics”, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1: 13-24 (2000).

Burns, A. J., Rowland, I. R., “Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells”, *Mutation Research*, 551 (1-2): 233-243 (2004).

Caldini, G., Trotta, F., Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., “Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests”, *International Journal of Food Microbiology*, 102: 37-47 (2005).

Canducci, F., Cremonini, F., Armuzzi, A., “Probiotics and *Helicobacter pylori* eradication”, *Digestive and Liver Disease*, 34: 81-83 (2002).

Cerning, J., “Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 87: 113-130 (1990).

Cerning, J., Renard, M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L., “Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer”, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (11): 3914-3919 (1994).

Challouf, R., Trabelsi, L., Dhieb, R. B., Abed, O. E., Yahia, A., Ghozzi, K., Ammar, J. B., Omran, H., Ouada, H. B., “Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by *Cyanobacterium Arthospira platensis*”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (4): 831-838 (2011).

Chabner, B., Longo, D. L., “Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice”, *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 125-153 (2011).

Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S., Kim, S. H., “Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*”, *Letters in Applied Microbiology*, 42: 452-458 (2006).

Clambey, E. T., Collins, B., Young, M. H., Eberlein, J., David, A., Kappler, J. W., Marrack, P., “The ikaros transcription factor regulates responsiveness to IL-12 and expression of IL-2 receptor alpha in mature, activated CD8 T cells”, *Plos One*, 8 (2): 57435 (2013).

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains”, *European Food Research and Technology*, 226 (5): 1065-1073 (2008).

Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I., “The potential mechanisms involved in the anticarcinogenic action of probiotics”, *Mutation Research*, 591: 276-289 (2005).

Çakır, İ., “GDM 310 Gıda mikrobiyolojisi”, *Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları*, Ankara, 55-76 (2003).

Daeschel, M. A., “Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives”, *Food Technology*, 164-167 (1989).

De Wiele, T. V., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W., “Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem”, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 51: 143–153 (2004).

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., “Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi”, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (2): 77- 89 (2010).

Di Leva, G., Briskin, D., Croce, C. M., “MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy”, *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117: 202–216 (2012).

Dinarello C. A., Moldawer, L. L., “Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis”, *Amgen*, USA, 3-79 (2000).

Dolar, K., “Gece koruyuculu vital ağartma sisteminin vital dokular üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması”, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Konservatif Diş Tedavisi AD Doktora Tezi*, 45-53 (1998).

Dranoff, G., “Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy”, *Nature Reviews Cancer*, 4: 11-22 (2004).

Drinan, D. F., Tobin, S., Cogan, T. M., “Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (4), 481-486 (1976).

Duary, R. K., Bhausahab, M. A., Batish, V. K., Grover, S., “Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Lp91 in colitis mouse model”, *Molecular Biology Reports*, 39 (4): 4765-4775 (2012).

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., Smith, F., “Colorimetric determination of sugars and related substances”, *Analytical Chemistry*, 28: 350-356 (1956).

Dustin, M. L., Springer, T. A., “T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1”, *Nature*, 341: 619 - 624 (1989).

Ernst, E., Cassileth, B. R., “The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review”, *Cancer*, 83 (4): 777-82 (1998).

Ewaschuk, J. B., Dieleman, L. A., “Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases”, *World Journal of Gastroenterology*, 12 (37): 5941-5950 (2006).

Farrar, M. A., Schreiber, R. D., The molecular cell biology of interferon-gama and its receptor”, *Annual Review of Immunology*, 11: 571-611 (1993).

Ferguson, L. R. “Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet”, *Mutation Research*, 307: 395-410 (1994).

Fernandes, C. F., Shahani, K. M., Amer, M. A., “Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 46 (3): 343-356 (1987).

Flinterman, A. E., Knol, E. F., van Ieperen-van Dijk, A. G., Timmerman, H. M., Knulst, A. C., Bruijnzeel-Koomen, C. A., “Probiotics have a different immunomodulatory potential *in vitro* versus *ex vivo* upon oral administration in children with food allergy”, *International Archives of Allergy and Immunology*, 143 (3): 237-244 (2007).

Food and Agriculture Organization, World Health Organization, “Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk and live lactic acid bacteria”, *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report*, 50 (1): 350 (2001).

Fuller, R., “Probiotics in man and animals”, *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378 (1989).

Gackowska, L., Michalkiewicz, J., Krotkiewski, M., Helmin-Basa, A., Kubiszewska, I., Dzierzanowska, D. J., *Physiology Pharmacology*, 9: 13-21 (2006).

Galdeano, C. M., Moreno de Le Blanc, A., Vinderola, G., Bonet, M. E. B., Perdigon, G., “Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria”, *Clinical and Vaccine Immunology*, 14 (5): 485-492 (2007).

Gao, Q., Qi, L., Wu, T., Wang, J., “An important role of interleukin-10 in counteracting excessive immune response in HT-29 cells exposed to *Clostridium butyricum*”, *Biomedcentral Microbiology*, 12: 100 (2012).

Gill, H., Guarner, F., “Probiotics and human health: a clinical perspective”, *Postgraduate Medical Journal*, 80: 516-526 (2004).

Gismondo, M. R., Drago, L., Lombardi, A., “Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12: 287-292 (1999).

Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., Gill, S. H., “*In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*”, *International Journal of Food Microbiology*, 67: 207-216 (2001).

Greene, C. M., “MicroRNA expression in cystic fibrosis airway epithelium”, *Biomolecules*, 3: 157-167 (2013).

Grivennikov, S., Karin, M., “Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis?”, *Cancer Cell*, 13 (1): 7-9 (2008).

Haagerup, A., Bjerke, T., Schiøtz, P. O., “Atopic dermatitis: a total genome scan for susceptibility genes”, *Acta Dermato-Venereologica*, 84: 346-352 (2004).

Habtemariam, S., “Targeting the production of monocytes/macrophages-derived cytokines by anti-inflammatory herbal drugs”, *Phytopharmacology*, 4 (1): 131-148 (2013).

Hamilton-Miller, J. M., “The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 360-366 (2003).

Hara, M. R., Sachs, B. D., Caron, M. G., Lefkowitz R. J., “Pharmacological blockade of a β (2) AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model”, *Cell Cycle*, 12 (2): 219-224 (2013).

Hendon, S. E., Dipalma, J. A., “U.S. practices for colon cancer screening”, Division of Gastroenterology, *University of South Alabama College of Medicine*, Mobile, AL, USA, 54 (4): 179-183 (2005).

Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., Mikes, Z., “One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels”, *Bratislava Medical Journal*, 106: 67-72 (2005).

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., “Supernatant of *Bifidobacterium breve* includes dendritic cell maturation, activation and survival through a toll like receptor 2 pathway”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117: 696-702 (2006).

Hong, H. A., Huang, J. M., Khaneja, R., Hiep, L. V., Urdaci, M. C., Cutting, S. M., “The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics”, *Journal of Applied Microbiology*, 105 (2): 510-520 (2008).

Horuk, R., ‘‘Survey chemokine receptors’’, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 12: 313-335 (2001).

Howarth, G. S., Wang, H., ‘‘Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health, *Nutrients*, 5: 58-81 (2013).

Hirayama, K., Rafter, J., ‘‘The role of probiotic bacteria in cancer prevention’’, *Microbes and Infection*, 2 (6): 681-686 (2000).

Huang, Y., Adams, M. C., ‘‘An *in vitro* model for investigating intestinal adhesion of potential dairy propionibacteria probiotic strains using cell line C2BBel’’, *Applied Microbiology*, 36 (4): 213-216 (2003).

Huang, J., Wang, M. D., Lenz, S., Gao, D., Kaltenboeck, B., ‘‘IL-12 administered during chlamydia psittaci lung infection in mice confers immediate and long-term protection and reduces macrophage inflammatory protein-2 level and neutrophil infiltration in lung tissue’’, *The Journal of Immunology*, 162: 2217-2226 (1999).

Imaoka, A., Shima, T., Kato, K., Mizuno, S., Uehara, T., Matsumoto, S., Setoyama, H., Hara, T., Umesaki, Y., ‘‘Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells’’, *World Journal of Gastroenterology*, 14 (16): 2511-2516 (2008).

İnternet: ‘‘Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü’’
<http://praxis-kwasniok.de> (2013).

İnternet: ‘‘Enterosit farklılaşmasının temel karakterini gösteren HT-29 ve Caco-2 hücreleri’’ <http://www.lgcstandards-atcc.org> (2013).

İnternet: ‘‘Genetik değişikliklerin birikmesi sonucu kanser oluşumu’’
<http://www.cancer.gov> (2013).

İnternet: ‘‘HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarının karşılaştırılması’’
<http://www.lgcstandards-atcc.org> (2013)

İnternet: ‘‘Kanserin genetik oluşumu’’
<http://totalvue.com> (2013).

İnternet: ‘‘Kolonda tümör dokusu’’
<http://www.cancer.gov> (2013).

İnternet: ‘‘Kolonun bölümleri’’
<http://www.dogaltedavi.net> (2013).

İnternet: “*Lactobacillus* sp. bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü” <http://www.dribrook.blogspot.com> (2013).

Kailasapathy, K., Chin, J., “Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.”, *Immunology and Cell Biology*, 78: 80-88 (2000).

Kaleli, İ., “Probiyotiklerin etki mekanizması”, *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 21 (2): 238-242 (2007).

Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E., “Probiotics in primary prevention of a topic disease: a randomised placebo controlled trial”, *Lancet*, 357 (9262): 1076-1079 (2001).

Kao, Y. T., Liu, Y. S., Shyu, Y. T., “Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis”, *Food Research International*, 40: 71-79 (2007).

Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A., “Probiotics: potential pharmaceutical applications”, *European Journal of Pharmacology*, (1): 1-9 (2002).

Kav, S, Hanoğlu, Z., Algier, L., “Türkiyede kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerinin kullanımı: literatür taraması”, *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 18 (1): 32-8 (2008).

Kay, A. B., “Allergy and allergic diseases”, *The New England Journal of Medicine*, 344: 30-37 (2001).

Ketlinskii, S. A., Prokop’eva, E. D., Prokop’ev, A. A., Artiukhov, A. I., Pasechnik, V. A., “Mechanism of the anti-tumoral effect of the blastolysin fraction isolated from *Lactobacillus bulgaricus*”, *Voprosy Onkologii*, 33: 51-56 (1987).

Kinzler, K. W., Vogelstein, B., “Lessons from hereditary colorectal cancer”, *Cell*, 87: 159-170 (1996).

Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Salminen, S. J., “The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus”, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 167 (2): 185-189 (1998).

Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T., “Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*”, *International Journal of Food Microbiology*, 40: 169-175 (1998).

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., Hocevar, B. A., “Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis”, *Toxicol Pathol*, 38 (1): 96-109 (2010).

Klebanoff, M. A., Yip, R., “Influence of maternal birth weight on rate of fetal growth and duration of gestation”, *The Journal of Pediatrics*, 111 (2): 287-292 (1987).

Kocabaş, E., Sarıkçıoğlu, A., Aksaray, N., Seydaoğlu, G., Seyhun, Y., Yaman, A., “Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in the diagnosis of neonatal sepsis”, *The Turkish Journal of Pediatrics*, 49: 7-20 (2007).

Kodali, V. P., Sen, R., “Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium”, *Journal of Biotechnology*, 3: 245-251 (2008).

Kohlmeier, L., Simonsen, N., Mottus, K. “Environmental health issues”, *Environmental Health Perspectives Supplements*, 135 (1995).

Koller, V. J., Marian, B., Stidl, R., Nersesyan, A., Winter, H., Simic, T., Sontag, G., Knasmuller, S., “Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (4): 1221–1229 (2008).

Komaki, R., Paulus, R., Ettinger, D. S., Videtic, G. M. M., Bradley, J. D., Glisson, B. S., Langer, C. J., Sause, W. T., Curran, W. J., Choy, H., “Phase II study of accelerated high-dose radiotherapy with concurrent chemotherapy for patients with limited small-cell lung cancer: radiation therapy oncology group protocol 0239”, *International Journal of Radiation Oncology*, 83 (4): 531-536 (2012).

Kundu, N., Beaty, L. T., Jackson, M. J., Fulton, A. M., “Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer”, *The Journal of the National Cancer Institute*, 88 (8): 536-541 (1996).

Kundu, N., Walser, T. C., Ma, X., Fulton, A. M., “Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease”, *Cancer Immunology*, 54: 981-987 (2005).

Koontongkaew, S., “The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas”, *Journal of Cancer*, 4 (1): 66–83 (2013).

Kristal, L., Klein, P. A., “Atopic dermatitis in infants and children”, *Pediatric Clinics of North America*, 47: 877-895 (2000).

Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, Tiiu., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., “Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics”, *International Journal of Food Microbiology*, 72 (3): 215–224 (2002).

Kuroda, Y., “Antimutagenesis studies”, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms, *Basic Life Sciences*, Japan, 52: 1-22 (1990).

Lammers, K. M., Forsythe, P., Bienenstock, J., “Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha induced interleukin 8 expression”, *Infection and Immunity*, 72: 5308-5314 (2004).

Lammers, K. M., Helwig, U., Swennen, E., Rizzelo, F., Venturi, A., Caramelli, E., Kamm, M. A., Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M., “Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells”, *American Journal of Gastroenterology*, 97 (5): 1182-1186 (2002).

Lankaputhra, W. E. V., Shah, N. P., “Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids”, *Mutation Research*, 397: 169-182 (1998).

Larche, M., Robinson, D. S., Kay., A. B., “The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111: 450-463 (2003).

Lee, Y. K., Puong, K. Y., “Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate”, *British Journal of Nutrition*, 88: 101-108 (2002).

Leigh, J. A., Walker, C. G., “Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function”, *Trends in Genetics*, 10: 63–67 (1994).

Levinson, W., Jawetz, E., “Major histocompatibility complex and transplantation 5th edition”, *Medical Microbiology & Immunology*, Stanford, 126-173 (1998).

Lewis L.N., “Catalysis by colloids”, *Chem Inform Wiley Online Library*, 125-129 (1998).

Limdi, J. K., McLaughlin, J., “Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology?”, *World Journal of Gastroenterology*, 12 (34): 5447-5457 (2006).

Liu, C., Chu, F., Chou, C., Yu, R., “Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721: 157-162 (2011).

Liu, Z. H., Huang, M. J., Zhang, X. W., Wang, L., Huang, N. O., Peng, H., Lan, P., Peng, J. S., Yang, Z., Xia, Y., Liu, W. J., Yang, J., Qin, H. L., Wang, J. P., “The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97 (1): 117-126 (2013).

Ljungh, A., Wadström, T., “Lactic acid bacteria as probiotics”, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7:73-90 (2006).

Lo, P. R., Yu, R. C., Chou, C. C., Huang, E. C., ‘‘Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo [a] pyrene by a modified Ames test’’, *International Journal of Food Microbiology*, 93: 249-257 (2004).

Maassen, C. B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., den Bak-Glashouwer, M. J., Leer, R. J., Laman, J. D., ‘‘Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains’’, *Vaccine*, 18 (23): 2613-2623 (2000).

MacFarlane, G. T., Gibson, G., ‘‘Microbiological aspects of the production of short chain fatty acids in the large bowel’’, In *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 87-107 (1995).

Macpherson, A. J., Harris, N. L., ‘‘Interaction between commensal intestinal bacteria and the immune system’’, *Nature Reviews Immunology*, 4: 478-485 (2004).

Madsen, K., ‘‘Probiotics and the immune response’’, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40 (3): 232-234 (2006).

Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jüpon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C., ‘‘Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function’’, *American Journal of Gastroenterology*, 121: 580-591 (2001).

Marshall, V. M., Rawson, H. L., ‘‘Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt’’, *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 137-143 (1999).

Marteau, P., Jian, R., ‘‘Probiotics and health: new facts and ideas’’, *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 486-489 (2002).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M., ‘‘Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring’’, *Biochimie*, 88: 1515-1531 (2006).

Medina, M., Izquierdo, E., Ennahar, S., Sanz, Y., ‘‘Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications’’, *Clinical and Experimental Immunology*, 150: 531-538 (2007).

Michail, S., ‘‘The role of probiotics in allergic diseases’’, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 5 (1): 5 (2009).

Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K., ‘‘Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria’’, *Infection and Immunity*, 64 (12): 5403-5405 (1996).

Mital, B. K., Garg, S. K., “Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*”, *Critical Reviews in Microbiology*, 21 (3): 174–214 (1995).

Mizutani, T., Mitsuoka, T., “Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/He male mice”, *Journal of the National Cancer Institute*, 63: 1365–1370 (1979).

Mizutani, T., Mitsuoka, T., “Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/He male mice”, *Cancer Letters*, 11: 89-95 (1980).

Molassiotis, A., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, J. A., Panteli, V., Margulies, A., Browall, M., Magri, M., Selvekerova, S., Madsen, E., Milovics, L., Bruyns, I., Gudmundsdottir, G., Hummerston, S., Ahmad, A. M., Platin, N., Kearney, N., Patiraki, E., “Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey”, *Annals of Oncology*, 16: 655–663 (2005).

Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A. C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K., Kurisaki, J., “Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion”, *Microbiology & Immunology*, 46 (4): 293-297 (2002).

Mosaffa, F., Behravan, J., Karimi, G., Iranshahi, M., “Antigenotoxic effects of *Satureja hortensis* L. on rat lymphocytes exposed to oxidative stress”, *Archives of Pharmacal Research*, 29 (2): 159-164 (2006).

Naidu, A. S., Clemens, W. R., Bidlack, R. A., “Probiotic spectra of lactic acid bacteria”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 13-126 (1999).

Nessler, S., “Crystallization of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*”, *Journal of Molecular Biology*, 235: 370-371 (1994).

Ning, Y., Manegold, P. C., Hong, Y. K., “Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models”, *Journal of Cancer*, 128 (9): 2038-2049 (2011).

Noroozi, S., Mosaffa, F., Soltani, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghghi, F., Behravan, J., “Antigenotoxic effects of the disulfide compound persicasulfide A (PSA) on rat lymphocytes exposed to oxidative stress”, *Planta Medica*, 75 (1): 32-6 (2008).

Novak, N., Bieber, T., “The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53 (2): 171-176 (2005).

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., Boerkoel, C. F., “Tibbi genetik”, *Güneş Yayınevi*, Türkiye, 311-312 (2005).

Cooper, G. M., "Oncogenes 2nd edition", *Jones and Barlett Publishers*, Sudbury, Massachusetts, 598-613 (1995).

Opal, S. M., DePalo, V. A., "Anti-inflammatory cytokines", *Chest Journal*, 117: 1162 -1172 (2000).

Oppenheim, J. J., Ruscetti, F. W., Faltynek, C., "Cytokines: basic and clinical immunology 8th edition", Stites D. P., Terr A. I., Parslow T. G., *Appleton and Lange*, Connecticut, California, 105 -123 (1994).

Oppenheim, J. J., Ruscetti, F. W., "Cytokines", Medical immunology 9th edition, Stites D. P., Terr A. I., Parslow T. G., *Appleton and Lange*, USA, 10: 162-164 (1997).

Ou, C. C., Ko, J. L., Lin, M. Y., "Antioxidative effects of intracellular extracts of yogurt bacteria on lipid peroxidation and intestine 407 cells", *Journal of Food and Drug Analysis*, 14 (3): 304-310 (2006).

Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., Seppo, S., "Probiotics: mechanisms and established effects", *International Dairy Journal*, 9: 43-52 (1999).

Öner, C., "Genetik kavramlar", *Palme Yayınevi*, Türkiye, 635-636 (2003).

Özden, A., "İnflamatuvar barsak hastalığında probiyotiklerin yeri", *Güncel Gastroenteroloji*, 12 (2): 121-127 (2008).

Özkan, T. B., "İnflamatuvar barsak hastalıkları", *Güncel Pediatri*, 1: 79-91 (2003).

Palencia, P. F., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Duenas, M. T., Irastorza, A., Corbi, A. L., Lopez, P., "Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- β -d-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus*", *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (14): 4887 (2009).

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O., "Development of the human infant intestinal microbiota", *Plos Biology*, 5 (7): 1556-1573 (2007).

Parham, P., "The immun system", *Garland Publishing*, Londra, 216 (2000).

Park, E., Jeon, K. I., Byun, B. H., "Ethanol extract of *Inonotus obliquus* shows antigenotoxic effect on hydrogen peroxide induced DNA damage in human lymphocytes", *Cancer Prevention Research*, 10: 54-59 (2005).

Pena, J. A., Versalovic, J., "Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide activated murine macrophages by a contact independent mechanism", *Cellular Microbiology*, 5: 277-285 (2003).

Perdigon, G., Fuller, R., Raya, R., "Lactic acid bacteria and their effect on the immune system", *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2 (1): 27-42 (2001).

Pisani, P., Parkin, D. M., Ferlay J., “Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985”, *International Journal of Cancer*, 54: 594-606 (1993).

Pool-Zobel, B. L., Munzner, R., Holzaapfel, H., “Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* mutagenicity assay”, *Nutrition and Cancer*, 20: 261-270 (1993).

Pool-Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scasellati-Sforzolini, R., Rowland, I. R., *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of rats, *Nutrition and Cancer*, 26: 365-380 (1996).

Pornare, E.W., Branch, W. J., Cummings, J. H., “Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood”, *The Journal of Clinical Investigation*, 75: 1448-1454 (1985).

Precott, S. L., Dunstan, A., Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., Richmond, P., “Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon- γ responses in very young children with atopic dermatitis”, *Clinical and Experimental Allergy*, 35: 1557-1564 (2005).

Pritchard C. C., Grady, W. M., “Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice”, *Gut*, 60 (1): 116-29 (2011).

Rahman, M., Kim, W., Kumura, H., Shimazaki, K., “Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1593-1598 (2007).

Raipulis, J., Toma, M. M., Semjonovs, P., “The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone”, *International Journal of Food Microbiology*, 102: 343-347 (2005).

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., McCormick, J. K., “Potential uses of probiotics in clinical practice”, *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 658-672 (2003).

Riedel, C.U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B.J., Blum, S., “Antiinflammatory effects of Bifidobacteria by inhibition of LPS induced NF- κ B activation”, *Gastroenterology*, 12 (23): 3729-3735 (2006).

Risberg, T., Kaasa, S., Wist, E., Melsom, H., “Why are cancer patients using non-proven complementary therapies? a cross-sectional multicentre study in Norway”, *European Journal of Cancer*, 33 (4): 575-80 (1997).

Roberfroid, M. B., “Prebiotics and probiotics: are they functional foods?”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1682S-1687S (2000).

Rolfe, R. D., “The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health symposium probiotic bacteria implications for human health”, *The Journal of Nutrition*, 130: 396-402 (2000).

Romagnani, S., “The role of lymphocytes in allergic disease”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105: 399–408 (2000).

Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E. E., Flavell, R. A., Manz, M. G., “Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential from medicine”, *Annual Review of Immunology*, 31: 635-674 (2013).

Ross, D. W., “Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine”, *Springer*, USA, 29-123 (1998).

Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T., Lievens, L. C., “Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats”, *Carcinogenesis*, 19: 281-285 (1998).

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, G., Salminen, S., “Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from “villi” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus”, *Journal of Dairy Science*, 89: 2355-2358 (2006).

Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Pérez, P. F., Abraham, A. G., “Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells”, *Journal of Applied Microbiology*, 109 (6): 2079-2086 (2010).

Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., Bhoola, K., “Colon cancer: genomics and apoptotic events”, *Journal of Biological Chemistry*, 385: 449-464 (2004).

Saito, T., “Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods”, *Animal Science Journal*, 75 (1): 1-13 (2004).

Samlaska, C. P., Winfield, E. A., “Pentoxifylline”, *Journal of the American Academy*, 603-621 (1994).

Sanders, M. E., “Lactic acid bacteria as promoters of human health in functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals”, *Chapman & Hall*, New York, 294–322 (1994).

Sandıkçı, M. Ü., Köksal F., “Helikobakter enfeksiyonları”, Topçu, A., Söyletir G., Doğanay M., Enfeksiyon hastalıkları, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 1005-1009 (1996).

Sartor, R. B., “Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics”, *Gastroenterology*, 126 (6): 1620-133 (2004).

Schiffrin, E.J., Blum, S., “Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa”, *European Journal of Clinical Nutrition*, 3: 60-64 (2002).

Schurr, M. J., “Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, psl or alginate?”, *Journal of Bacteriology*, 2-16 (2013).

Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T., Hashimoto, Y., “A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice”, *Cancer Research*, 45: 1300–1307 (1985).

Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Toida, T., Kasashima, T., Kataoka, T., Hashimoto, Y., “Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vivo* immuneresponses in mice”, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 16: 589–609 (1994).

Servin, A. L., Coconnier, M. H., “Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens”, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (5): 741-754 (2003).

Sheil, B., Shanahan, F., O’Mahony, L., “Probiotic effects on inflammatory bowel disease”, *The Journal of Nutrition*, 137 (3): 8195-8245 (2007).

Shoji, M., Yukitake, H., Sato, K., Shibata, Y., Naito, M., Aduse-Opoku, J., Abiko, Y., Curtis, M. A., Nakayama, K., “Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*”, *Microbiologyopen*, 2 (3): 383-401 (2013).

Sillanpaa, J., “Tissue –adherence in lactic acid bacteria identification and characterization of the collagen-binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*”, *Academic Disseration in General Micbiology*, 1-57 (2001).

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Experimental Cell Research*, 175 (1): 184 -191 (1988).

Soffler, C. “Oxidative stress”, *The Veterinary Clinics of North America*, 23 (1): 135-157 (2007).

Solga, S. F., “Probiotics can treat hepatic encephalopathy”, *Medical Hypotheses*, 61 (2): 307-313 (2003).

Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghghi, F., Behravan, J., “Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress”, *Cell Biology Toxicology*, 25: 291-296 (2009).

Somogyi, A., Rotsa, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G. “Antioxidant measurements”, *Physiological Measurements*, 28 (4): 41-55 (2007).

Sondhi, N., Bhardwaj, R., Kaur, S., Chandel, M., Kumar, N., Singh, B., “Inhibition of H₂O₂-induced DNA damage in single cell gel electrophoresis assay (comet assay) by castasterone isolated from leaves of *Centella Asiatica*”, *Health*, 2 (6): 595-692 (2010).

Şekeroğlu Atlı, Z., Şekeroğlu, V., “Genetik toksisite testleri”, *Türk Bilim Araştırma Vakfı Bilim Dergisi*, 4 (3): 221-229 (2011).

Tadokera, R., Wilkinson, K. A., Skolimowska, K. H., Matthews, K., Seldon, R., Rangaka, M. X., Maartens, G., Wilkinson, R. J., “Role of the interleukin 10 family of cytokines in patients with immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV infection and tuberculosis”, *The Journal of Infectious Diseases*, 207 (7): 1148-1156 (2013).

Tahvanainen, J., Kylaniemi, M. K., Kanduri, K., Gupta, B., Lahteenmaki, H., Kallonen, T., Rajavuori, A., Rasool, O., Koskinen, P. J., Rao, K. V. S., Lahdesmaki, H., Lahesmaa, R., “Proviral integration site for moloney murine leukemia virus (PIM) kinases promote human T helper-1 cell differentiation”, *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (5): 3048-3058 (2013).

Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C., “Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56”, *Research in Microbiology*, 154 (10): 705-712 (2003).

Tamer, C. E., Karaman, B., Aydoğan, N., Çopur, Ö. U., “Bazı geleneksel fermente gıdalarımız ve sağlık üzerindeki etkileri”, *Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, Van, 58-96 (2004).

Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., Gong, J., Zhong, Z., Xu, Z., Dang, Y., Guo, J., Chen, X., Wang, Y., “Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs”, *Chinese Medicine*, 6 (1): 27 (2011).

Taylor, A. L., Hale, J., Wiltschut, J., Lehmann, H., Dunstan, J. A., Prescott, S. L., “Effects of probiotic supplementation for the first 6 months of life on allergen and vaccine-specific immune responses”, *Clinical & Experimental Allergy*, 36 (10): 1227-1235 (2006).

Tekinşen, O. C., Atasever, M., “Süt ürünleri üretiminde starter kültür”, *Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayını*, 150 (1994).

Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., Niamsup, P., “Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells”, *Biotechnology Letters*, 31: 571-576 (2009).

Tilg, H., Wilmer, A., Vogel, W., “Serum levels of cytokines in chronic liver diseases”, *Gastroenterology*, 103: 264-274 (1992).

Tomita, K., Akaza, H., Nomoto, K., Yokokura, T., Matsushima, H., Homma, Y., Aso, Y., “Influence of *Lactobacillus casei* on rat bladder carcinogenesis”, *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 85: 655–663 (1994).

Tsuda, H., Hara, K., Miyamoto, T., “Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S, *Journal of Dairy Science*, 91: 2960-2966 (2008).

Tunail, N., “Mikrobiyoloji”, *Pelin Ofset*, Ankara, 345-356 (2009).

Tuo, Y. F., Zhang, L. W., Yi, H. X., Zhang, Y. C., Zhang, W. Q., Han, X., Du, M., Jiao, Y. H., Wang, S. M., “Antiproliferative effect of wild *Lactobacillus* strains isolated from fermented foods on HT-29 cells”, *Journal of Dairy Science*, 93: 2362–2366 (2010).

Umetsu, D. T., Dekruyff, R. H., “Th1 and Th2 CD4⁺ cells in human allergic diseases”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100: 1–6 (1997).

Ushiyama, A., Tanaka, K., Aiba, Y., “*Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin resistant Hp infection”, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18: 986-991 (2003).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44–84 (2007).

Villarante, K. I., Elegado, F. B., Iwatani, S., Zendo, T., Sonomoto, K., Guzman, E., “Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 975–980 (2011).

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P., “Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation”, *Molecules*, 14 (7): 2535-2554 (2009).

Vural, N., “Toksikoloji”, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 115-124 (1996).

Xiao, J. Z., “Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokin elevels of Japanese cedar pollinosis during the polen season, a randomized double-blind, placebo-controlledtrial”, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16: 86-93 (2006).

Xie, K., “Interleukin-8 and human cancer biology”, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12: 375-391 (2001).

Wang, Q., Dong, J., Zhu, Y., “Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials”, *Journal of Pediatric Surgery*, 47 (1): 241-248 (2012).

Wang, B., Li, J., Chen, J., Huang, Q., Li, N., Li, J., “Effect of live *Lactobacillus plantarum* L2 on TNF- α -induced MCP-1 production in Caco-2 cells”, *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1-2): 237–241 (2010).

Wang, M. F., Lin, H. C., Wang, Y. Y., Hsu, C. H., “Treatment of perennial allergic rhiniti swith lactic acid bacteria”, *Pediatric Allergy and Immunology*, 15 (2): 152-158 (2004).

Ward, E., Cokkinides, V., Jemal, A., Samuels, A., “Colorectal cancer facts & figures”, *American Cancer Society*, 1-19 (2005).

Warren, A. J., Shields, P. G., “Molecular epidemiology: carcinogen-DNA adducts and genetic susceptibility”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216: 172-180 (1997).

Wataha, J. C., “Biocompatibility of dental casting alloys”, *Journal of Prosthetic Dentistry*, 83: 223-234 (2000).

Weiss, J. M., Sundar, S. K., Becker, K. J., Cierpial, M. A., “Behavioral and neural influences on cellular immune responses: effects of stress and interleukin-1”, *The Journal of Clinical Psychiatry*, 50: 43-53 (1989).

Welman, A. D., Maddox, I. S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends in Biotechnology*, 21: 269-274 (2003).

Wittig, B., Zeitz, M., “The gut as an organ of immunology”, *International Journal of Colorectal Disease*, 18 (3): 181-187 (2003).

Wolchok, J. D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J. S., Hamid, O., Lebbé, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R., Hodi, F. S., “Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria”, *Clinical Cancer Research*, 15: 7412-7420 (2009).

Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., Bierber, T., “Immuno morphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema”, *Journal of Investigative Dermatology*, 106: 446-453 (1996).

Wollenberg, A., Wagner, M., Gunther, S., “Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases”, *Journal of Investigative Dermatology*, 119: 1096-1102 (2002).

Wollowski, I., Ji, S. T., Bakalinsky, A. T., Neudecker, C., Pool-Zobel, B. L., “Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats”, *The Journal of Nutrition*, 129 (1): 77–82 (1999).

Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L., “Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 451-455 (2001).

Wu, M., Pan, T., Wu, Y., Chang, S., Chang, M., Hu, C., “Exopolysaccharide activities from probiotic bacterium: immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties”, *International Journal of Food Microbiology*, 144: 104-110 (2010).

Wyllie, A. H., “Apoptosis and carcinogenesis”, *European Journal of Biochemistry*, 73: 189-197 (1997).

Yan, F., Polk, D. B., “Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are”, *Current Opinion in Gastroenterology*, 20: 565-571 (2004).

Yan, F., Polk, D. B., “Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells”, *The Journal Biological Chemistry*, 277 (52): 50959-50965 (2002).

Yeşilova, Y., Sula, B., Yavuz, E., Uçmak, D., “Probiyotikler”, *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 21 (1): 49-56 (2010).

Yetişmeyen, A., “Süt teknolojisi”, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 1420: 1429 (1995).

Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., “Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerinde etkisi, VI. süt ve süt ürünleri sempozyumu (Süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)”, *Tebliğler Kitabı Rebel Yayıncılık*, 279-286 (2000).

Yücesan, S., “Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri”, *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2: 1-13 (2002).

Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., Neu, J., “Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha induced interleukin-8 production in Caco-2 cells”, *The Journal of Nutrition*, 135: 1752-1756 (2005).

Zhang, X. B., Ohta, Y., “*In vitro* binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice”, *Journal of Dairy Science*, 74: 752-757 (1991).

EKLER

EK-1. Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu



GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Bazı probiyotik bakterilerin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Belma ASLIM		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
		DiĞER <input type="checkbox"/>	Bireysel Araştırma Projesi	
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL <input checked="" type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN 5.Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	SİĞORTA	<input type="checkbox"/>		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 171	Toplantı tarihi: 25.04.2012
	<p>Üniversitemiz Fen Fakültesinde Prof.Dr.Belma Aslım'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Bireysel Araştırma Projesi olan klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.</p>	

ÇALIŞMA ESASI	ETİK KURUL BİLGİLERİ					
	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzları ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğuna dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ABI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk-Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

EK-1. (Devam) Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu

Prof.Dr.Füsun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Emiri TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz. Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Biroi DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Huk. Müş. Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : NİĞDELİOĞLU, Serap
Uyruğu : T. C.
Doğum tarihi ve yeri : 30.08.1987, Bor
Medeni hali : Bekar
Cep telefonu : 0 (531) 702 11 72
e-mail : serapnigdelioglu@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim birimi	Mezuniyet tarihi
P. Formasyon	Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (3,77/4)	2011
Lise	Hoca Ahmet Yesevi Lisesi	2005

Yabancı Dil

İngilizce