



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**ROTAVİRÜS NSP4 PROTEİNİ UYGULANAN CACO-2
HÜCRE HATTINDA *LACTOBACILLUS PLANTARUM*
BAKTERİYOSİNİNİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Merve ŞEN

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**ROTAVİRÜS NSP4 PROTEİNİ UYGULANAN CACO-
2 HÜCRE HATTINDA *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM BAKTERİYOSİNİNİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Merve ŞEN

Danışmanlar
Prof. Dr. Hüseyin TAŞLI
Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Daha çok antibakteriyel etkinlikleriyle bildiğimiz bakteriyosinlerin, terapötik ajan olarak Rotavirüs ya da diğer mikroorganizmaların neden olduğu enteritlerin önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabilirliğine yol gösterici olabileceği ve ileri muhtemel çalışmalara da bir zemin oluşturarak bakteriyosinlere farklı bir bakış açısı kazandırma fikrim değerli danışmanım Prof. Dr. Hüseyin TAŞLI tarafından desteklenerek TÜBİTAK 1002 ‘Hızlı Destek’ projesi haline getirilmiştir.

Doktora öğrencisi olarak hem ‘Proje Yürütücülüğü’ yapmış olmanın hem de ‘Star Araştırmacı Burs Programı’ ile bir lisans öğrencisine bilimsel katkı sağlama imkanı bulduğum 120S761 nolu proje akademik gelişimime önemli kazanımlar sağlamıştır.

İzmir, 26.09.2021

Merve ŞEN

Özet

Rotavirüs NSP4 Proteini Uygulanan Caco-2 Hücre Hattında *Lactobacillus plantarum* Bakteriyosininin Etkilerinin Araştırılması

Rotavirüs, bebeklerde ve küçük çocuklarda akut gastroenteritin başlıca nedenidir. Rotavirüs öncelikle enterositleri enfekte eder ve rotavirüs yapısal olmayan protein 4 (NSP4) tarafından uyarılan bağırsak hücrelerinde oluşan tahribat ve enterik sinir sisteminin aktivasyonu sebebiyle ishale neden olur. NSP4, rotavirüs ile enfekte hücrelerde gözlenen Ca^{+2} homeostazındaki değişikliklerden sorumlu ana proteindir. Bu çalışmada, Rotavirüs enfeksiyonlarında çeşitli mekanizmalarla özellikle diyareye ve enterositlerin tahribatına neden olan NSP4 proteini uygulanmış Caco-2 bağırsak hücre hattında *Lactobacillus plantarum* bakteriyosini olan plantarisin A'nın (PInA), hücre içi, hücre dışı kalsiyum miktarları ve antiinflamatuvar, proinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Nsp4 ve PInA, MTT hücre viabilite testi ile IC50 dozları belirlenerek Caco-2 bağırsak hücre hatlarına uygulandı. 3., 6., 12. ve 24. saatlerde proteinlerin hücre içi ve hücre dışı kalsiyum seviyeleri Kolorimetrik yöntem ile belirlendi. Belirtilen saatlerde proinflamatuvar/antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10) düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca belirtilen saatlerde sitokinlerin RT-PZR ile gen ekspresyon seviyelerine bakıldı.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre, Rotavirüs Nsp4'ün hücre içi ve hücre dışı kalsiyum seviyelerini zamana bağlı olarak arttırdığı, PInA'nın ise Nsp4 ile birlikte uygulamalarında bu durumu baskıladığı görüldü. Dolayısıyla PInA'nın viral enfeksiyonun erken dönemlerinde virüsün çoğalmak için kullandığı sitozolik kalsiyumu azaltma potansiyeline sahip olabileceği düşünüldü. PInA'nın etkileri değerlendirildiğinde, proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon ve protein düzeylerinde artışlar saptandı. Benzer şekilde PInA'nın antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'un hem gen ekspresyon hem de protein düzeyini arttırması, PInA'nın antiinflamatuvar etkisinin olabileceğini göstermiştir. Bu bakımdan in vivo çalışmalar

ile desteklendiği takdirde viral enteritlerin tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler; Bakteriyosin; Caco-2 hücre hattı; Lactobacillus plantarum; Rotavirüs; Rotavirüs yapısal olmayan protein 4; Plantarisin A



Abstract

Investigation of the Effects of *Lactobacillus plantarum* Bacteriocin on Caco-2 Cell Line Treated with Rotavirus NSP4 Protein

Rotavirus is the main cause of acute gastroenteritis in infants and young children. Rotavirus primarily infects enterocytes and causes diarrhea due to destruction of intestinal cells stimulated by rotavirus nonstructural protein 4 and activation of the enteric nervous system. NSP4 (Rotavirus nonstructural protein 4) is the main protein responsible for the changes in Ca^{+2} homeostasis observed in rotavirus-infected cells. In this study, the effects of *Lactobacillus plantarum* bacteriocin plantaricin A (PlnA) on intracellular and extracellular calcium amounts and anti-inflammatory, proinflammatory cytokine levels in Caco-2 intestinal cell line treated with NSP4 protein, which causes diarrhea and destruction of enterocytes by various mechanisms in rotavirus infections. has been researched.

IC50 doses of Nsp4 and PlnA proteins were determined by MTT cell viability test and applied to Caco-2 intestinal cell lines. Intracellular and extracellular calcium levels of proteins were determined by Colorimetric method at 3.,6.12. and 24 hours. In addition, gene expression levels of proinflammatory / anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10) were measured by RT-PCR and protein levels by ELISA at the indicated hours.

According to the findings obtained in the study, it was thought that Rotavirus Nsp4 protein increased intracellular and extracellular calcium levels depending on time, while PlnA suppressed this situation in its co-administration with Nsp4, therefore it was thought that it might have the potential to reduce the cytosolic calcium used by the virus to multiply in the early stages of viral infection. When the effects of PlnA were evaluated, increases in proinflammatory gene expression levels and protein levels were detected. Similarly, the fact that PlnA increased both gene expression levels and protein levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 showed that PlnA could have an anti-inflammatory effect. In this respect, it has been concluded that if

it is supported by in vivo studies, it may have the potential to be used as a therapeutic agent in the treatment of viral enteritis.

Keywords; Bacteriocin; Caco-2 cell line; *Lactobacillus plantarum*; Rotavirus; Rotavirus nonstructural protein 4; Plantaricin A



İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler.....	VII
II	
Tablolar Dizini.....	X
Grafikler Dizini.....	XI
Kısaltma	
Listesi.....	XIII
1.Giriş.....	1
2.Genel Bilgiler.....	4
2.1. Rotavirüsler.....	4
2.1.1. Rotavirüs Yapısı ve Proteinleri.....	5
2.1.2. NSP4 Özellikleri.....	7
2.1.3. Rotavirüsün Kalsiyum Regülasyonu Üzerine Etkileri.....	7
2.1.4. Rotavirüs Enfeksiyonları.....	8
2.1.5. Rotavirüs Enfeksiyonlarında Patogenez.....	9
2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
2.2.1. Plantarisin A.....	11
2.3. Antimikrobiyal Peptidler.....	11
2.4. Bakteriyosinler.....	12
2.4.1. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması.....	13
3.Gereç ve Yöntem.....	4
3.1. Gereç.....	15
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler.....	15
3.1.2. Rekombinant Proteinler.....	15
3.1.3. Diğer Madde ve Malzemeler.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Hücre Kültürü.....	17
3.2.2.1. Hücrelerin Ekilmesi.....	17
3.2.2.2. Hücre Pasajı.....	17
3.2.2. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi ile IC50 Doz Belirleme Çalışmaları...18	

3.2.3. Rotavirüs NSP4 ve Plantarisin A (PlnA) Uygulamaları.....	19
3.2.4. ELISA Yöntemi ile Proinflamatuvar/Antiinflamatuvar Sitokinlerin Protein Düzeylerinin Tayini	19
3.2.4.1. Lizatların Hazırlanışı.....	20
3.2.4.2. BCA (Bikinkoninik Asit) Protein Ölçüm Yöntemi ile Total Protein Tayini.....	20
3.2.4.3. ELISA Yöntemi ile IL-1 β Miktar Tayini.....	22
3.2.4.4. ELISA Yöntemi ile TNF- α Miktar Tayini.....	23
3.2.4.5. ELISA Yöntemi ile IL-10 Miktar Tayini.....	24
3.2.4.6. ELISA Yöntemi ile IL-6 Miktar Tayini.....	25
3.2.5. Kolorimetrik Yöntem ile Kalsiyum (Ca) Miktar Tayini.....	26
3.2.6. Bazı Antiinflamatuvar ve Proinflamatuvar Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Analizleri.....	27
3.2.6.1. Total RNA İzolasyonu.....	27
3.2.6.2. cDNA Sentezi.....	27
3.2.6.3. Gerçek Zamanlı RT-PZR.....	29
3.2.7. Veri Analizi.....	30
4. Bulgular.....	31
4.1. NSP4 ve PlanA için IC50 Dozlarının Belirlenmesi.....	31
4.2. Kolorimetrik Yöntem ile Hücre İçi Kalsiyum Miktarının Belirlenmesi.....	31
4.3. Kolorimetrik Yöntem ile Hücre Dışı Kalsiyum Miktarının Belirlenmesi.....	34
4.4. IL-10 'un Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	37
4.5. IL-6 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	40
4.6. TNF- α 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	43
4.7. IL-1 β 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	46
4.8. IL-10 'un Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	49
4.9. IL-1 β 'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	50
4.10. IL-6'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	51

4.11. TNF- α 'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi.....52

Tartışma	544
Sonuç ve Öneriler	59
Kaynaklar	65
Ekler	80
Teşekkür	81
Özgeçmiş	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



Tablolar Dizini

Tablo 1. Rotavirüs proteinleri.....	5
Tablo 2. Primer dizileri.....	16
Tablo 3. Çalışma grupları.....	19
Tablo 4. BCA standartları.....	21
Tablo 5. IL-1 β standartları.....	22
Tablo 6. TNF- α standartları.....	24
Tablo 7. IL-10 standartları.....	25
Tablo 8. IL-6 standartları.....	26
Tablo 9. cDNA reaksiyon bileşenleri.....	27
Tablo 10. cDNA ısı ve süre döngüsü.....	28
Tablo 11. PZR ısı ve süre döngüleri.....	29
Tablo 12. Hücre içi kalsiyum miktarı.....	32
Tablo 13. Hücre dışı kalsiyum miktarı.....	35
Tablo 14. IL-10 protein düzeyleri.....	38
Tablo 15. IL-6'nın protein düzeyleri	40
Tablo 16. TNF- α 'nın protein düzeyleri.....	43
Tablo 17. IL-1 β 'nın protein düzeyleri.....	46

Grafikler Dizini

Grafik 1. Hücre içi kalsiyum miktarı	33
Grafik 2. Hücre dışı kalsiyum miktarı	36
Grafik 3. IL-10 protein düzeyi	39
Grafik 4. IL-6'nın protein düzeyi	42
Grafik 5. TNF- α 'nın protein düzeyi	45
Grafik 6. IL-1 β 'nın protein düzeyi	48
Grafik 7. IL-10'un mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri.....	49
Grafik 8. IL-1 β 'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri.....	50
Grafik 9. IL-6'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri.....	52
Grafik 10. TNF- α 'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri.....	53

Kısaltma Listesi

AMP	: Antimikrobiyal peptidler
Ca	: Kalsiyum
Caco-2	: İnsan kolorektal adenokarsinom hücreleri
CFTR	: Fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici
dsRNA	: çift sarmallı RNA
ENS	: Enterik sinir sistemi
eNSP4	: Ekstraselüler yapısal olmayan protein 4
ER	: Endoplasmik retikulum
FBS	: Fötal buzağı serumu
IBD	: İnflamatuar bağırsak hastalığı
ICAM	: Hücreler arası adezyon molekülü
IP3	: İnositol trifosfat
LAB	: Laktik asit bakterileri
NSP4	: Yapısal olmayan protein 4
PLC	: Fosfolipaz C
PlnA	: Plantarisin
RA	: Romatoid artrit
RV	: Rotavirüs
SA	: Sialik asit
SOCE	: Hücre içine kalsiyum girişi
STIM 1	: Stromal etkileşim molekülü 1
TLP	: Üç katmanlı parçacık
UPR	: Katlanmış protein yanıtı

VCAM

: Vasküler hücre adezyon molekülü



1. Giriş

Akut gastroenteritler, çocuklarda morbidite ve mortalitenin en sık nedenleri arasında yer almaktadır. Salgınlara yol açabilmeleri nedeniyle önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

Rotavirüs çocuklarda en yaygın viral gastroenterit etkeni olup ağır ishalleri neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Nisan 2016'da yayımladığı raporda, rotavirus enfeksiyonu nedeniyle 2000 yılında 528 000, 2013 yılında 215 000 çocuğun kaybedildiği belirtilmiştir (World Health Organization [WHO], 2016).

Aşı çalışmalarıyla morbidite ve mortalitede önemli düşüşler görülsede, ABD'de rotavirusa bağlı yıllık morbidite ve mortalitenin sağlık sistemine maliyeti 319 milyon dolar, topluma maliyeti ise 893 milyon dolar olarak bildirilmektedir (Kocabaş ve Timurtaş Dayar, 2015). Bu yüzden, rotavirus gastroenteritlerinin önlenmesi ve azaltılmasıyla ilgili yeni yaklaşımların geliştirilmesi önemlidir.

Rotavirüs 100'den fazla virus partikülünün fekal-oral yolla alınarak enfeksiyon oluşturabilen, daha çok çocuklarda ve yeni doğanlarda ishalleri neden olabilen enterik bir virüstür. Rotavirüs enfeksiyonlarında yapısal olmayan protein 4'ün (NSP4) etkisiyle malabsorpsiyon, hücre permeabilitesinde ve klorid sekresyonunda değişiklikler, enterosit hasarı ve ishal gerçekleşir (Akkutay Yoldar ve Alkan, 2019).

Probiyotiklerin antiviral etki gösterdiğine dair literatür verilerine sıklıkla rastlanılmaktadır. Bakteriyosinlerin ise literatür verilerinde her ne kadar yaygın bir biçimde antibakteriyel ajanlar olarak bilinse de antiviral etkinlikte olabilecekleri de vurgulanmaktadır (Drider, Bendali, Naghmouchi, Chikindas, 2016; Quintero-Gil, Parra-Suescún, Lopez-Herrera, Orduz, 2017).

Bakteriyosinogenik hücreler, bağışıklık proteinleri aracılığıyla kendilerini kendi bakteriyosinlerinden (kendi kendine bağışıklık) korurlar (Drider, Bendali, Naghmouchi, Chikindas, 2016; Kjos ve diğerleri).

Laktik asit bakterileri (LAB) bakteriyosinleri, kendileriyle ilişkili olan ve olmayan türlere karşı, *Escherichia coli* ve *Campylobacter jejuni* gibi dar spektrumlu ya da geniş spektrumlu etki gösterebilir (Messaoudi ve diğerleri, 2011; Quintero-Gil, Parra-Suescún, Lopez-Herrera, Orduz, 2017).

LAB bakteriyosinleri, normalde 10^2 - 10^3 kat daha düşük aktiviteye sahip olan ökaryotik hücreler tarafından üretilen antimikrobiyal peptitlerin aksine, nanomolar konsantrasyonlarda aktif olan bakterileri öldürme veya inhibe etme yeteneğine sahiptir (Jennsen, Hamill ve Hancock, 2006).

LAB bakteriyosinleri, mikroorganizmaların sitoplazmik membranlarında, gözenek oluşturularak, hücre içi bileşenlerin ve hayati metabolitlerin hücreden çıkışını sağlayan bir mekanizma ile etki eden katyonik peptitlerdir. LAB bakteriyosinleri genellikle ökaryotik hücrelere karşı sitotoksik değildir (Belguesmia ve diğerleri, 2011; Das ve Goyal, 2014).

Rotavirüs ile ilgili yapılan çalışmalarda LAB probiyotiklerinin enterik viral enfeksiyonlara karşı olumlu etkileri tespit edilirken, bazı LAB suşlarının, konakçı immünesini uyardığı veya inflamasyonu modüle ettiği bildirilmiştir (Maragkoudakis ve diğerleri, 2010).

Literatür verilerinde probiyotiklerin ve metabolitleri olan bakteriyosinlerin enfeksiyonları engelleme veya azaltma yönünde olumlu etkileri olduğu açıktır. Ancak hangi mekanizmalarla bu etkileri gerçekleştirdiği çok fazla bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus plantarum*'un anti-rotaviral etkiye sahip olduğu

belirtilirken bunu hangi mekanizmalarla yaptığı gizemini korumaktadır (Kiyoung ve diğeri, 2017).

Çeşitli klinik çalışmalar canlı bakteri kullanımının akut inflamasyon ve artmış mortalite gibi olumsuz etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (Klaenhammer ve diğeri, 2012; Tsilingiri ve diğeri, 2012). Bu sebeplerle çalışmada *L. plantarum* yerine bakteriyosininin kullanımı düşünülmüştür.

Çalışmanın amacı; Rotavirüs enfeksiyonlarında, NSP4'e bağlı enterosit harabiyeti ve olumsuz etkilerini yeni bir terapötik ajanla engellemeye öncülük etmek, rotavirüs enfeksiyonlarına yeni bir yaklaşım getirmektir.

Bu tezde; literatür verilerine göre Rotavirüs enfeksiyonlarında çeşitli mekanizmalarla özellikle diyareye ve enterositlerin tahribatına neden olan NSP4 proteini uygulanmış insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattında (Caco-2), *L. plantarum* bakteriyosinin, hücre içi, hücre dışı kalsiyum (Ca^{+2}) miktarları ve antiinflamatuvar, proinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Rotavirüsler

Rotavirüsler (RV) Reoviridae ailesi içinde yer alır ve insanlarda, hayvanlarda, kuş türlerinde akut viral ishalin birincil etkenleri olarak bilinmektedirler (World Health Organization [WHO], 2018).

Rotavirüsler, 11 segmentli çift sarmallı RNA'dan (dsRNA) oluşan genomun üç eş merkezli kapsidle sarıldığı karmaşık yapıya sahip zarfsız virüslerdir (Crawford ve diğerleri, 2017). Rotavirüsün 11 segmentli RNA'sının her segmentinden bir protein kodlanırken 11. segmentinden iki protein (NSP5 ve NSP6) kodlanır (Estes ve Cohen, 1989). Sonuç olarak, viral genomun 11 segmenti, altı yapısal olmayan protein (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 ve NSP6) ve altı yapısal viral protein (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 ve VP7) olmak üzere 12 proteini kodlar (Estes ve Cohen, 1989).

Virionun yapısal proteinleri, viral genom replikasyonu ve transkripsiyonu, hücre girişi, konakçı spesifitesi, antijenik spesifiklikler ve enzimatik fonksiyonlar ile ilişkili iken, yapısal olmayan proteinler, genom replikasyonunda ve virüsün doğal immün yanıtta kaçmasında hayati rol oynarlar (Estes ve Cohen, 1989).

Rotavirüsün en bulaşıcı beş serotipi; G1, G2, G3, G4 ve G9'dur (Clark ve diğerleri, 2004). Rotavirüsün G3 serotipi, 1994-1995 yılları arasında oldukça bulaşıcıyken, G9 serotipi 1995-1996'da, rotavirüs enfeksiyonu vakalarının % 50'sinden fazlasına sebep olmuştur (Clark ve diğerleri, 2004, O'Ryan, 2009). 1996'dan 1999'a kadar rotavirüs enfeksiyonlarına G1 ve G2 serotipleri neden olmuştur ve her iki serotip enfeksiyonların yaklaşık %50'sinden sorumlu bulunmuştur (Clark ve diğerleri, 2004, O'Ryan, 2009).

2.1.1. Rotavirüs Yapısı ve Proteinleri

Rotavirüs partikülü (virion) 3 protein katmanından oluşur ve üç katmanlı parçacık (triple-layered particle, TLP) olarak isimlendirilir. Elektron mikroskopisinde TLP'lerin tekerleğe benzetilmesiyle "Rota" ismini almıştır (Flewett ve diğerleri, 1974).

Rotavirüsler, VP6'nın serolojik reaktivitesi ve genetik değişkenliğine göre, en az 8 farklı gruba farklılaşmaktadır (Matthijnssens ve diğerleri, 2012). NSP1, RV proteinleri arasında en değişken olanıdır ve konakçı çeşitliliğini belirlemede yer alır (Broome ve diğerleri, 1993; Feng ve diğerleri, 2013).

Tablo 1. Rotavirüs proteinleri (Desselberger, 2014)

Segment	Protein	Lokalizasyon	Fonksiyon
1	VP1	Kor	ssRNA bağlanması; VP3 ile kompleks oluşturma
2	VP2	Kor	Korun dış yüzeyini oluşturma; RNA bağlanması
3	VP3	Kor	Guanililtransferaz; metiltransferaz; 2,5-fosfodiesteraz; ssRNA bağlanması; VP1 ile kompleks
4	VP4	Dış membran	Homotrimer; P tipi nötrleştirme antijeni; bağlanma proteini; proteaz gelişmiş enfektivite; virülans; hücre zarı ile füzyon.
5	NSP1	Yapısal olmayan	İnterferon antagonisti; E3 ligaz; RNA bağlanması.
6	VP6	Ara katman	Homotrimer; tür belirleyici; hücre içi nötrleştirme; transkripsiyon
7	VP7	Dış membran	Homotrimerik; glikoprotein; G tipi nötrleştirme antijeni; Ca ⁺² bağımlı.

8	NSP2	Yapısal olmayan	Oktamer; RNA ve NTPaz'ı bağlar; NDP kinaz; viroplazma oluşumu için gerekli yapısal olmayan dimer
9	NSP3	Yapısal olmayan	Viral ss (+) RNA'nın 3' terminaline bağlanır; hücresel eIF4G, Hsp90; PABP'nin yerini alır; konakçı proteini inhibe eder;translasyon
10	NSP4	Yapısal olmayan	Transmembran glikoprotein; viroporin; DLP'ler için hücre içi reseptör; viroplazmalar ve otofaji yolları ile etkileşim kurar; hücre içi Ca ⁺² seviyesini ve RNA replikasyonu modüle eder; enterotoksin; virulans
11	NSP5	Yapısal olmayan	Dimer; fosfo- ve O-glikosile protein; RNA bağlayıcı; kinaz; viroplazma oluşumu;VP2 ile etkileşim.
	NSP6	Yapısal olmayan	Viroplazmada lokalize NSP5 ile etkileşim.

Enfeksiyöz Rotavirüs parçacığı TLP'nin, VP4 spike proteini tarafından hücreyle etkileşimi sağlanır (Dormitzer ve diğerleri, 2002). VP4'ün alt birimi olan VP8, hücresel glikanlar üzerindeki sialik asit (SA) ile etkileşime girer (Dormitzer ve diğerleri, 2002). Bağlanmanın ardından penetrasyonun reseptör aracılı endositoz veya doğrudan membran penetrasyonu yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Ludert ve diğerleri, 1987).

Hücre zarlarında kolesterol ve GTPaz varlığı, bazı RV suşlarının girişi için gerekliyken, bazı RV suşları için gerekli değildir. (Sánchez-San Martín ve diğerleri, 2004). RV partikülleri, VP1'den oluşan viral RNA bağımlı RNA polimeraz ve viral kep enzimi olan VP3'ten oluşan kendi transkripsiyon komplekslerine sahiptir ve bu kompleksler VP2 kor proteininin iç yüzeyinde bulunur (Jayaram ve diğerleri, 2004).

Transkriptler, ya virüs tarafından kodlanmış proteinlerin translasyonu için (replikasyon döngüsünün erken döneminde) ya da replikasyon için (replikasyon döngüsünün sonlarında) RV neslinin dsRNA genomlarını oluştururlar (Silvestri, Taraporewala ve Patton, 2004). Enfeksiyonun sonraki aşamalarında (>4 saat) mRNA üretiminde logaritmik bir artış gözlenir (Desselberger, 2014).

2.1.2. NSP4'ün Özellikleri

Endoplazmik retikulumda bulunan ve bir transmembran protein olan NSP4'ün viral bir enterotoksin olduğu keşfedildi (Ball ve diğerleri, 1996).

Birden çok etkileri olan NSP4, DLP'lerin VP6 ile etkileşime girebilmesi için hücre içi reseptör görevi görür (Taylor, O'Brien ve Yeager, 1996). Hücre içi depo edilen Ca^{+2} nin serbest bırakılmasını sağlar (Tian ve diğerleri, 1994).

NSP4, otofaji proteini LC3 ile birlikte lokalize olur ve viroplazmanın üzerini örter (Berkova ve diğerleri, 2006). NSP4 ile tetiklenen hücre içi Ca^{+2} artışı, otofajiye yol açan kinaza bağımlı bir yolu aktive eder (Crawford ve diğerleri, 2012; Crawford and Estes, 2013).

NSP4 proteini, RV enfeksiyonundan sonra erken dönemde, bir peptit parçası olarak veya tam bir molekül olarak salgılanır (Bugarcic ve Taylor, 2006; Zhang ve diğerleri, 2000). NSP4, enfekte olmayan bağırsak hücrelerinin bazolateral plazma membranlarında bulunan integrin $\alpha1\beta1$ ve $\alpha1\beta2$ reseptörleri ile etkileşir (Seo ve diğerleri, 2008). Aktive edilmiş integrin reseptörleri, hücre içi Ca^{+2} salımı ve ishal ile ilişkili olan yolları uyarır (Berkova ve diğerleri, 2006).

2.1.3. Rotavirüs'ün Kalsiyum Regülasyonu Üzerine Etkileri

Reoviridae ailesinin üyesi olan Rotavirüs (RV), hücrel Ca^{+2} seviyelerini yükselttiği gösterilen ilk virüslere aittir (Hyser ve Estes, 2015).

Kalsiyum (Ca^{+2}), ökaryotik sinyal iletim yollarının hücresel süreçlerini düzenlemek için kullandığı moleküllerden biridir. Virüslerin replikasyonlarını kolaylaştırmak için Ca^{+2} kullanması, hücresel süreçleri modüle eden Ca^{+2} sinyal iletişimde düzensizliklerin oluşmasına neden olduğundan patogeneizde rol almasını sağlar (Chang-Graham ve diğerleri, 2019).

Rotaviral enfeksiyonlarda RV yapısal olmayan protein 4 (NSP4), bir çok fonksiyonu ile Ca^{+2} homeostazını düzensizleştirir (Sastri, Crawford ve Estes, 2016). RV ile enfekte olan hücrelerin ER'ye lokalize olan NSP4, ER'de Ca^{+2} salgılayan, ER Ca^{+2} depolarını azaltan ve sitozolik Ca^{+2} da kalıcı bir artışa neden olan bir viroporindir (Chang-Graham ve diğerleri, 2019). ER'de azalan Ca^{+2} , Ca^{+2} sensörü olan stromal etkileşim molekülü 1'i (STIM1) aktive ederek plazma membranındaki depo tarafından işletilen "store-operated calcium entry" (SOCE) olarak adlandırılan kalsiyum giriş kanalları yoluyla sitozolik Ca^{+2} akışını etkinleştirir. RV ile enfekte hücreler, reseptör aracılı, inositol trifosfat (IP3) bağımlı Ca^{+2} sinyalini ortaya çıkaran bir ekstraselüler NSP4 (eNSP4) salgılar (Chang-Graham ve diğerleri, 2019).

2.1.4. Rotavirüs Enfeksiyonları

Rotavirüs 100'den fazla virus partikülünün fekal-oral yolla alınarak enfeksiyon oluşturabilen, daha çok çocuklarda ve yeni doğanlarda ishallerine neden olabilen enterik bir virüstür. Rotavirüs enfeksiyonlarında yapısal olmayan NSP4 viral proteininin etkileriyle malabsorpsiyon, hücre permeabilitesinde ve klorid sekresyonunda değişiklikler, enterosit hasarı ve ishal gerçekleşir (Akkutay Yoldar ve Alkan, 2019).

Rotavirüs enterosit tutulumu gösterir. Enfeksiyon sonrası hücre ölümünün gerçekleşmesi sekretorik kript hücrelerinin proliferasyonuna neden olarak lümen içinde sıvı ve elektrolit kaybına yol açmaktadır. Enterositlerle birlikte sindirim enzimlerinin de azalması karbonhidrat malabsorpsiyonu ve ishale neden olur. Ozmotik dengenin bozulmasından kaynaklanan bu ishale, NSP4 proteininin hücresel

permeabilite ve kalsiyum mobilizasyonunu etkilemesi ile sekretorik ishal de eklenir. NSP4 proteini bazı prostaglandin ve bazı sitokinleri uyararak sıvı sekresyonunu artırır (Ge ve diğeri, 2013; Settembre, Chen, Dormitzer, Grigorieff, Harrison, 2011).

2.1.5. Rotavirüs Enfeksiyonlarında Patogenez

Rotavirüsler enterositleri enfekte ederek hücre ölümünü indükler (Boshuizen ve diğeri, 2003). Hücre ölümünün en önemli nedeni enfekte hücrelerin apoptoza uğramasıdır (Chaibi ve diğeri, 2005; Superti ve diğeri, 1996). Rotavirüs enfeksiyonunun patogenez çalışmaları, kalsiyumun hücre apoptozuna yol açan olaylarda önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Chaibi ve diğeri, 2005). NSP4'ün kalsiyum homeostazını etkileyerek virüsün hem morfogenezinde hem de patogenezinde rolü olduğu bildirilmiştir (Zhang, Zeng, Morris, Estes, 2000). NSP4 proteini, bu proteinin enterotoksin özellikleri ile ilişkili fosfolipaz C'ye (PLC) bağlı mekanizma dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla sitosolik kalsiyumu önemli ölçüde artırır (amino asitler 114–135) (Brunet ve diğeri, 2000). Ancak, en önemli mekanizma bu proteinin viroporin özelliklerinin aracılık ettiği ER bozulması ve ardından sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonundaki artıştır (Hyser, Collinson-Pautz, Utama, Estes, 2010).

Yapılan bazı çalışmalarda, rotavirüsün NSP4 proteini yoluyla böcek ve memeli hücrelerinde hücre içi sitoplazmik Ca^{+2} seviyelerini arttırabildiği gösterilmiştir (Diaz ve diğeri, 2008; Tian ve diğeri, 1994). Ayrıca, ilgili çalışmalar rotavirüsün bu strateji ile apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açabileceğini göstermiştir (Halasz, Holloway, Coulson, 2010; Michelangel, Liprandi, Chemello, Ciarlet, Ruiz, 1995).

Rotavirüs kaynaklı diyarenin fizyopatolojisinin mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:

1. Enterositler içerisinde rotavirüs replikasyonu, malabsorptif veya ozmotik ishalin neden olduğu enterosit membran proteinlerinin metabolizmasının değişmesine neden olur (Cordle ve diğeri, 1991; Estes, Conner, Gilger, Graham, 1989).

2. Rotavirüs, hücre iskeletini ve hücrelerarası bağlantıları tahrip eden, paraselüler geçirgenliği artıran hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır (Hyser ve Estes, 2009; Ruiz, Cohen, Michelangeli, 2000).
3. Replikasyon alan rotavirus, kemirgenlerde fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) aracılı ishali indükleyen bir toksin olan NSP4'ü üretir (Angel, Tang, Feng, Greenberg, Bass, 1998).
4. Rotavirüs ayrıca enterik sinir sistemini (ENS) uyararak diyareye neden olur ve bağırsak hareketliliğini artırır. Enfeksiyonu olan çocuklarda ENS'yi inhibe edici ilaçların kullanılması bu mekanizmanın kanıtıdır (Estes, Kang, Zeng, Crawford, Ciarlet 2001; Lundgren ve Svensson, 2001; Ward, Rosen, Yuan, Saif, 1996).
5. Enterositlerin ölümü, malabsorptif ve ozmotik ishalin oluşmasına katkı sağlar (Ward, Rosen, Yuan, Saif, 1996).

2.2. *Lactobacillus plantarum*

Bağırsak mikrobiyotasında en yaygın olan kommensal bakteri türlerinden biri olan *L. plantarum*'un, bağırsak sağlığını arttırdığı ve bağırsak homeostazisini düzenlediği gösterilmiştir (Mattila-Sandholm ve diğerleri, 1999; Merk ve diğerleri, 2005).

L. plantarum'un ishal, irritabl bağırsak sendromu, kolesterol üzerindeki etkileri gibi birçok potansiyel sağlık yararı bildirilmiştir (Barreto ve diğerleri, 2014). *L. plantarum*'un hayvan çalışmalarında bağırsak bariyerini güçlendirdiği ve bağırsak geçirgenliğini azalttığı bilinmektedir (Mujagic ve diğerleri, 2017).

Çalışmalar, laktobasillerin kronik, psikolojik veya inflamatuvar stresi azalttığı gibi bakteriyel translokasyonu da önleyebileceğini bildirirken, laktobasillerin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Zareie ve diğerleri, 2006).

Lactobacillus plantarum, çeşitli habitatlarda bulunan, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından belirlenen genel olarak güvenli olarak tanınan bir bakteridir (Tanganurat

ve diğeri, 2009). Genellikle yoğurt, fermente sebzeler ve içecekler dahil olmak üzere gıda endüstrisi uygulamalarında kullanılır (Brinques ve Ayub, 2011).

2.2.1. Plantarisin A

Lactobacillus plantarum tarafından üretilen ve bir antimikrobiyal peptid olan plantarisin A (PlnA), üretildiği suşta bakteriyosin üretimini indükleyen bir peptid feromonudur (Diep ve diğeri, 1994; Hauge ve diğeri, 1998). PlnA, hücre membranı ile temas ettiğinde, feromon etkisini indükleyen reseptöre bağlanmadan önce α - heliks yapı oluşturarak membran lipidleri ile etkileşime girer (Kristiansen ve diğeri, 2005). Hücre membranında porlar oluşturarak ve transmembran potansiyelini ve pH azaltarak, hücre içeriğinin porlardan atılımını sağlar (Zhao ve diğeri, 2006). PlnA, sahip olduğu feromon özelliğiyle aşırı sentez edildiği takdirde kendi kendini indükleyebilir (Balciunas ve diğeri, 2013; Nes ve diğeri 2007).

2.3. Antimikrobiyal Peptidler

Antimikrobiyal peptitler (AMP), katyonik net yüklü ve amfifilik özelliklere sahip 12-100 amino asitten oluşan moleküllerdir ve sentezlenerek hücre dışı etki göstermeleri için salınırlar (Jenssen, Hamill ve Hancock, 2006; Rios ve diğeri, 2016). Çeşitli türler tarafından üretilirler ve çevredeki diğer mikropları öldürmek veya büyümesini engellemek için kullanılırlar (Jenssen, Hamill ve Hancock, 2006).

Bu güne kadar 1700'den fazla farklı AMP tanımlanmıştır ve bunlar, bakteriyel ve fungal membranların veya viral kapsüllerin hasar görmesi ve stabilizasyonu, inflamatuvar bölgelerde immün hücrelerin toplanması ve yara onarımının teşvik edilmesi ve anjiyogenez gibi farklı biyolojik etkilere aracılık etmektedirler (Jenssen, Hamill ve Hancock, 2006; Rios ve diğeri, 2016).

Antimikrobiyal peptitlerin, muhtemelen doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemleriyle birlikte, bağışıklık tepkilerinin hem kalitesini hem de etkinliğini arttırdığı görülmektedir (Hancock, 2001; Zhao ve Kinnunen, 2003).

Antimikrobiyal peptitler, in vitro koşullarda gram pozitif ve gram negatif bakterileri, mantarları, parazitleri, virüsleri ve hatta tümör hücrelerini hedef alan geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (Hancock ve Scott 2000).

Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteleri, konakçı tarafından üretilen, peptitler, lizozim ve fosfolipaz A2 gibi diğer benzer peptitlerle sinerjistik etki ile artabilir (Hancock ve Scott 2000; Zhao ve Kinnunen, 2003).

Aminoasit dizilimleri, boyutları, yükleri, diastereomerizmleri ve yapılarına bakılmaksızın çoğu antimikrobiyal peptit mikromolar konsantrasyon aralığında bakterileri öldürür, böylece reseptör aracılı olmayan bir etki mekanizmasını destekler (McElhaney ve Prenner, 1999).

2.4. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, diğer bakterilerin üremesini engelleyen, çeşitli bakteri grupları tarafından üretilen küçük AMP'lerdir ve antibiyotiklere dirençli patojenlere karşı önemli bir potansiyele sahiptirler (Miao ve diğerleri, 2014).

AMP'ler arasında hem gram pozitif hem de gram negatif bakteri türleri tarafından üretilen bakteriyosinler bulunur. AMP'ler gibi bakteriyosinler, diğer prokaryotların, özellikle aynı ortamdaki farklı bakteri türlerinin büyümesini inhibe eder veya öldürürler. Böylece bakteriyosin üreten bakteriler, diğer bakterilere karşı rekabetçi özellik kazanarak hayatta kalırlar (Preciado ve diğerleri, 2016; Zou ve diğerleri, 2018).

2.4.1. Bakteriyosinlerin Sınıflandırması

Bakteriyosinler, çok çeşitli olmalarından dolayı, moleküler kütle, aktivite, kimyasal yapı, ısı stabilitesi ve translasyon sonrası modifiye edilmiş amino asitlerin varlığı gibi çeşitli parametrelerle sınıflandırılabilir (Zou ve diğerleri, 2018).

İlk bakteriyosin sınıflandırma sistemi, 1993 yılında Klaenhammer tarafından önerilmiştir (Klaenhammer, 1993; Zou ve diğerleri, 2018).

Bakteriyosinleri 4 sınıfa ayıran Klaenhammer'e göre:

Sınıf I bakteriyosinler: Lantibiotikler olarak da adlandırılan bu grup, 5 kDa'dan daha düşük peptitlerden oluşmakta ve sıra dışı amino asitler olan lantiyonin ve / veya beta-metil lantiyonin içermektedir (Klaenhammer, 1993).

Sınıf II bakteriyosinler: Boyutları 10 kDa'dan küçüktür ve 100 °C ila 121 °C ısı stabilitesi bulunmaktadır. IIa, IIb ve IIc alt sınıflarına ayrılan bu sınıfın IIa üyesi, spesifik bir N-terminal sekansı (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) içeren *Listeria* aktif peptitlerden oluşmaktadır. Alt sınıf IIb, birbirine entegre edilmiş iki proteinli peptitten oluşan komplekslerden oluşmaktadır. Alt sınıf IIc ise, azaltılmış sistein kalıntıları içeren tiyol ile aktive edilmiş peptitlerden oluşmaktadır (Klaenhammer, 1993).

Sınıf III bakteriyosinler: Boyut olarak 30 kDa'dan daha büyük peptitlerden oluşurlar ve ısıya dayanıksızdırlar (Klaenhammer, 1993).

Sınıf IV bakteriyosinler: Karmaşıktırlar ve aktiviteleri için gerekli olan lipitler ve karbonhidratlar gibi bir veya daha fazla makromolekülden oluşmaktadırlar (Klaenhammer, 1993).

Son zamanlarda, bu sınıflandırma sistemi terk edilmiş ve bakteriyosinler artık 3 ana sınıfa ayrılmıştır (Kumariya ve diğerleri, 2019; Preciado ve diğerleri, 2016). Sınıf I bakteriyosinler, 19-50 amino asit içerir ve büyük ölçüde translasyon sonrası modifiye edilirler, bu da lantiyonin, beta-metiltiyonin, dehidrobutirin, dehidroalanin ve labionin gibi standart olmayan amino asit yapılarıyla sonuçlanır (Mathur ve diğerleri, 2015).

Sınıf I ayrıca, lantibiyotikler (Sınıf Ia), lantiyonin ve/veya beta-metiltiyonin amino asitler içeren bakteriyosinler, labirintopeptinler (Sınıf Ib), labionin ve amino

asit içeren bakteriyosinler, saktibiyotikler (Sınıf Ic), α -karbon bağlantılarına sistein kükürt içeren bakteriyosinler olarak gruplandırılır (Mathur ve diğerleri, 2015; Meindl ve diğerleri, 2010).

Sınıf II bakteriyosinler, küçük (<10 kDa), ısıya dayanıklı ve modifiye edilmemiş peptitler içerir. Sınıf II ayrıca pediosin benzeri bakteriyosinler (Sınıf IIa), iki peptitli bakteriyosinler (Sınıf IIb), dairesel bakteriyosinler (Sınıf IIc) ve doğrusal pediosin benzeri olmayan bakteriyosinler (Sınıf IId) olarak alt gruplara ayrılır.

Sınıf III bakteriyosinler genellikle büyük (>30 kDa) ısıya dayanıksız peptidler içerir ve bunlar hakkında çok az şey bilinmektedir (Radaica, Bispo de Jesus ve Kapilaa; 2020).

3. Gereç ve Yöntem

Rotavirüs NSP4 proteini uygulanan Caco-2 hücre hattında *Lactobacillus plantarum* bakteriyosininin (PInA), proinflamatuvar/antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyon seviyelerine, protein düzeylerine ve hücre içi/dışı kalsiyum miktarına etkilerini ölçmeye yönelik tekniklerin kullanıldığı deneysel bir çalışmadır. Rotavirüs NSP4 proteini ve PInA ticari olarak elde edildi.

Bu çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biological Industries)
2. Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich)
3. Glutamin (Biological Industries)
4. Penisilin-Streptomisin (Biological Industries)
5. Tripsin (Sigma-Aldrich)
6. Etil alkol (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Rekombinant Proteinler

1. Rekombinant *Lactobacillus plantarum* Bacteriocin plantaricin A (pInA) (MyBiosource) (Katalog No:MBS1189874)
2. Rekombinant Rotavirus A Non-structural glycoprotein 4 (NSP4) (MyBiosource) (Katalog No:MBS7115302)

Firma önerileri doğrultusunda; liyofilize haldeki her iki protein distile suda çözdürülüp, bir hafta içerisinde kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı.

3.1.3. Diğer Madde ve Malzemeler

1. BCA Protein Assay Kit (Takara) (Katalog No: #T9300A)
2. Human IL-1 beta ELISA Kit (MyBiosource) (Katalog No: MBS175901)
3. Human TNF alfa ELISA Kit (MyBiosource) (Katalog No: MBS267654)
4. Human IL-6 ELISA Kit (MyBiosource) (Katalog No: MBS261259)
5. Human IL-10 ELISA Kit (MyBiosource) (Katalog No: MBS2514677)
6. Calcium Colorimetric Assay Kit (Elabscience) (Katalog No: E-BC-K103-M)
7. RNA Purification Kit (GeneMatrix Universal)
8. OneScript Plus cDNA Synthesis Kit (abm) (Katalog No:G236)
9. Primer dizileri (Tablo 2)

Tablo 2. Primer dizileri

Hedef gen	Primer dizisi	Kaynak
β-aktin (F)	5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3'	(Li ve diğerleri, 2019)
β-aktin (R)	5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3'	
IL-1β (F)	5'-GGAGAATGACCTGAGCACCT-3'	(Mikirova ve diğerleri,
IL-1β (R)	5'-TTTGTTTTGTCTCCCCGCTG-3'	2017)
TNF-α (F)	5'-GAGTGACAAGCCTGTAGCCCA-3'	(Hsing ve diğerleri,
TNF-α (R)	5'-GCTGGTTATCTCTCAGCTCCACG-3'	2011)
IL-6 (F)	5'-GGTACATCCTCGACGG-3'	(Kato ve diğerleri,
IL-6 (R)	5'-GTGCCTCTTTGCTGCCTT-3'	2016)
IL-10 (F)	5'-CCACGCTTTCTAGCTGTT-3'	(Li, Liu ve Xie, 2016)
IL-10 (R)	5'-GAATCCCTCCGAGACACT-3'	

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada, insan kolorektal adenokarsinoma hücrelerinden elde edilen Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. Caco-2 hücre hattı Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması basamakları aşağıda verilmiştir.

3.2.2.1. Hücrelerin Ekilmesi

-180 °C azot tankında muhafaza edilen Caco-2 hücreleri, 37 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. Çözünen hücreler, içerisinde kültür ortamı bulunan bir tüpe aktarılarak 1000xg'de 3 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası çöken hücreler 25 cm² lik flasklarda kültüre edildi.

3.2.2.2. Hücre Pasajı

Hücreler %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal buzağı serumu (FBS) ve 5 mM glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildi. Hücreleri çoğaltmak amacıyla yaklaşık cm karede 4x10⁴ hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm² lik flasklara 3x10⁶ hücre, 20 ml besiyeri konarak 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Hücreler tripsinize edildikten sonra süspansiyon steril kapaklı tüplere aktararak 1600 rpm'de ve 25 °C'de 3 dakika santrifüj edilerek elde edilen peletin üzerine tüp hacminin yaklaşık 1/3'ü kadar taze besiyeri konarak pipet ile süspanse edildi. İşlem iki kez tekrarlandıktan sonra tüp hacmi taze besiyeri eklenerek 10 ml'ye tamamlandı ve iki adet 75 cm² lik flaska 5'er ml olacak şekilde ekim yapıldı.

Hücrelerin ml'deki sayısı, 20 µl hücre süspansiyonu ile 90 µl tampon (1xPBS + %1 FCS) ve 100 µl tripan mavisi eppendorf içinde karıştırılarak hemositometre üzerinde

belirlendi. Sayım esnasında beyaz renkli hücreler canlı, mavi renkli hücreler ölü olarak değerlendirildi.

3.2.2. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi ile IC50 Doz Belirleme Çalışmaları

MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil- tetrazolyum bromür) Hücre Viabilite Testi, güvenli, basit, uygun maliyetli olması nedeniyle hücre canlılıklarını belirlemek için kullanılan kolorimetrik yöntemlerden biridir. Bu testte, canlı hücreler sarı renkte olan tetrazolyum tuzunu tutar ve mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimleri sayesinde mor formazan kristallerine dönüştürülür (Nga ve diğerleri, 2020).

Nsp4 ve PlnA proteinleri için IC50 doz belirleme çalışmasının basamakları aşağıda verilmiştir.

1. 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 100 µl 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarıldı.
2. 37 °C’de 18 saat inkübe edilerek kuyucuk taban yüzeyini kaplamaları (%50-60 konfluent) sağlandı.
3. İnkübasyon sonucu hücrelere 0-0,01-0,05-0,1-0,2-0,5-1 nM konsantrasyonlarında Nsp4 eklenerek 37 °C de 24 saat inkübe edildi.
4. 0-0,1-0,5-1-5-10-15-20 µg/ml konsantrasyonlarında PlnA eklenerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildi.
5. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 1 µl MTT boyası (5 µg/ml) ilave edilerek ve hücreler 37 °C’de 2 saat daha inkübe edildi.
6. Bu süre sonunda hücrelerden MTT solusyonu uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
7. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyu ile belirlendi.

Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve IC50 dozlar Graphad Prism 9 programında hesaplandı.

3.2.3. Rotavirüs NSP4 ve Plantarisin A (PlnA) Uygulamaları

MTT Hücre Viabilite Testi ile IC50 dozlar belirlendi. Belirlenen dozlarda PlnA ve Nsp4, 3, 6, 12 ve 24 saat süre muamele edilmek üzere ayrı ayrı çalışma gruplarına uygulandı (Tablo 3). Uygulama süreleri tamamlanan gruplar sonlandırılarak ELISA ve PZR çalışmaları için uygun şekilde muhafaza edildi.

Tablo 3. Çalışma grupları

Gruplar	Protein Uygulama Süreleri
Kontrol (Uygulama yapılmayan Caco-2 hücreler)	(3-6-12-24 saat)
PlnA IC50 uygulanan Caco-2 hücreler	(3-6-12-24 saat)
Nsp4 IC50 uygulanan Caco-2 hücreler	(3-6-12-24 saat)
PlnA IC50+Nsp4 IC50 uygulanan Caco-2 hücreler	(3-6-12-24 saat)

3.2.4. ELISA Yöntemi ile Proinflamatuvar/Antiinflamatuvar Sitokinlerin Protein Düzeylerinin Tayini

ELISA, antijen-antikor reaksiyonlarını, enzim bağlı bir konjugat ve enzim substratı kullanılarak renk değişimi yoluyla gösteren ve biyolojik sıvıdaki moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan kantitatif analitik yöntemdir (Hornbeck, 2001).

Çalışmada, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin protein düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi..

3.2.4.1. Lizatların Hazırlanışı

Hücreleri flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1 ml %0.25) eklendi ve hafif çalkalama hareketleri ile hücreler serbestleştirildi. Süspansiyonlar pipetle toplanarak, 25 °C'de, 1600 rpm'de 3 dakikalık santrifüj sonunda pelet elde edildi. Hücre peleti 3 kez 10 ml PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 1 ml Lizis Buffer eklenerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Ependorflara alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen lizatlar aynı zamanda hücre içi kalsiyum miktar tayininde kullanıldı.

Lizis Buffer içeriği; %1 Triton X-100 (v/v), 50 mM HEPES buffer pH 7.2, 100 mM NaH₂PO₄·2H₂O, %8 oranında proteaz inhibitör kokteylinden (aprotinin, PMSF, leupeptin, NaF) oluşmaktadır.

Hücre dışı kalsiyum miktarını ölçmek için, uygulama süresi sonlanan gruplardan medium alınıp, 10000g de 10 dk santrifüj edilerek -20 °C de saklandı.

3.2.4.2. BCA (Bikinkonik Asit) Protein Ölçüm Yöntemi ile Total Protein Tayini

Total proteininin kolorimetrik tespiti ve nicelendirilmesi için bikinkonikasit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, bikinkonik asit içeren bir belirteç kullanılarak bakır katyonunun yüksek duyarlı ve selektif kolorimetrik tespitinin yapıldığı, alkali ortamda Cu⁺²'nin Cu⁺¹'e indirgenmesini kombine etmektedir. Bir bakır iyonu ile iki

BCA molekülünün şelatlanmasıyla mor renkli reaksiyon ürün oluşmaktadır (Smith ve diğerleri, 1985).

Total protein tayini için Takara BCA Protein Assay Kit kullanıldı. Çalışma firmanın belirlediği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. BCA Standart Solüsyonu oda sıcaklığına getirilip vortekslendi. Reaktif A ve Reaktif B 37 °C'ye getirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Reaktif A ve Reaktif B 100:1 oranında karıştırıldı. BCA standart çözeltisinin seyreltilmesi için deiyonize su kullanılarak BCA standart solüsyonları hazırlandı. Kuyucuklara, BCA standartlarından ve her bir örnekten 10 µl konuldu (Tablo 4). Her konsantrasyon için 2 tekrarlı ölçüm gerçekleştirildi. Standart ve numunelerin üzerine 200 µl çalışma solüsyonu eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. ELISA mikropilaka okuyucuda (BioTek Epoch) 562 nm'de okutuldu.

Tablo 4. BCA standartları

2 mg/ml BCA standart (µl)	Diluent (µl)	Son konsantrasyon (µg/ml)
120	0	2,000
90	30	1,500
60	60	1,000
45	75	750
15	105	250
10	150	125
0	120	0 (Blank)

3.2.4.3. ELISA Yöntemi ile IL-1β Miktar Tayini

IL-1 beta miktar tayini için Human IL-1 beta ELISA Kit (MyBiosource) kullanıldı. Çalışma firmanın belirlediği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm reaktif ve materyaller deneyden önce klavuzda belirtildiği gibi hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi. Her kuyucuğa iki tekrar olmak şartıyla 100 µl standartlar ve örnekler eklendi (Tablo 5). Plaka kapatıcı ile kapatılıp 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon tamamlanınca kuyucuklardaki standart ve örnekler dökülerek her bir kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş anti-insan IL-1β eklendi. 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılarak 300 µl yıkama tamponu eklendi. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Kuyucuklara 100 µl avidin biotin peroksidaz kompleks eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılarak 300 µl yıkama tamponu eklendi. Bu işlem 4 kez daha tekrar edildi. Her kuyucuğa 90 µl kolon geliştirme reaktifi eklenerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi.

Son olarak her kuyucuğa 100 µl sonlandırma solüsyonu eklendiğinde kuyucuklarda sarı renk gözlemlendi ve 450 nm’de ELISA mikropilaka okuyucuda (BioTek Epoch) okutuldu.

Tablo 5. IL-1β standartları

Standart	Diluent (µl)
1.tüp 250 pg/ml	250 µl stok standart + 750 µl diluent
2.tüp 125 pg/ml	1.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
3.tüp 62,5 pg/ml	2.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
4.tüp 31,25 pg/ml	3.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
5.tüp 15,625 pg/ml	4.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
6.tüp 7,8125 pg/ml	5.tüpten 300 µl + 300 µl diluent

7.tüp 3,9625 pg/ml	6.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
8.tüp 0 pg/ml	Sadece 300 µl diluent

3.2.4.4. ELISA Yöntemi ile TNF- α Miktar Tayini

TNF- α miktar tayini için TNF- α ELISA Kit (MyBiosource) kullanıldı. Çalışma firmanın belirlediği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm reaktif ve materyaller deneyden önce klavuzda belirtildiği gibi hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi. Konsantrasyon yıkama tamponu 1:25 oranında seyreltilti. TNF- α standartı 1 ml diluent ile çözüldü. Kullanımdan önce biyotinlenmiş insan TNF- α antikorunu 1:100 oranında antikor dilüenti ile dilüe edildi. Kullanımdan önce enzim konjugat sıvısı, enzim konjugat dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Renk reaktifi A ve renk reaktifi B 9:1 oranında hazırlandı. Standartlar ve numuneler kuyucuklara 100 µl olarak eklenerek 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl TNF- α antikor eklenerek 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µl enzim konjugat sıvısı eklenip 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucu 5 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara 100 µl renk reaktifi eklenip 25 dakika inkübe edildi. Son olarak 100 µl renk reaktifi C eklenip 10 dakika içerisinde 450 nm'de okutuldu.

Tablo 6. TNF- α standartları

Standart	Diluent (µl)
1.tüp %100	Stok standart + 1 ml diluent

2.tüp %50	1.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
3.tüp %25	2.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
4.tüp %12,5	3.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
5.tüp %6,3	4.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
6.tüp %3,1	5.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
7.tüp %1,5	6.tüpten 300 µl + 300 µl diluent
8.tüp	Sadece 300 µl diluent

3.2.4.5. ELISA Yöntemi ile IL-10 Miktar Tayini

IL-10 miktar tayini için IL-10 ELISA Kit (MyBiosource) kullanıldı. Çalışma firmanın belirlediği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm reaktif ve materyaller deneyden önce klavuzda belirtildiği gibi hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi. Konsantre yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltildi. Standartlar ve numuneler kuyucuklara 100 µl olarak eklenerek 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi (Tablo 7). Kuyucuklar boşaltıldı fakat yıkama yapılmadı. Hızlı bir şekilde her kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş tespit antikoru solüsyonu eklenip 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Her kuyucuğa 90 µl substrat eklenip 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi ve 50 µl sonlandırma solüsyonu eklenip 450 nm'de okuma yapıldı.

Tablo 7. IL-10 standartları

Standart	Diluent (μ l)
1.tüp 500 pg/ml	Stok standart + 1 ml diluent
2.tüp 250 pg/ml	1. tüpten 500 μ l + 500 μ l diluent
3.tüp 125 pg/ml	2. tüpten 500 μ l + 500 μ l diluent
4.tüp 62,5 pg/ml	3. tüpten 500 μ l + 500 μ l diluent
5.tüp 31,25 pg/ml	4. tüpten 500 μ l + 500 μ l diluent
6.tüp 15,625 pg/ml	5. tüpten 500 μ l+500 μ l diluent
7.tüp 7,8125 pg/ml	6. tüpten 500 μ l+500 μ l diluent
8.tüp 0 pg/ml	Sadece 500 μ l diluent

3.2.4.6. ELISA Yöntemi ile IL-6 Miktar Tayini

IL-6 miktar tayini için IL-6 ELISA Kit (MyBiosource) kullanıldı. Çalışma firmanın belirlediği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm reaktif ve materyaller deneyden önce klavuzda belirtildiği gibi hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi. Yıkama tamponu distile su ile 1:25 oranında dilüe edildi (Tablo 8). İnsan IL-6 liyofilize halde olan standart 1 ml dilüentle hazırlandı. Standartlar ve numuneler kuyucuklara 100 μ l olarak eklenerek 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 μ l insan IL-6 antikor eklenerek 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 μ l enzim konjugat sıvısı eklenip 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucu 5 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara 100 μ l renk reaktif eklenip 30 dakika inkübe edildi. Son olarak 100 μ l renk reaktif C eklenip 10 dakika içerisinde 450 nm’de okutuldu.

Tablo 8. IL-6 standartları

Standart	Diluent (μ l)
1. tüp %100	Stok standart + 1 ml diluent
2.tüp %50	1. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
3.tüp %25	2. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
4.tüp %12,5	3. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
5.tüp %6,3	4. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
6.tüp %3,1	5. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
7.tüp %1,5	6. tüpden 300 μ l + 300 μ l diluent
8.tüp	Sadece 300 μ l diluent

3.2.5. Kolorimetrik Yöntem ile Kalsiyum (Ca) Miktar Tayini

Kalsiyum miktar tayini için Elabscience kit kullanıldı. Konsantrasyonu 2.5 mmol/L kalsiyum standartı deiyonize su ile dilüe edildi. Firmanın önerileri doğrultusunda 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mmol/L'lik dilüsyonlar hazırlandı. Kuyucuklara 10 μ l yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki standartlar koyuldu. Her bir kuyucuğa 250 μ l çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 610 nm' de okuma yapıldı.

3.2.6. Bazı Antiinflamatuvar ve Proinflamatuvar Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Analizleri

3.2.6.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için GeneMATRIX UNIVERSAL RNA Purification Kit (EURX) kullanıldı. Rekombinant proteinlere (Nsp4, PInA) maruziyetin 3., 6., 12. ve 24. saatlerinde hücreler tripsinle kaldırılıp 2 kez PBS ile yıkanarak 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Her örneğe 400 µl RL tampon eklenerek pipetaj yapıldı. Tüplere alınan lizat 11.000xg'de 4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süzülen homojen lizata 250 µl %96'lık etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Lizat RNA bağlayan kolona aktarıldı ve 11.000xg'de 1 dk santrifüj edildi ve süzüntü atıldı. 400 µl DN1 yıkama tamponu ekleyip 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek süzüntü atıldı. 600 µl yıkama RBW eklenip 11.000xg'de 2 dk santrifüj edilerek süzüntü atıldı. 300 µl yıkama RBW eklenip 11.000xg'de 2 dk santrifüj edilerek altta kalan toplama tüpü ile süzüntü atıldı. Yeni bir toplama tüpüne 40-100 µl RNase içermeyen su ekleyip 1 dk 11000xg'de santrifüj edildi. Altta kalan RNA içeriği -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.6.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi OneScript Plus cDNA Synthesis Kit (abm, ABD) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon komponentleri aşağıda verilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. cDNA reaksiyon bileşenleri

Komponentler	Hacim
5X RT Tampon	4 µl
dNTP	1 µl
Primers	1 µl

Total RNA	2 μ l
One Script Plus RTase	1 μ l
Nükleaz içermeyen saf su	1 μ l
	Son Hacim 20 μ l

Reaksiyon karışımı pikofüj yapılarak, konvensiyonel PZR cihazında aşağıda belirtilen döngüler uygulanarak cDNA sentezi tamamlandı ve kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı (Tablo 10).

Tablo 10. cDNA ısı ve süre döngüsü

Isı	Süre
50-55 °C	15 dk
85 °C	5 dk

3.2.6.3. Gerçek Zamanlı RT-PZR

Gerçek zamanlı RT-PZR çalışmasında elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Kullanılan primer dizileri aşağıda belirtilmiştir. Kullanılan cDNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (Epoch, BioTek) ölçüldü ve RNA/DNA oranı 1.7 ve üzeri

olanlar çalışmada kullanıldı. Uygun hacimde cDNA, PZR striplerine (Axygen) aktarıldı. Her bir örnek için toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Reaksiyon karışımları cDNA'ların bulunduğu kuyucuklara ilave edildi. PZR stripleri CFX Connect, Real Time System (BIO-RAD) cihazına yüklendi. Aşağıdaki tabloda verilen ısı ve döngüler uygulandı (Tablo 11).

Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşik (ΔCt) değerleri hesaplandı. Daha sonra her örneğin ΔCt değerleri kontrol grubunun Ct değerinden çıkartılarak delta delta siklus eşik ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplandı. Her bir genin ne kadar eksprese olduğunu hesaplamak için, son değerlerin başlangıca olan oranı alınarak (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri belirlendi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 1'in üzerindeyse artış, 1'in altındaysa ekspresyonda azalma olmuştur şeklinde yorumlandı. Bu hesaplamalar REST 2009 programında yapıldı. Housekeeping gen olarak Beta aktin geni kullanıldı.

Tablo 11. PZR ısı ve süre döngüsü

Gen	Döngü	
Beta aktin	95 °C 10 dk , 95 °C 30 sn	} 35 siklus
	64 °C 30 sn	
	72 °C 30 sn	
IL-6	94 °C 2 dk , 94 °C 30 sn	} 40 siklus
	60 °C 30 sn	
	72 °C 40 sn	

TNF- α	95 °C 10 dk , 95 °C 30 sn	}	35 siklus
	56 °C 30 sn		
	72 °C 40 sn		
IL-10	95 °C 10 dk , 95 °C 30 sn	}	40 siklus
	54 °C 30 sn		
	72 °C 40 sn		
IL-1 β	98 °C 30 sn , 95 °C 10 sn	}	40 siklus
	56 °C 15 sn		
	60 °C 15 sn		

3.2.7. Veri Analizi

Deneyler 3 tekrardan oluşacak ve elde edilecek ortalama değerler SPSS istatistik programında tek yönlü varyans analizi (One-Way) ANOVA kullanılarak değerlendirildi.

4. Bulgular

4.1. Nsp4 ve PInA için IC50 Dozlarının Belirlenmesi

Aynı nesil Caco-2 hücre hattına, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan proteinlerin IC50 dozları, hücre canlılık testi olan MTT ile test edildi ve Graphad Prism 9 programında hesaplandı. Buna göre, *L. plantarum* bakteriyosini (PInA) için IC50 doz 0.1876 µg/ml , Rotavirüs NSP4 proteini için IC50 doz 0,036 nM olarak belirlendi.

4.2. Kolorimetrik Yöntem ile Hücre İçi Kalsiyum Miktarının Belirlenmesi

Aynı nesil Caco-2 hücre hattına belirlenen IC50 dozlarında NSP4 ve PInA proteinlerin uygulanmasını takiben 3., 6., 12. ve 24. saatlerde ölçülen hücre içi Ca miktarları Tablo 12 ve Grafik 1'de verilmiştir. Grafik 1'de görüldüğü gibi 3. saat ölçümlerinde kontrol grubuna göre Nsp4 uygulanan grupta anlamlı bir Ca miktar farkı olmazken, PInA grubunda 3,76, PInA ve Nsp4'ün birlikte uygulandığı grupta 4,125 kat artış saptandı.

6. saat sonunda Nsp4 uygulanan grupta Ca miktarı kontrol grubuna göre 2,27 kat artarken, Nsp4+PInA birlikte uygulandığında Nsp4 gbuna göre 3,75 kat, kontrol grubuna göre 1,64 kat Ca miktarında azalma belirlendi. Kontrol ve PInA grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Tablo 12, Grafik 1).

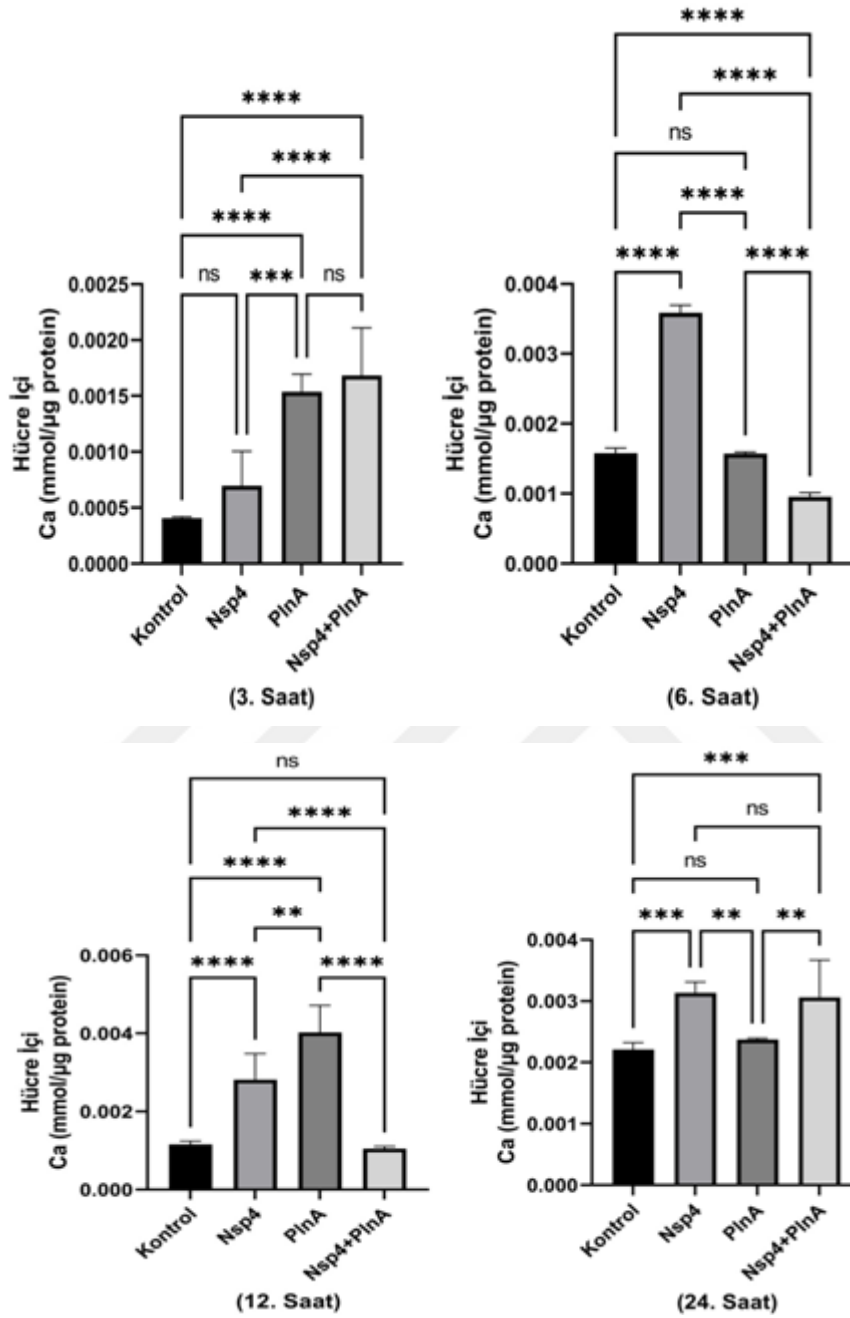
Proteinlerin 12 saatlik uygulamalarında, kontrol grubuyla kıyaslandığında Nsp4 grubunda 2,43 kat, PInA grubunda 3,48 kat Ca artışı gözlenirken, Nsp4+PInA grubunda kontrol grubuyla aynı seviyede Ca tespit edildi (Tablo 12, Grafik 1).

24. saat sonunda kontrol ve PlnA grupları arasındaki Ca miktarları anlamlı değişkenlik göstermezken, Nsp4 grubunda 1,41 kat, Nsp4+PlnA grubunda 1,38 kat artış saptandı (Tablo12 , Grafik 1).

Tablo 12. Hücre içi kalsiyum miktarı

Süre	Grup	Hücre İçi Ca (mol/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	0,000408 ^a	***0,0002
	Nsp4	0,000698 ^a	****<0,0001
	PlnA	0,001538 ^b	
	Nsp4+PlnA	0,001683 ^b	
6. Saat	Kontrol	0,001578 ^a	****<0,0001
	Nsp4	0,003589 ^b	
	PlnA	0,001572 ^a	
	Nsp4+PlnA	0,000957 ^c	
12. Saat	Kontrol	0,001156 ^a	**0,0017
	Nsp4	0,002811 ^b	****<0,0001
	PlnA	0,004023 ^c	
	Nsp4+PlnA	0,00105 ^a	
24. Saat	Kontrol	0,002209 ^a	**0,007
	Nsp4	0,003135 ^b	***0,0009
	PlnA	0,002373 ^a	****<0,0001
	Nsp4+PlnA	0,003062 ^b	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * 0,01<p<0,09, **0,001<p<0,009, ***0,0001< p <0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. ^{a,b,c} üst ifadelerinin farklı olması o gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğunu gösterir. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)



Grafik 1. Hücre içi kalsiyum miktarları

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * 0,01<p<0,09, **0,001<p<0,009, ***0,0001< p <0,0009, **** p<0,0001. ns: istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir.

İstatistiki anlamlılık için $p < 0,005$ kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.3. Kolorimetrik Yöntem ile Hücre Dışı Kalsiyum Miktarının Belirlenmesi

Aynı nesil Caco-2 hücre hattına belirlenen IC50 dozlarında NSP4 ve PInA proteinlerin uygulanmasını takiben 3., 6., 12. ve 24. saatlerde ölçülen hücre dışı Ca miktarları Tablo 13 ve Grafik 2’de verilmiştir.

Hücre dışı kalsiyum miktarının; 3. saatin sonunda, Nsp4 uygulanan grupta kontrole göre 1,68 kat azaldığı, PInA grubunda 1,23 kat, Nsp4+PInA grubunda 1,33 kat arttığı görüldü (Grafik 2).

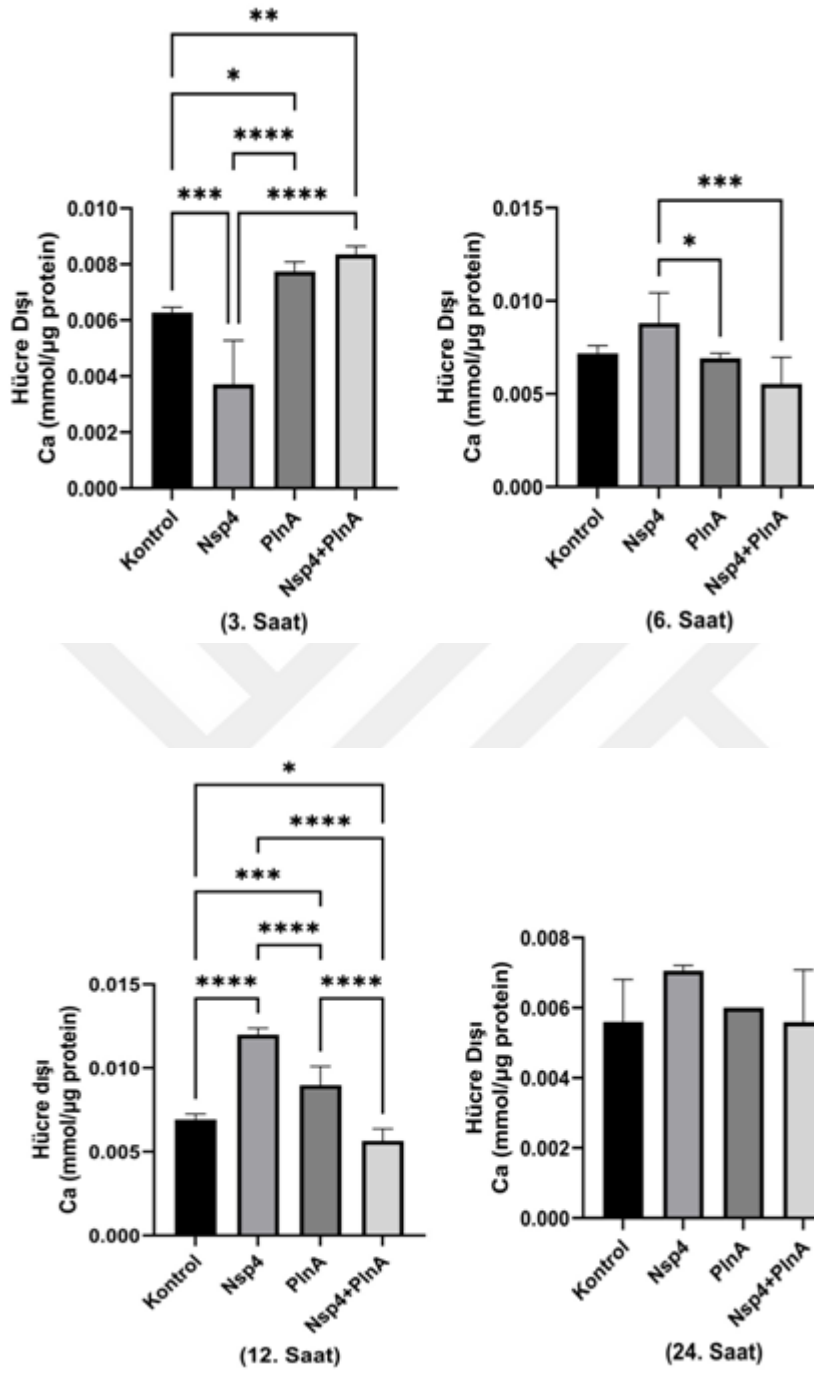
6 saatlik inkübasyon sonunda, proteinlerin uygulandığı gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Ancak, Nsp4+PInA grubunda, Nsp4 grubuna göre 1,5 kat azaldığı , PInA grubunda ise Nsp4 grubuna göre hücre dışı kalsiyum miktarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı (Grafik 2).

12 saatlik maruziyet sonrası, tüm gruplardaki hücre dışı kalsiyum miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü (Grafik 2). Kontrol grubuna göre, Nsp4 grubu 1,7 kat, PInA grubu 1,2 kat artarken, Nsp4+PInA grubunun hücre dışı kalsiyum miktarında 1,2 katlık azalış tespit edildi (Tablo 13).

Tablo 13. Hücre dışı kalsiyum miktarı

Süre	Grup	Hücre Dışı Ca (mol/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	0,00628 ^a	*0,0261
	Nsp4	0,00372 ^b	**0,0015
	PlnA	0,00775 ^c	***0,0001
	Nsp4+PlnA	0,00836 ^c	**** <0,0001
6. Saat	Kontrol	0,00719 ^{a,b}	* 0,0369 *** 0,0003
	Nsp4	0,00881 ^a	
	PlnA	0,00693 ^b	
	Nsp4+PlnA	0,00555 ^b	
12. Saat	Kontrol	0,00692 ^a	*0,0283
	Nsp4	0,012 ^b	***0,0004
	PlnA	0,00897 ^c	****
	Nsp4+PlnA	0,00565 ^d	<0,0001
24. Saat	Kontrol	0,0056 ^a	>0,05
	Nsp4	0,00706 ^a	
	PlnA	0,00601 ^a	
	Nsp4+PlnA	0,00559 ^a	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * 0,01<p<0,09, **0,001<p<0,009, ***0,0001< p <0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. ^{a,b,c} üst ifadelerinin farklı olması o gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğunu gösterir. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)



Grafik 2. Hücre dışı kalsiyum miktarları

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.

* p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p$

<0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.4. IL-10 'un Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Antiinflamatuvar etkiyi belirleyebilmek için, aynı nesil Caco-2 hücre hattına belirlenen IC50 doz konsantrasyonlarında Nsp4 ve PInA proteinleri uygulandı ve 3., 6., 12. ve 24. saatlerdeki IL-10'un protein düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo 14 ve Grafik 3'de verilmiştir.

3 saatin sonunda uygulama yapılan tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi. IL-10 düzeyleri kontrole göre kıyaslandığında, sadece Nsp4 uygulanan grupta 1,48 kat artarken, Nsp4+PInA grubunda 2 kat, PInA grubunda ise 2,59 katlık bir artış gözlemlendi (Grafik 3).

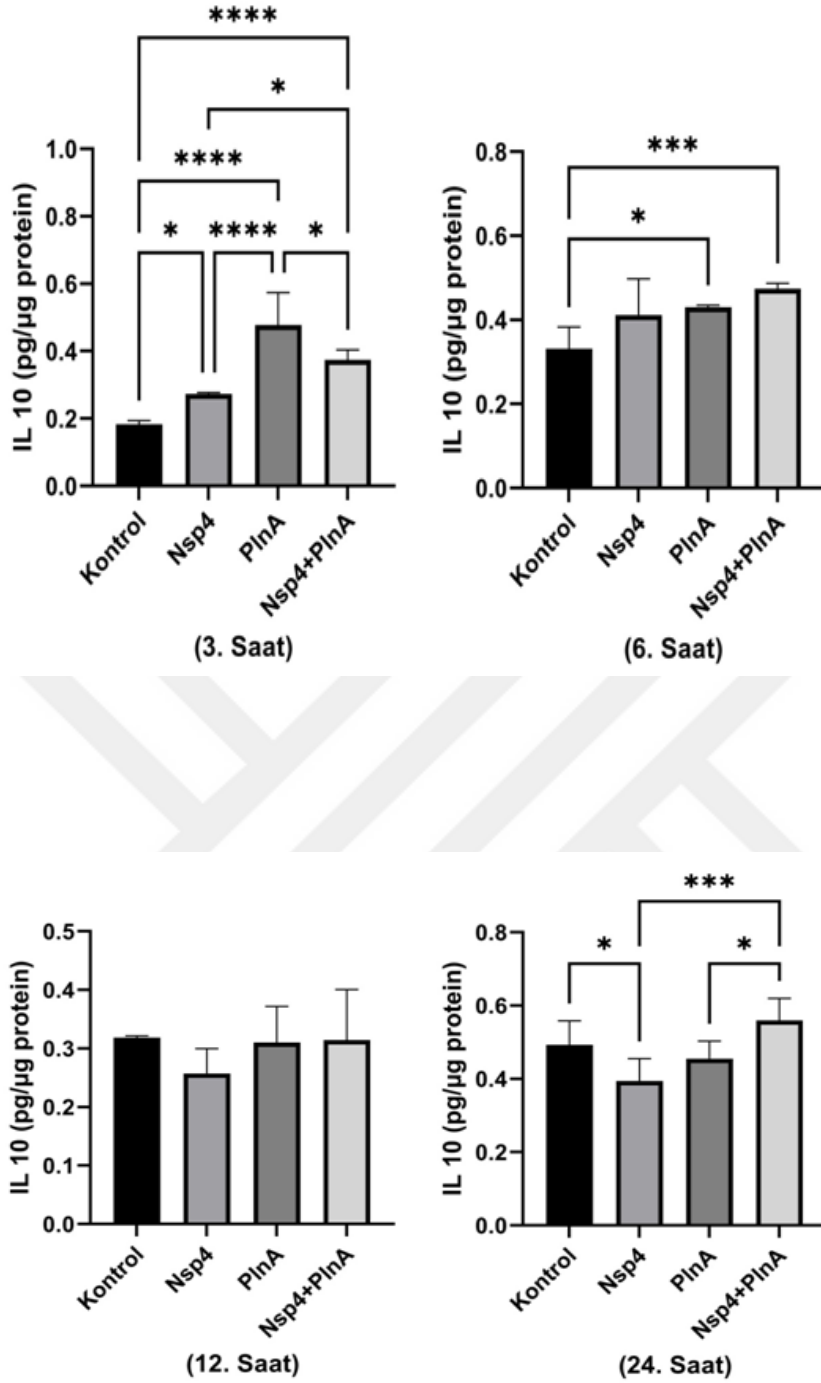
6 saatlik uygulamalarda, Nsp4 grubunda kontrole göre anlamlı farklılık görülmezken, PInA ve Nsp4+PInA gruplarında anlamlı artışlar görüldü. Kontrole göre PInA grubunda 1,29 kat, Nsp4+PInA grubunda 1,43 kat artış belirlendi (Grafik 3).

12 saatlik maruziyet sonrasında gruplarda anlamlı değişimler gözlenmezken, 24 saat sonunda ise kontrol grubuna kıyasla Nsp4 uygulanan grupta 1,25 kat azalış görüldü. Nsp4+PInA grubunda ise kontrole göre 1,13 kat artış belirlendi (Grafik 3).

Tablo 14. IL-10 protein düzeyleri

Süre	Grup	IL 10 (pg/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	0,184 ^a	*0,0136
	Nsp4	0,274 ^b	**** <0,0001
	PlnA	0,478 ^c	
	Nsp4+PlnA	0,374 ^d	
6. Saat	Kontrol	0,332 ^a	* 0,0142
	Nsp4	0,412 ^{a,b}	*** 0,0005
	PlnA	0,431 ^b	
	Nsp4+PlnA	0,475 ^b	
12. Saat	Kontrol	0,319 ^a	>0,05
	Nsp4	0,258 ^a	
	PlnA	0,311 ^a	
	Nsp4+PlnA	0,315 ^a	
24. Saat	Kontrol	0,494 ^a	* 0,0270
	Nsp4	0,395 ^b	*** 0,0005
	PlnA	0,456 ^{a,b}	
	Nsp4+PlnA	0,56 ^{a,c}	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * 0,01<p<0,09, **0,001<p<0,009, ***0,0001< p <0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. ^{a,b,c} üst ifadelerinin farklı olması o gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğunu gösterir. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)



Grafik 3. IL-10 protein düzeyleri

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * 0,01<p<0,09, **0,001<p<0,009, ***0,0001< p <0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.5. IL-6 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Uygulamanın 3. saatinde IL-6 miktarında, Nsp4 verilen grupta kontrol grubuna göre 2,09 katlık bir artış görülürken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmedi (Grafik 4, Tablo 15).

IL-6 miktarında 6. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla, Nsp4 grubunda 1,46 kat, PlnA grubunda 1,34 kat, Nsp4+PlnA grubunda 1,42 katlık artışlar görüldü (Grafik 4, Tablo 15).

12 saatlik maruziyet sonrası gruplarda anlamlı değişiklikler olmaz iken, 24 saat sonunda, Nsp4 grubunda 2,23 kat, PlnA grubunda 1,34, Nsp4+PlnA grubunda 2,71 katlık artışlar görüldü (Grafik 4, Tablo 15).

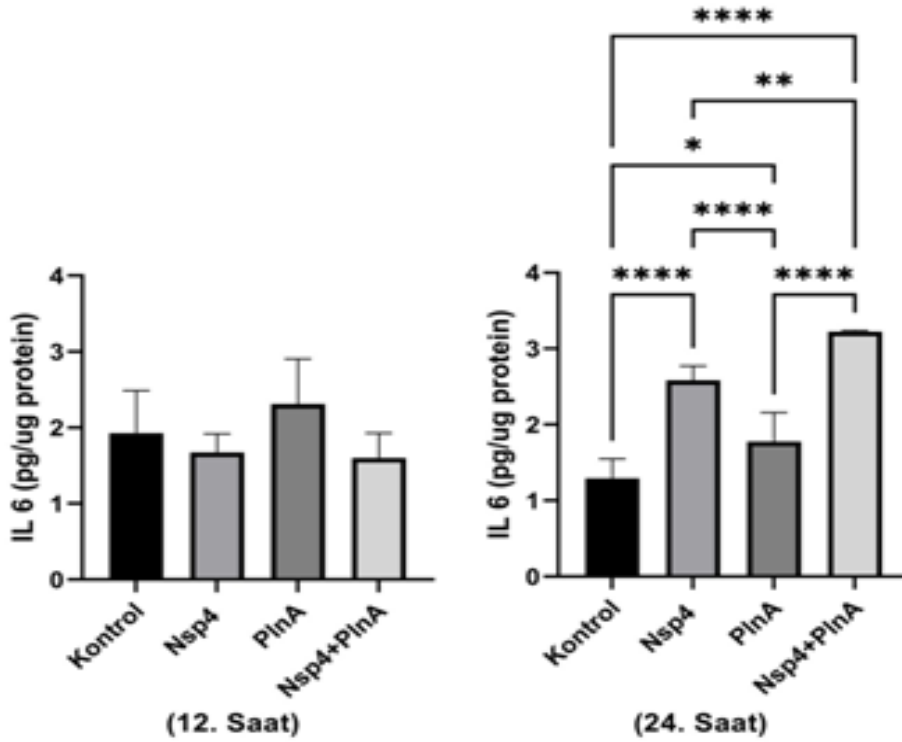
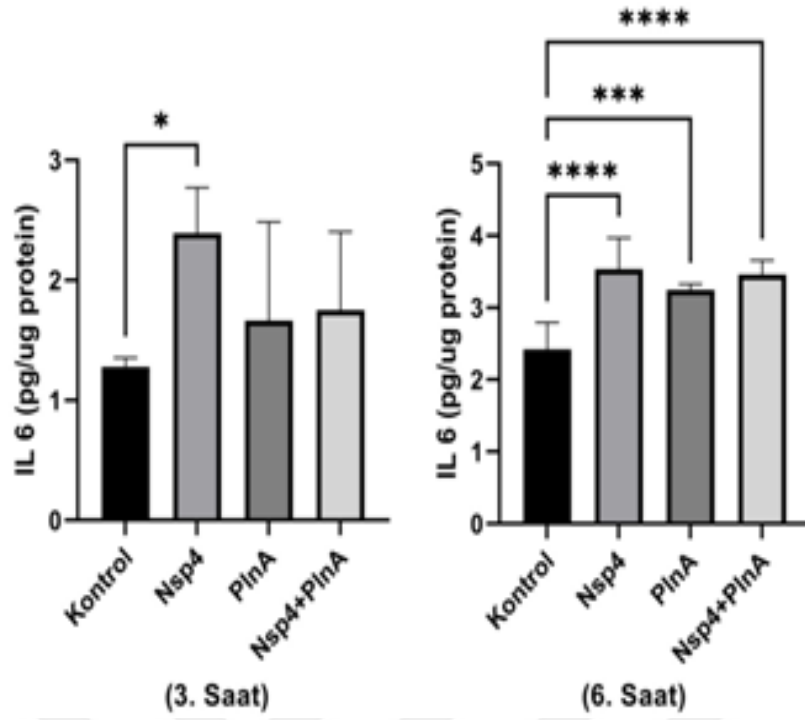
Tablo 15. IL-6'nın protein düzeyleri

Süre	Grup	IL 6 (pg/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	1,25 ^a	*0,0126
	Nsp4	2,62 ^b	
	PlnA	2,16 ^a	
	Nsp4+PlnA	2,15 ^a	
6. Saat	Kontrol	2,42 ^a	****<0,0001 ***0,007
	Nsp4	3,54 ^b	
	PlnA	3,25 ^b	
	Nsp4+PlnA	3,46 ^b	
12. Saat	Kontrol	1,62 ^a	>0,05
	Nsp4	1,68 ^a	
	PlnA	2,32 ^a	
	Nsp4+PlnA	1,61 ^a	
	Kontrol	1,19 ^a	*0,0149
	Nsp4	2,66 ^b	**0,0012

24. Saat	PInA	1,62 ^c	****<0,001
	Nsp4+PInA	3,23 ^d	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PInA:** PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PInA:** Nsp4 ve PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$. İstatistiki anlamlılık için $p < 0,005$ kabul edildi. ^{a,b,c,d} üst ifadelerinin farklı olması o gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğunu gösterir. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)





Grafik 4. IL-6'nın protein düzeyleri

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.

* p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, **** $0,0001 < p$

<0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.6. TNF- α 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Protein uygulamalarının 3. saatinde TNF- α miktarında kontrol grubuna göre Nsp4 grubunda 1,75 kat, PlnA grubunda 1,57 kat, Nsp4+PlnA grubunda ise 1,56 kat artışlar görüldü (Grafik 5, Tablo 16).

6. saatte kontrol grubuna göre Nsp4 grubunda 1,43 kat, PlnA grubunda 1,14 kat, Nsp4+PlnA grubunda ise 1,22 kat artışlar saptandı (Grafik 5, Tablo 16).

12 saatlik inkübasyon sonunda Nsp4 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken, PlnA grubunda kontrol gruna göre 1,10, Nsp4+PlnA grubunda ise 1,41 kat artış saptandı (Grafik 5, Tablo 16).

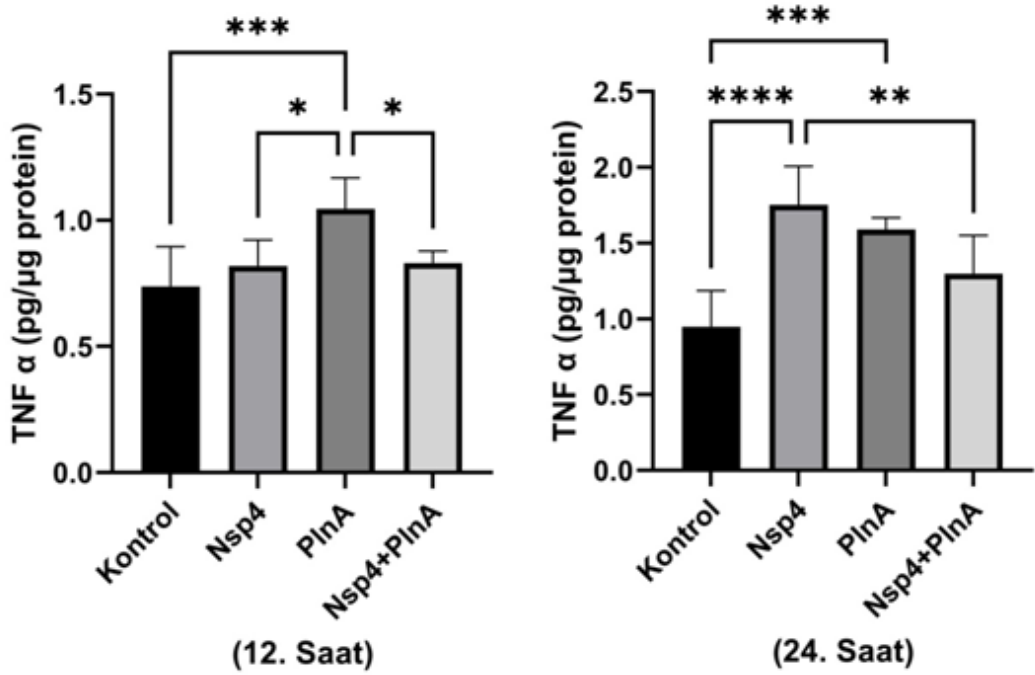
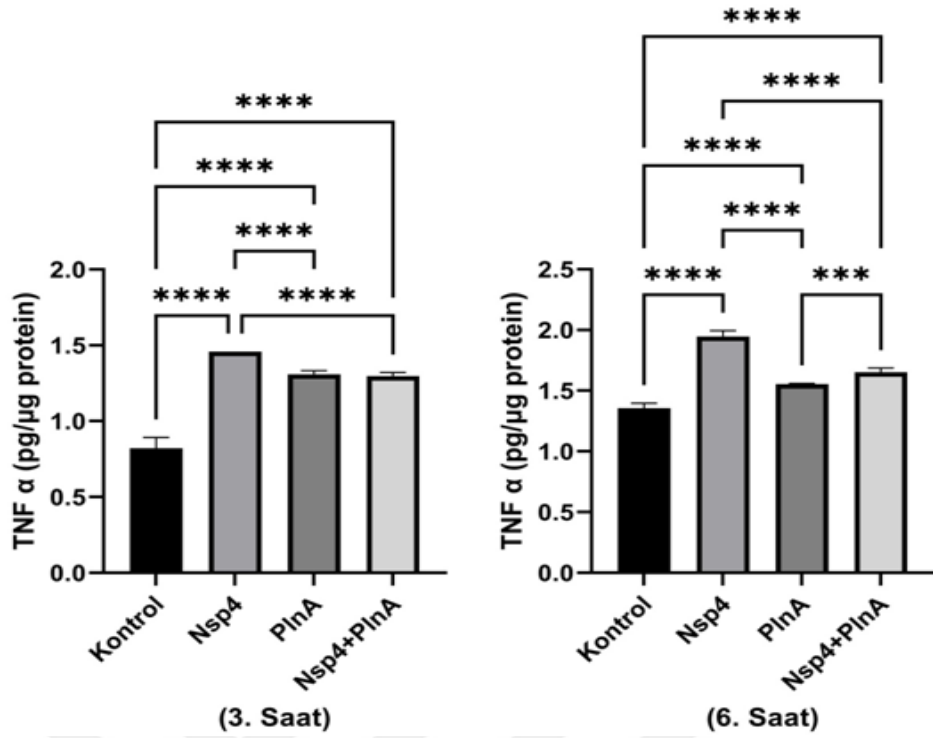
Uygulamanın 24. saatinde tüm gruplarda anlamlı değişiklikler görüldü. Nsp4 grubunda 1,85 kat, PlnA grubunda 1,68 kat, Nsp4+PlnA grubunda ise 1,36 kat artış olduğu belirlendi (Grafik 5, Tablo 16).

Tablo 16. TNF- α 'nın protein düzeyleri

Süre	Grup	TNF α (pg/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	0,83 ^a	**** <0,0001
	Nsp4	1,46 ^b	
	PlnA	1,31 ^c	
	Nsp4+PlnA	1,3 ^c	
6. Saat	Kontrol	1,36 ^a	*** 0,0008 **** < 0,0001
	Nsp4	1,95 ^b	
	PlnA	1,56 ^c	

	Nsp4+PInA	1,66 ^d	
12. Saat	Kontrol	0,74 ^a	* 0,0187
	Nsp4	0,82 ^a	*** 0,0008
	PInA	1,05 ^b	
	Nsp4+PInA	0,84 ^a	
24. Saat	Kontrol	0,95 ^a	** 0,0089
	Nsp4	1,76 ^b	*** 0,0003
	PInA	1,6 ^{b,c}	**** <0,0001
	Nsp4+PInA	1,3 ^{a,c}	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PInA:** PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PInA:** Nsp4 ve PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$. İstatistiki anlamlılık için $p < 0,005$ kabul edildi. ^{a,b,c} üst ifadelerinin farklı olması o gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğunu gösterir. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)



Grafik 5. TNF- α 'nın protein düzeyleri

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.

* p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p$

<0,0009, **** p<0,0001. İstatistiki anlamlılık için p<0,005 kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.7. IL-1 β 'nın Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Protein uygulamalarının 3. saatinde kontrol grubuna göre IL-1 β seviyelerinde sırasıyla, Nsp4, PlnA ve Nsp4+PlnA gruplarında, 1,33, 1,39, 1,61 katlık artışlar saptandı (Grafik 6, Tablo 17).

6 saatlik uygulama sonrası kontrol grubuna göre Nsp4 grubunda 1,26 kat, Nsp4+PlnA grubunda 1,20 kat artış saptanırken, PlnA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (Grafik 6, Tablo 17).

12 saatin sonunda ise tüm gruplarda kontrole kıyasla anlamlı azalışlar tespit edildi. IL-1 β protein düzeyleri, Nsp4 grubunda 2,07, PlnA grubunda 1,5, Nsp4+PlnA grubunda ise 1,73 kat azaldı (Grafik 6, Tablo 17).

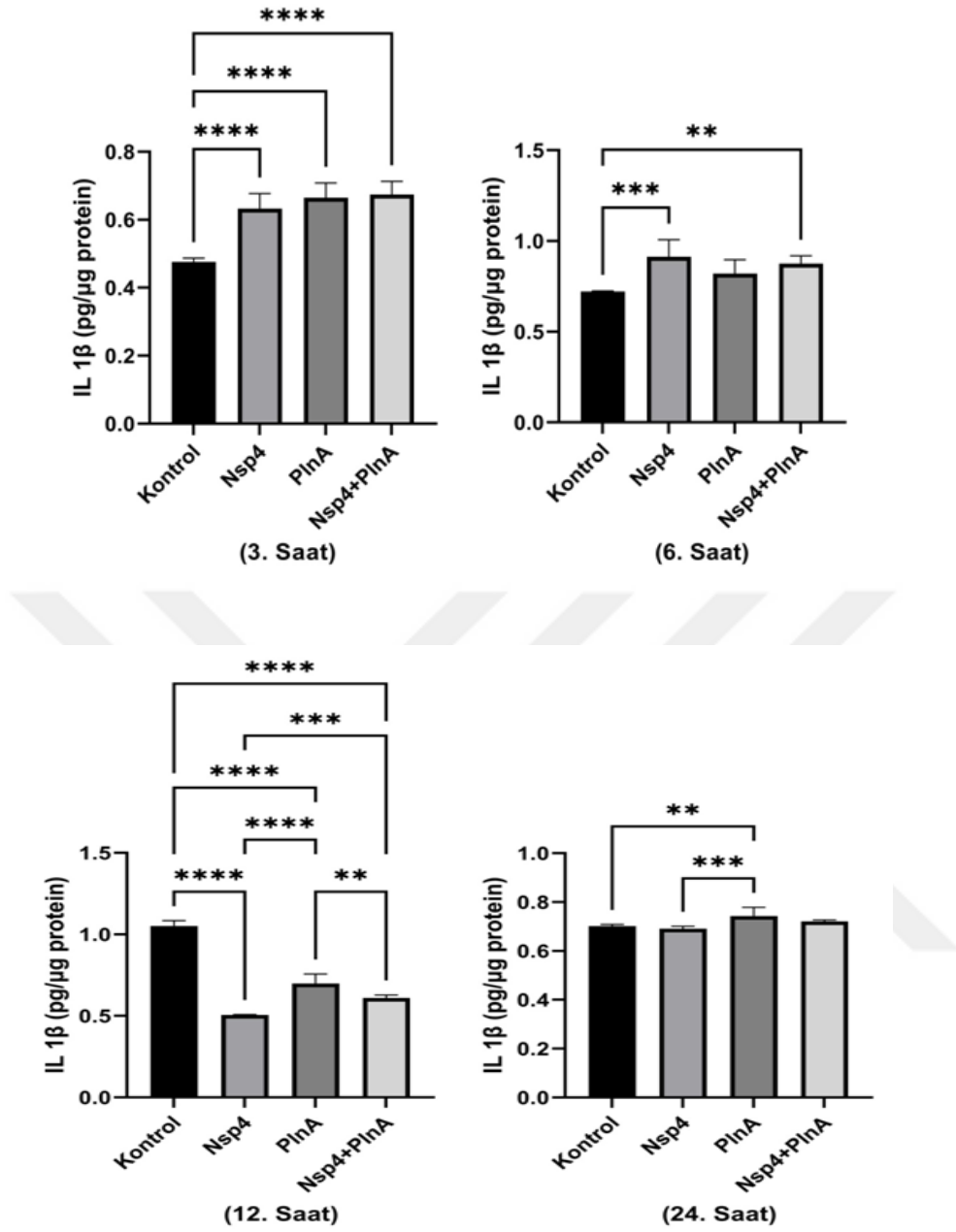
Maruziyetin 24. saatinde kontrol grubuna göre sadece PlnA grubunda 1,05 kat artış görülürken diğer gruplarda anlamlı farklar saptanmadı (Grafik 6, Tablo 17).

Tablo 17. IL-1 β 'nın protein düzeyleri

Süre	Grup	IL 1 β (pg/ μ g protein)	p Değeri
3. Saat	Kontrol	0,48 ^a	**** <0,0001
	Nsp4	0,64 ^b	
	PlnA	0,67 ^b	
	Nsp4+PlnA	0,68 ^b	
6. Saat	Kontrol	0,73 ^a	** 0,0025
	Nsp4	0,92 ^b	*** 0,0002
	PlnA	0,83 ^{a,b}	
	Nsp4+PlnA	0,88 ^b	

12. Saat	Kontrol	1,06 ^a	** 0,0015
	Nsp4	0,51 ^b	
	PlnA	0,7 ^c	*** 0,0003
	Nsp4+PlnA	0,61 ^d	**** <0,0001
24. Saat	Kontrol	0,71 ^a	** 0,0071
	Nsp4	0,7 ^a	*** 0,0007
	PlnA	0,75 ^b	
	Nsp4+PlnA	0,73 ^{a,b}	

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$. İstatistiki anlamlılık için $p < 0,005$ kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)



Grafik 6. IL-1β 'nın protein düzeyleri

(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. * p değeri aralığını belirtir. * $0,01 < p < 0,09$, ** $0,001 < p < 0,009$, *** $0,0001 < p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$. İstatistiki anlamlılık için $p < 0,005$ kabul edildi. Her saat grubu kendi içinde değerlendirildi.)

4.8. IL- 10 'un Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

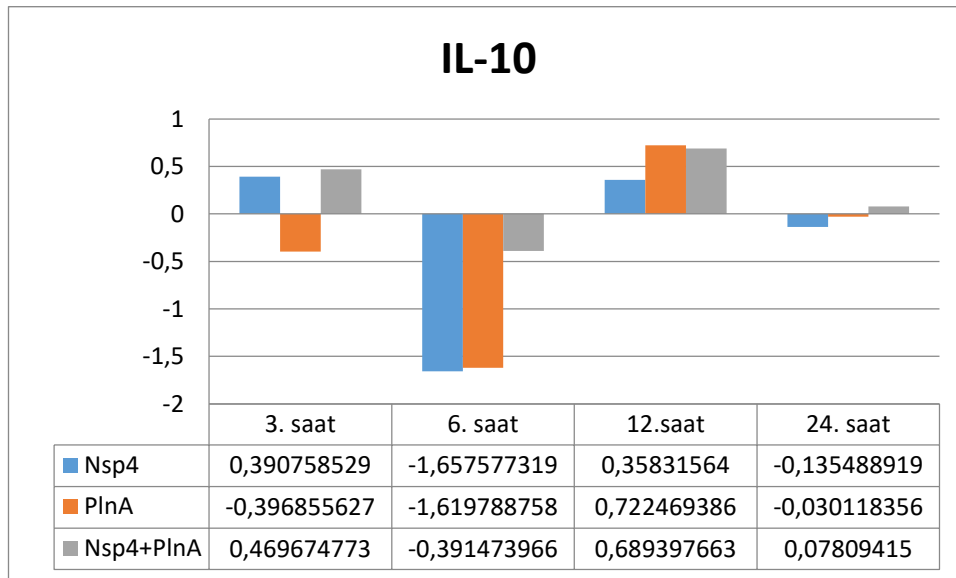
Aynı nesil Caco-2 hücre hattına Rotavirüs Nsp4 proteini uygulamasının 3. saatinde, IL-10'un gen ekspresyonu kontrole 0,39 kat artarken, Nsp4'ün PInA ile birlikte uygulandığında 0,46 kat arttı. Sadece PInA uygulamasının IL-10'u 0,39 kat baskıladığı saptandı (Grafik 7).

6 saat maruziyet sonucunda tüm gruplarda IL-10 gen ekspresyonunun baskılandığı tespit edildi. Buna göre Nsp4, PInA ve Nsp4+PInA gruplarında sırasıyla 1,65, 1,61 ve 0,3 kat baskılanma kaydedildi (Grafik 7).

Uygulamalardan 12 saat sonra Nsp4, PInA ve Nsp4+PInA gruplarında IL-10 gen ekspresyonunun sırasıyla 0,35, 0,72 ve 0,68 kat arttığı görüldü (Grafik 7).

24. saatte IL-10 gen ekspresyonunun Nsp4 grubunda 0,13, PInA grubunda 0,03 kat baskılandığı, Nsp4+PInA grubunda ise 0,07 kat arttığı belirlendi (Grafik 7).

Grafik 7. IL-10'un mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri (Negatif ifadeler genin baskılandığını, pozitif ifadeler ise uyarıldığını göstermektedir.)



(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50

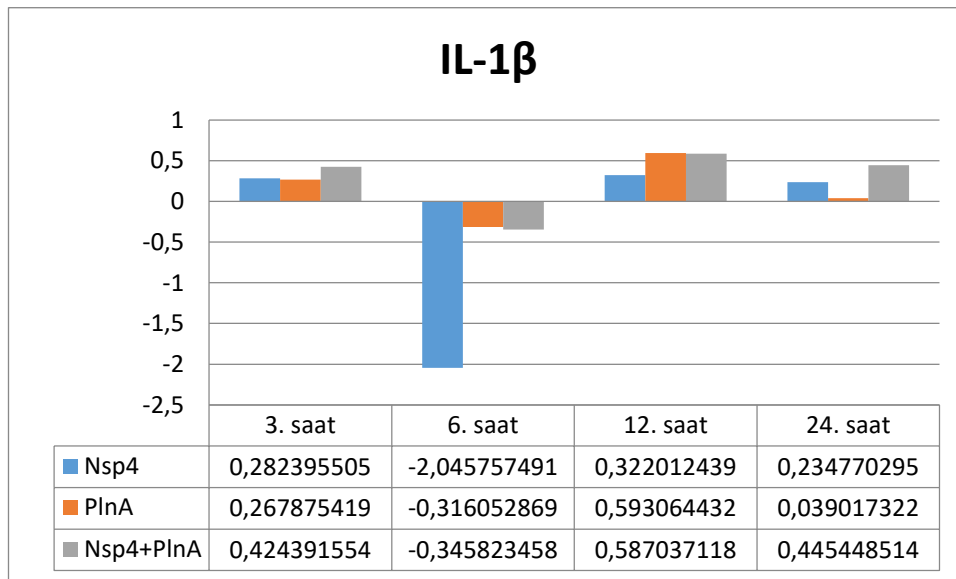
dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA**: PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA**: Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.)

4.9. IL-1 β 'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

Caco-2 hücre hattındaki IL-1 β ekspresyonunun, protein uygulamalarının 3. saatinde Nsp4 grubunda 0,28, PlnA grubunda 0,26, Nsp4+PlnA grubunda 0,42 kat arttığı saptandı (Grafik 8).

6. saatin sonunda IL-1 β ekspresyonunun Nsp4 grubunda 2,04 kat, PlnA grubunda 0,31 kat ve Nsp4+PlnA grubunda 0,34 kat baskılandığı saptandı (Grafik 8). Uygulamaların 12. saatinde Nsp4 grubunda 0,32, PlnA grubunda 0,59, Nsp4+PlnA grubunda ise 0,58 kat olmak üzere IL-1 β ekspresyonunda artış gözlemlendi (Grafik 8). Proteinlere 24 saat maruziyet sonucunda da Nsp4, PlnA ve Nsp4+PlnA gruplarında sırasıyla 0,23, 0,03 ve 0,44 katlık artışlar görüldü (Grafik 8).

Grafik 8. IL-1 β 'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri (Negatif ifadeler genin baskılandığını, pozitif ifadeler ise uyarıldığını göstermektedir.)



(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.)

4.10. IL- 6 'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

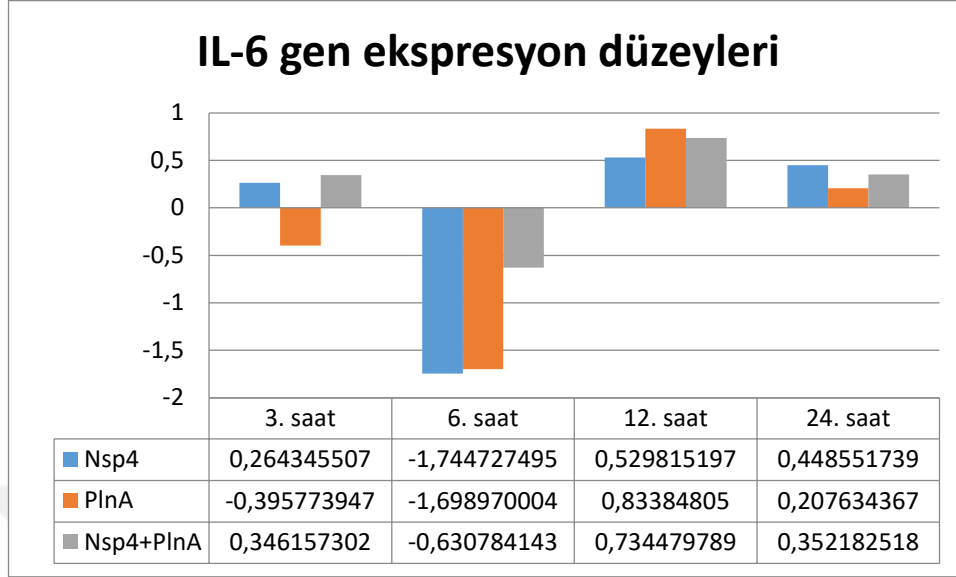
Caco-2 hücre hattına Nsp4 ve PlnA uygulamaları sonucunda IL-6'nın gen ekspresyonunu düzeyleri değerlendirildiğinde (Grafik 9); IL-6'nın, Nsp4 uygulamasının 3. saatinde, 0,26 ve Nsp4 + PlnA ile birlikte uygulandığında 0,34 kat arttığı, sadece PlnA uygulamasında ise 0,39 kat baskılandığı saptandı (Grafik 9).

6 saat maruziyet sonucunda tüm gruplarda IL-6' nın baskılandığı tespit edildi. Buna göre Nsp4, PlnA ve Nsp4+PlnA gruplarında sırasıyla 1,74, 1,69 ve 0,63 kat artışlar saptandı.

Uygulamalardan 12 saat sonra IL-6 gen ekspresyonunun Nsp4 grubunda 0,52 kat, PlnA grubunda 0,83 kat ve Nsp4+PlnA grubunda ise 0,73 kat arttığı görüldü (Grafik 9).

24. saatte ise Nsp4 grubunda 0,44 kat, PlnA grubunda 0,20 kat ve Nsp4+PlnA grubunda 0,35 kat IL-6 gen ekspresyonunu artışları belirlendi (Grafik 9).

Grafik 9. IL-6'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölatif değişimleri (Negatif ifadeler genin baskılandığını, pozitif ifadeler ise uyarıldığını göstermektedir.)



(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PInA:** PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PInA:** Nsp4 ve PInA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.)

4.11. TNF- α 'nın Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

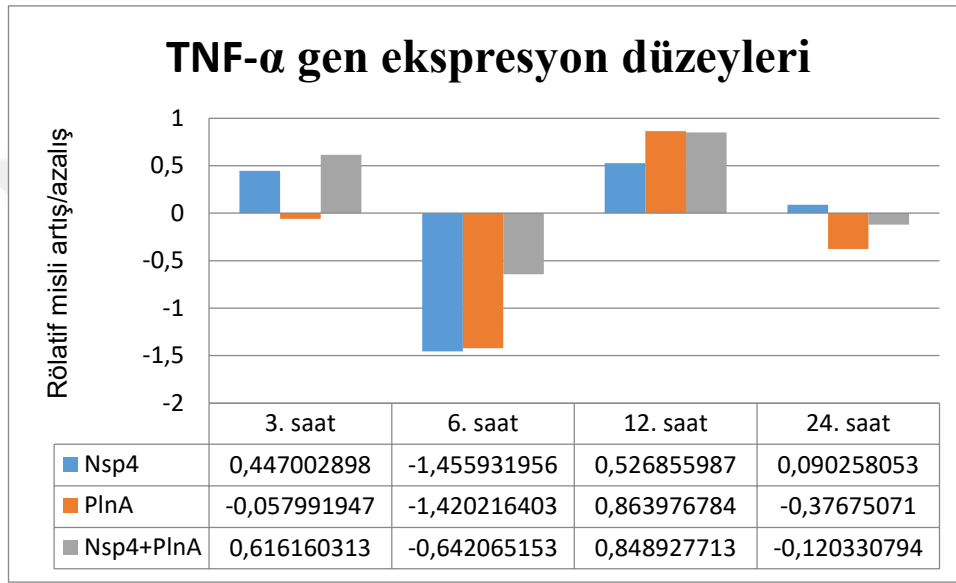
Nsp4 ve PInA ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattındaki TNF- α ekspresyonu sonuçlarına bakıldığında, uygulamanın 3. saatinde Nsp4 grubunda 0,44 kat, Nsp4+PInA grubunda 0,61 kat ekspresyon artışı saptanırken, PInA grubunda ekspresyonun 0,05 kat baskılandığı saptandı (Grafik 10).

6. saatin sonunda Nsp4 grubunda 1,45, PInA grubunda 1,42 kat, Nsp4+PInA 0,64 kat olmak üzere TNF- α ekspresyonunun tüm gruplarda baskılandığı görüldü (Grafik 10).

Uygulamaların 12. saatinde Nsp4 grubunda 0,52, PInA grubunda 0,86, Nsp4+PInA grubunda 0,84 kat olmak üzere TNF- α ekspresyonunda artışlar gerçekleşti (Grafik 10).

Proteinlere 24 saat maruziyet sonucunda ise TNF- α ekspresyonunda; Nsp4 grubunda 0,09 kat artış olurken, PlnA grubunda 0,37 kat, Nsp4+PlnA grubunda 0,12 kat baskılanma görüldü (Grafik 10).

Grafik 10. TNF- α 'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı rölâtif değişimleri (Negatif ifadeler genin baskılandığını, pozitif ifadeler ise uyarıldığını göstermektedir.)



(**Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4:** Nsp4 IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **PlnA:** PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı. **Nsp4+PlnA:** Nsp4 ve PlnA IC50 dozu uygulanmış Caco-2 hücre hattı.)

Tartışma

Rotavirüs kaynaklı enteritler dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Gelişmekte olan ülkelerde rotavirüs kaynaklı akut ishal çocuk ölümlerinin en önemli sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 5 yaşın altındaki çocuklarda şiddetli ishalin en yaygın nedenidir ve her yıl 200.000 kadar çocuk ölümlünden sorumludur (WHO, 2021). Mülteci kamplarındaki çocuklar, nüfus yoğunluğu, kötü hijyen, sanitasyon ve yetersiz beslenme oranları nedeniyle dünyada bu tür hastalıklara karşı en savunmasız kişiler arasındadır (WHO, 2021).

Rotavirüs enfeksiyonlarını önlemede yaygın olarak kullanılan iki rotavirüs aşısı RotaTeq (Merck) ve Rotarix (GlaxoSmithKline, GSK), gelişmiş ülkelerde yüksek etkinlik gösterirken, morbidite ve mortalite oranlarının yüksek olduğu, dolayısıyla rotavirüs aşılara en çok ihtiyaç duyulan az gelişmiş ülkelerde düşük etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Liua ve diğerleri, 2021).

Rotavirüs enfeksiyonlarında, spesifik olmayan antiviral ilaçlar, semptomları hafifletmek için verilen çeşitli sıvı takviyeleri yaygın olarak kullanılan klinik tedaviler arasında yer alırken, probiyotikler patojenlerin kolonizasyonunu önlemede, enfeksiyon gelişimini engellemede ve ayrıca hastaların bağışıklığını iyileştirmede sahip oldukları potansiyel etkileri ile rotavirüs enfeksiyonlarının neden olduğu gastroenterit de dahil olmak üzere bulaşıcı hastalıkların tedavisi ve/veya şiddetinin hafifletilmesinde alternatifler olarak kabul edilmiştir (Yanga, Peia, Qina ve Wei, 2019). Bu nedenlerle bilim insanları yeni arayışlara yönelmiştir.

Laktik asit bakteri probiyotikleri, virüslerle doğrudan etkileşim, antiviral inhibitör maddelerin üretimi ve/veya bağışıklık sisteminin uyarılması gibi çeşitli mekanizmalarla antiviral etki gösterebilmektedir (Al kassaa ve diğerleri, 2014). Maragkoudakis ve arkadaşlarının rotavirüs üzerine yaptıkları çalışmalarda LAB probiyotiklerinin enterik viral enfeksiyonlara karşı olumlu etkileri tespit edilirken, bazı LAB suşlarının, konakçı immünesini uyardığı veya inflamasyonu modüle ettiği bildirilmiştir (Maragkoudakis ve diğerleri, 2010). *Lactobacillus plantarum*'un

bakteriyosini olan plantarisin A'nın toksik etki göstermemesi sebebiyle güvenli kabul edilmiştir ve kullanımı teşvik edilmiştir (Pintoa ve diğerleri, 2011). Ayrıca PInA'nın antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra diğer antimikrobiyal peptitlerin üretimini de kontrol ettiği belirtilmiştir (Zhaoa ve diğerleri, 2006). *Lactobacillus plantarum* ve bu bakterinin bakteriyosini PInA'nın, genellikle süt ürünleri, yoğurt, fermente içecekler dahil olmak üzere çeşitli gıdalarda bulunduğu literatür verilerinde mevcuttur (Brinques ve Ayub, 2011). Ancak süt ürünlerindeki 10 mM ve üzerindeki kalsiyum konsantrasyonlarının rotavirüs enfeksiyonlarında önemli sorunlara yol açma potansiyeline sahip olduğu da belirtilmiştir (Pando, Isa, Arias ve Lopez, 2001). Dolayısıyla, PInA'nın tek başına terapötik ajan olma potansiyelinin bulunması, çalışmamızda bu proteini tercih etmemizin önemli sebeplerinden biri olmuştur.

Sand ve arkadaşları (2013), PInA ile uyarılan hücrelerin membran geçirgenliğine ilişkin ilk çalışmalarında kanserli sıçan hipofiz GH4 hücre hattında saniyeler içinde PInA'nın, hücre membranlarında geçirgenliğine neden olduğunu bildirmişlerdir. Kalsiyum miktarının azalması, viral replikasyon döngüsünün bozulmasına ve rotavirus titresinin düşmesine yol açtığı bildirilmiştir (Shahrabadi ve diğerleri, 1987).

Literatürde Caco-2 hücre hattında Nsp4 ve PInA proteinleri için IC50 dozlarına rastlanmamıştır. Bu çalışmada *Lactobacillus plantarum* bakteriyosini (PInA) için IC50 doz 0.1876 µg/ml, Rotavirüs NSP4 proteini için IC50 doz 0,036 nM olarak belirlenmiş ve uygulamalarda bu dozlar kullanılmıştır. Çalışmamızda Caco-2 hücre hattı çalışma gruplarına PInA ve Nsp4 ayrı ayrı ve birlikte uygulanarak 3, 6, 12, 24 saat sonrası etkilerine bakılmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda rotavirüsün, Nsp4 proteini aracılığıyla böcek ve memeli hücrelerinde hücre içi sitoplazmik Ca⁺² seviyelerini artırabildiği gösterilmiştir (Tian ve diğerleri, 1994; Diaz ve diğerleri, 2008). Çalışmamızda hücre içi kalsiyum miktarındaki en dikkat çekici farklılık 6. saatte gerçekleşmiştir. Nsp4 uygulanan grubun 6. saatinde Ca miktarı kontrol grubuna göre 2,27 kat artarken, Nsp4+PInA birlikte uygulandığında Nsp4 grubuna göre 3,75 kat, kontrol grubuna göre 1,64 kat Ca miktarında azalmanın saptanması, literatür ile uyumlu olarak PInA'nın membran geçirgenliğini arttırarak, rotaviral enfeksiyonlarda virüsün replikasyon sonrası

olgunlaşması ve yaygınlaşmasını önleyebilme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmüştür. Rotavirüsün hücreye bağlanmasında kalsiyum gerekli olmasa da, replikasyon sonrası virionun olgunlaşmasında gerekli olduğu literatür verilerinde belirtilmiştir. (Ludert ve diğerleri,1987; Keljo ve Smith, 1988).

Pando ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada kalsiyum konsantrasyonları 2 mM ve 10 mM olan MA104 hücre hatlarına aynı miktarda viral partikül bağlanmasına rağmen, kalsiyum konsantrasyonu 10 mM olduğunda hücrelere bağlanan partiküllerin enfeksiyöz titresinin, 2 mM konsantrasyonda bağlanan viral partiküllerinkinden daha yüksek olduğunu, kalsiyum konsantrasyon artışının enfeksiyonun daha fazla viral partikülle ilerlemesine sebep olacağını belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada, hücrelere bağlanmak ve hücreleri enfekte etmek için sialik asit varlığına ihtiyaç duyan rotavirüsün, 10 mM'lık kalsiyum konsantrasyonunda hücre yüzeylerindeki sialik asit varlığına daha az bağımlı olduğunu, bunun sebebinin ise yüksek kalsiyum konsantrasyonunun rotavirüs partikülünde konformasyonel değişikliğe sebep olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla rotavirüse duyarlı yaş gruplarındaki bireylerin diyetlerinde ortalama kalsiyum konsantrasyonunun 10 mM olması, rotavirüs replikasyonu için ideal koşulları sağladığını, böylece kişilerin rotavirüs enfeksiyonuna yakalanma ihtimalini arttırdığını, enfeksiyonun oluşumuna ve yayılımına katkı sağladığını belirtmişlerdir (Pando, Isa, Arias ve Lopez, 2001). Bu sebeplerle rotaviral enfeksiyonlarda Nsp4 ile artan hücre içi kalsiyum miktarının PInA uygulaması ile 6. saatte Nsp4 grubundaki kalsiyum miktarına göre 3,75 kat ve 12. saatte Nsp4 grubundaki kalsiyum miktarına göre 2,67 kat düşüyor olması, projemizin en önemli ana hedeflerinden birine ulaştığımızı göstermiştir. Proteinlerin 12 saatlik uygulamalarında, Nsp4 grubundaki Ca miktarında kontrole göre 2,43 kat artış, Nsp4+PInA grubunda ise kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Hücre dışı kalsiyum miktarlarına bakıldığında, Nsp4 uygulanan grupta 3. saatte kontrole göre 1,68 kat azalırken, yine 3. saatteki hücre içi kalsiyum miktarlarına baktığımızda Nsp4 uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir artış olmasa da bir miktar artışın olması, Nsp4' ün hücre dışından, hücre içine kalsiyum akışını sağladığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda da, Nsp4'ün, plazma membran

geçirgenliğini değiştirdiği ve hücreler arası bağlantıların dengesini bozduğu gösterilmiştir (Tian ve diğerleri, 1996; Newton ve diğerleri, 1997). Çalışmamızda, Nsp4 uygulanan hücre hatlarında ilerleyen saatlerde hem hücre içi hem de hücre dışı kalsiyum miktarları artmaya devam etmiştir. Çalışmamızda, Nsp4 ile birlikte PlnA verildiğinde sadece 3. saatte hücre dışı kalsiyum miktarının artması dikkat çekici bulunmuştur. Kalsiyum regölasyonu veya işlevlerinden herhangi birinin bozulması, hücrenel homeostazın bozulmasına ve hücre ölümüne yol açabildiği belirtilmiştir (Bravo-Saguave diğerleri, 2017). Çalışmamızda, PlnA'nın, Nsp4'ün neden olduğu kalsiyum artışını azalttığı tespit edilmiştir, ancak hücre ölümünü azaltıp azaltmadığının araştırılması gerktiği düşünölmüştür.

Hücrenel kalsiyum homeostazı, iyi koordine edilmiş kalsiyum akışı, dışa akış, tamponlama ve depolama süreçleriyle sağlanabilir (Tang ve diğerleri, 2015). ER ve mitokondri gibi organeller bu süreçlerin ayrılmaz bir parçasıdır, kalsiyum akışını ve kalsiyum akışından kaynaklanan zararlı etkileri önlemek için hayati öneme sahiptir (Wang ve diğerleri, 2019). Birçok hastalığın oluşmasının temelinde kalsiyum ve mitokondri dereğölasyonun önemli olduğu, ayrıca mitokondrideki kalsiyum iyonlarının patojenler tarafından kullanıldığı gösterilmiştir (Pando, Isa, Arias ve Lopez, 2001). Projenin hedefleri arasında olmayan bir diğer önemli ıktısı PlnA'nın, hücre içi kalsiyum artışının sebep olduğu diğer hastalıklar ve enfeksiyonlar üzerindeki olumsuz etkileri azaltabileceği potansiyeline sahip olmasıdır.

ER-mitokondriyal Ca^{+2} taşınması, hücrenel metabolizma ve ER stres regölasyonu için çok önemli olduğu literatür verilerinde mevcuttur (Rossi ve diğerleri, 2019). Endoplazmik retikulumun (ER), hücre içi kalsiyum deposu olarak işlev gören ve salgı ve membran proteinlerinin sentezine ve post translasyonel değişikliklerine katkıda bulunan organel olduğu, çeşitli nedenlerle ER fonksiyonlarının bozulmasının, ER stresine ve katlanmamış protein yanıtına (UPR) yol açtığı belirtilmiştir (Martinon, 2012). Bu yanıtın birincil amacının stresi telafi etmek ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamak olduğu bununla birlikte, Ca^{+2} pertürbasyon ajanları gibi aşırı veya uzun süreli ER stres koşullarında, transkripsiyonel faktör C / EBP homolog protein (CHOP) / GADD153 dahil apoptotik aracılardan arttığı ve kaspaz-44'ün aktive olduğu ve bu durumda hücre ölümünün gerçekleşebildiği rapor

edilmiştir (Barlett ve diğerleri, 1992; Oda ve diğerleri, 2008). Bu bilgiler ışığında, plantarisin A'nın, Nsp4'ün neden olduğu ER stres aracılı apoptozise etkilerinin araştırılması gereken konulardan biri olduğu düşünülmüştür.

Hücre dışı ve hücre içi kalsiyum miktarlarında 24. saatin sonunda gruplar arasında anlamlı değişimlerin olmaması uygulanan proteinlerin yarılanma ömürleri dolayısıyla biyolojik aktif kalma süreleri ile alakalı olabildiğini düşündürmüştür. Nitekim diğer bir çok parametrede de 24. saatin sonunda gruplar arasındaki istatistiki farklılaşmanın ortadan kalktığı gözlenmiştir. Dolayısıyla in vivo çalışmalarda PlnA'nın farmokokinetik özelliklerinin incelenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Ayrıca Nsp4 ve PlnA'nın ayrı ayrı uygulandığı gruplarda genel olarak daha belirgin, birlikte uygulandığında ise daha ılımlı değişimlerin olması her iki proteinin birbiriyle etkileşime girerek antagonistik etkilerin söz konusu olabileceği ve bu durumun hangi yollarla meydana geldiğinin aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür.

Kalsiyum konsantrasyonunun birçok hücre sel süreci etkiliyor olması, viral enfeksiyonların oluşumu için gerekli olan konak-virüs etkileşimi, virüslerin giriş, replikasyon, toplanma ve çıkış gibi viral süreçleri kolaylaştırmak ve viral yayılım için elverişli ortamın oluşmasında önemli olduğu belirtilmiştir (Pando, Isa, Arias ve Lopez, 2001). Viral enfeksiyonlar ve viral proteinlerin Ca^{+2} seviyelerindeki değişikliklerle ilişkilendirildiği birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; HIV'in yaşam döngüsünde ve patojenitede anahtar rol oynayan Nef proteini, sitozolik Ca^{+2} seviyelerindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Berridge et al., 2000; Manninen ve Saksela, 2002). Bir diğer örnek HBV HBx proteini dir. Enfeksiyonu sırasında bu proteinin mitokondriyal Ca^{+2} 'nin sitoplazmaya salınmasını tetiklediği saptanmıştır (Xia ve diğerleri, 2006). Yüksek seviyelerde sitozolik Ca^{+2} HBV'nin çekirdek oluşumunu kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Choi ve diğerleri, 2005). Benzer bir durum HCV'de görülmüş, HCV çekirdeği ve yapısal olmayan protein NS5A'nın konakçı kalsiyum sinyalinini modüle ettiği gösterilmiştir (Dionisio ve diğerleri, 2009). HCV'nin mitokondriyal Ca^{+2} atılımını kolaylaştırarak, sonuçta ROS üretimine ve HCV ile enfekte olmuş hücrelerin apoptozuna yol açtığı belirtilmiştir (Li ve diğerleri,

2007). HCV ile ilgili bir diğerk çalışmada; HCV viroporin proteini p7'nin, ER zarı üzerinde heksamerik bir kanal oluşturabildiği ve ER Ca^{+2} 'nın sitozole salınmasını teşvik edebildiği gsterilmiştir. dolayısıyla p7'yi bloke eden molekollerin, viral replikasyonun önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Griffin ve diğerkleri, 2003). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda PInA'nın Nsp4 varlığında hücre içi kalsiyum miktarını azaltmış olması, bahsi geçen proteinlerin hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını arttırarak sebep oldukları enfeksiyonların ve hastalıkların erken dönemde önlenebilmesi konusunda oldukça umut verici oldukları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, Caco-2 hücre hattına NSP4 ve PInA proteinlerinin uygulanmasını takiben 3., 6., 12. ve 24. saatlerlerde bazı antiinflamatuvar ve proinflamatuvar genlerinin ekspresyon ve protein düzeylerine bakılmıştır.

IL-10'un, güçlü anti-inflamatuar etkilerinin olabileceği literatür verilerinde mevcuttur (Waal Malefyt ve diğerkleri, 1991). IL-10'un ayrıca enterik enfeksiyonlarda ve bağırsak inflamasyonunda önemli rolü olduğu, TNF- α 'nın yüksek, IL-10'un düşük olduğu durumlarda özellikle irritable bağırsak sendromu olan kişilerde ishalin daha fazla görüldüğu öne sürülmüştür (Van der Veek, 2005). Çalışmamızda, protein düzeylerine bakıldığında, IL-10 seviyesinde herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre Nsp4+PInA grubunda uygulamanın 3. saatinde 2 kat, 6. saatinde 1,43 kat artış saptanmış, 12. saatte ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 24. saate gelindiğinde Nsp4+PInA grubunda tekrar 1,13 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, projemizin önemli hedeflerinden biri olan PInA'nın anti-inflamatuar etkisinin olduğunu kanıtlayıcı niteliktedir.

Anti-inflamatuar sitokin olarak IL-10'un mRNA düzeylerine bakıldığında, en dikkat çekici sonuca 6. saatte ulaşılmıştır. Kontrole göre, Nsp4 6. saatte IL-10'un gen ekspresyonunu 1,65 kat baskılarken, Nsp4+PInA uygulamasında PInA bu baskılanmayı azaltmış, hatta 12. saatte IL-10'un mRNA düzeyini 0,68 kat arttırmıştır. Bu sonuçlar da PInA'nın antiinflamatuvar etkisi olduğu düşüncesini desteklemiştir. 24. saatte Nsp4 uygulanan grupta antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un kontrole göre baskılandığı, Nsp4 ve PInA'nın birlikte verildiği grupta IL-10'un gen ekspresyonunu arttırarak Nsp4'ün oluşturduğu inflamasyonu engelleyebilme

potansiyeline sahip olduğu, Nsp4 ve PInA'ya 24 saatten daha uzun süre maruz kalan hücre hatlarında etkilerin nasıl olacağı konusunda kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği şeklinde yorumlanmıştır.

IL-6, akut inflamatuvar yanıtların indüklenmesini ve kemik iliğinden nötrofil mobilizasyonu sağladığı belirtilmiştir (Scheller ve diğerleri, 2011). Çalışmamızda Caco-2 hücrelerinin proteinlere maruziyetlerinde gen ekspresyonlarıyla protein düzeylerinin uyumlu olmaması, 12. saatte gen ekspresyonlarında artış gözlenirken protein düzeylerindeki anlamlı artışın 24. saatte gözlenmesi eksprese edilen genlerden hücresel düzeyde protein artışı olabilmesi için zaman gerektirebileceğini düşündürmüştür. Gen ekspresyonlarının protein düzeyine yansımamasının bir başka ihtimalinin de translasyonel ya da post translasyonel katlanmaların gerçekte gerçekleşmediği düşüncesi olmuştur. Bu durum, PInA'nın konak savunmasını modüle ederek protein oluşumunda inhibe edebildiğini göstermiştir.

Çalışmamızda Caco-2 hücrelerinin proteinlere maruziyetinin 3. saatinde IL-6 gen ekspresyonu kontrole göre, Nsp4 ile 0,26 kat uyarılırken, NSP4 ve PInA birlikte uygulandıklarında ise gen ekspresyonunun 0,34 kat artması IL-6'nın immün yanıtın erken modülasyonunda önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca proteinler arasında etkileşimin olabileceğini bir kez daha düşündürmüştür. IL-6, IL-1 β ve lökotrien sentez enzimleri gibi bağışıklık etkinleştirici proteinler ve sitokinlerin viral içerikleri nötralize ettiği bilinmektedir (Laing ve diğerleri, 2020; Wu, 2020).

Coronavirüsler, T hücre yanıtını baskılamak ve kademeli sitokin fırtınası başlatmak için bağışıklık hücrelerinde inflamatuvar programları indükleyen IL-6 ve IL-1 β üretimini uyardığı bildirilmiştir (Chowdhury ve diğerleri, 2020; Remy ve diğerleri, 2020). Nsp4+ PInA grubundaki gen ekspresyon seviyelerinin protein seviyelerine yansımamasının sebebi PInA'nın immünmodülatör etkilerinin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır ve bu durum diğer enfeksiyon hastalıkları için de umut verici olabilir.

Carswell ve diğerleri (1975) TNF- α 'yı , ilk olarak, tümörlerin nekrozuna aracılık eden bir sitokin olarak tanımlamışlar ve daha ileri çalışmalarla, TNF- α 'nın,

inflatuar yanıtın güçlü ve temel bir aracısı olduğunu keşfetmişlerdir. TNF- α 'nın anormal düzenlemeleri, romatoid artrit (RA) ve inflammatuar bağırsak hastalığı (IBD) gibi birçok immün aracılı inflammatuar hastalık ile ilişkilendirilmiş olup, şu anda klinikte başarıyla kullanılan TNF- α 'yı hedef alan terapötik ajanların geliştirilmesine yol açmıştır (Kalliolias ve Ivashkiv, 2016; Sedger ve McDermott, 2014). Bununla birlikte, TNF- α antagonistlerinin şiddetli viral (rotavirüs dahil) ve bakteriyel enfeksiyonlar riskini artırdığını, dolayısıyla hasta gruplarında kullanımını sınırlandırdığı belirtilmiştir (Kim ve Solomon, 2010; Sedger ve McDermott, 2014). Hakima ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın hem hücre içi hem de hücre dışı seviyelerde güçlü bir anti-rotavirüs etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, klinik olarak kullanılan TNF- α inhibitörlerinin (in-fliximab) bu etkiyi tamamen bloke edebileceğini ve bu tedavilerin latent veya aktif viral enfeksiyonları olan hastalarda kullanımı konusunda dikkatli olunmasını gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda Nsp4 uygulaması yapılan Caco-2 hücrelerinde 3.,6.,12. ve 24. saatlerde TNF- α 'nın protein düzeyinde artışlar görülmüştür. Nsp4 ve PlnA ile birlikte uygulandığında da tüm saatlerde TNF- α 'nın protein düzeyinde benzer artışların görülmesi, PlnA'nın TNF- α 'ya antagonistik etki yapmadığını göstermiştir.

Gen ekspresyonlarına bakıldığında Nsp4 ve Nsp4+ PlnA uygulanan gruplarda 6. saatte TNF- α ekspresyonunda bir baskılanma olsa da, TNF- α 'nın protein düzeyinde azalmaya sebep olmaması sevindirici bulunmuştur.

IL-1 β , hücreler arası hücre adezyon molekülü (ICAM) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) gibi endotelial hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonu yoluyla dokulara lökosit göçünü tetikleyen ve teşvik eden endojen bir pirojen olduğu, sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu sağlayarak fagositoz ve hasar bölgesinde yeniden şekillenmeyi desteklediği belirtilmiştir (Delaleu ve Bickel, 2004; Dinarello, 2009). Rotavirüs enfeksiyonunun hematopoietik hücrelerde IL-1 β ekspresyonunun artışına sebep olduğu belirtilmiştir (Holloway ve Coulson, 2013).

Çalışmamızda, Nsp4 ve Nsp4+ PlnA uygulanan çalışma gruplarında 3 saatlik maruziyetinin ardından IL-1 β seviyesinde artış gözlenmiştir. 6. saatte Nsp4 uygulanan grupta IL-1 β artarken, Nsp4'ün PlnA ile birlikte uygulandığı gruptaki

protein düzeyinin kontrol grubuyla benzer seviyede olması, PInA'nın Nsp4'ün oluşturduğu proinflamatuvar etkiyi azaltabileceği konusunda umut verici olmuştur.

IL-1 β 'nin gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında, genel olarak Nsp4 uygulanan gruplara göre Nsp4 ve PInA'nın birlikte uygulandığı gruplarda IL-1 β ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. Nsp4 ve PInA'nın birlikte uygulandığı gruplarda, gen ekspresyon seviyeleri artarken, protein düzeyindeki azalmalar PInA'nın translasyonel mekanizmaları etkileyebileceğini düşündürmüştür. IL-1 β 'nin, hasara veya enfeksiyöz ajanların varlığına yanıt olarak eksprese edildiği, protein sentezi tamamlandıktan sonra, IL-1 β hücre sitoplazmasında öncüsü (pro-IL-1 β) şeklinde biriktiği ve bir kompleks tarafından gerçekleştirilen translasyon sonrası bir işlemin ardından salınmayı beklediği bildirilmiştir (Franchi ve diğerleri, 2009).

Makrofajlardan salınan inflamazomun viral enfeksiyonlarla özellikle inflamatuvar oluşumu tetikleyen etkiye sahip olan Herpesviridae familyası, Adenovirus tip V ve Influenza virüsü ile ilişkili olduğu ve bahsi geçen virüslerin IL-1 β salınımını ve tip I interferonlar gibi diğer sitokinlerin üretimini önlediği belirtilmiştir (Morales-Aguilar, 2020). Enfeksiyon durumunda, virüsün, nükleer transkripsiyon faktörü kB (NFkB) aktivasyonunu indüklediği, bunun da IL-1 β dahil olmak üzere birkaç genin ekspresyonunu indüklediği rapor edilmiştir (Fredericksenet ve diğerleri, 2015). Bu bilgiler ışığında PInA'nın bahsi geçen viral enfeksiyonlardaki IL-1 β ekspresyon ve protein düzeylerinin üzerindeki etkilerini aydınlatılması gereken konular arasında yer almıştır.

Sonuç ve Öneriler

Küresel sağlık sorunu haline gelen rotavirus enfeksiyonlarına karşı 2006 yılında lisans alan 2 oral aşı [Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals) ve RotaTeq (Merck & Co., Inc.)], Mart 2017 itibariyle 92 ülke aşı programlarında kullanılıyor olmasına rağmen, rotavirüs enfeksiyonları <5 yaş ve altındaki binlerce çocuğun ölümünden sorumlu olan ishal vakalarının %38'ini oluşturmaktadır. (Lanata ve diğerleri, 2013; Tate ve diğerleri, 2016). Bu durumun sebepleri şöyle sıralanabilir:

İlk olarak, rotavirüs ile ilgili ölümlerin en fazla olduğu 10 ülkenin sadece yarısı ulusal olarak rotavirüs aşılarını kullanıma sunmaktadır (WHO, 2016).

İkincisi, yüksek ve orta gelirli ülkelerde rotavirüs aşıları oldukça etkili olmasına rağmen (diyare karşı% 90–95 koruma), hastalık oranının en yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde rotavirüs aşıları daha az etkili olmaktadır (<% 50 koruma) (Clarke ve Desselberger, 2015; Lepage ve Vergison, 2012). Son olarak, insanların hayvanlarla yakın temaslarının söz konusu olduğu durumlarda rotavirus suşları arasında gerçekleşen genetik aktarımlarla yeni suşların ortaya çıkması olumsuz etkilemektedir (Chakraborty ve diğerleri, 2016; Yodmeeklin ve diğerleri, 2017) Bu yüzden, rotavirus gastroenteritlerinin önlenmesi ve azaltılmasıyla ilgili yeni yaklaşımların geliştirilmesi önemlidir.

Diğer önemli husus ise, gıdalarla alınan LAB türleri insanlara, hayvanlara ve patojenik mikroorganizmalara aktarılma potansiyeli olan antibiyotik direnç genleri için bir rezervuar görevi görebilmektedir (Chuah ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla, antibiyotik direnç genleri, patojenik bakterilere aktarılabilenlerinden önemli bir güvenlik sorunu oluşturmaktadır (Fasoli ve diğerleri, 2003). Canlı probiyotik kültürlerin uygulanması konusundaki başka bir endişe ise canlılık oranlarının beklenen standartların altında olmasıdır (Vinderola ve diğerleri, 2011). Ayrıca probiyotik kültürlerin etkinliği hücre canlılığında azalma olmadan da etkilenebilmektedir (Besselink ve diğerleri, 2008). Çeşitli klinik çalışmalar canlı

bakteri kullanımının akut inflamasyon ve artmış mortalite gibi olumsuz etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Klaenhammer ve diğerleri, 2012; Tsilingiri ve diğerleri, 2012). Bu durum yapılacak çalışmalarda probiyotiklere olduğu kadar bakteriyosin vb. metabolitlerinin üzerinde durulması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmada elde edilen bulgular ve literatür verilerinden elde edilen bilgiler ışığında; sonuç olarak Rotavirüs Nsp4 proteinin hücre içi ve hücre dışı kalsiyum seviyelerini zamana bağlı olarak arttırdığı, PInA 'nın ise Nsp4 ile birlikte uygulamalarında bu durumu baskıladığı, dolayısıyla viral enfeksiyonun erken dönemlerinde virüsün çoğalmak için kullandığı sitozolik kalsiyumu azaltma potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.

Bu araştırmada ulaşılan diğer önemli bulgu ise terapötik ajan olarak uygulanan plantarisin A'nın yapılanan RT-PZR ve ELISA deneyleriyle proinflamatuvar gen ekspresyon seviyelerindeki ve protein düzeylerindeki artışlar olmuştur. Çalışmamızda, PInA'nın antiinflamatuvar sitokin olarak IL-10'un hem gen ekspresyon seviyelerini hem de protein düzeyinde arttırması umut vericidir.

PInA'nın, ileri ki in vivo çalışmalarla, koruyucu ya da tedavi amaçlı yeni bir terapötik ajan olarak, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine önemli ölçüde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Akkutay Yoldar, Z., Alkan, F. (2019). Rotavirus Enfeksiyonunun Moleküler Patogenezi, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(1),60-67.
- Al Kassaa, I., Hober D., Hamze M., Chihib N.E., Drider D. (2014). Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. Probiotics & Antimicro. Prot. 6:177–185.
- Angel, J., Tang, B., Feng, N., Greenberg, H.B., Bass, D. (1998). Studies of the role for NSP4 in the pathogenesis of homologous murine rotavirus diarrhea. J Infect Dis.177:455–8.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Converti, A., de Souza Oliveira, R.P., (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control, 32, 134-142.
- Ball, J.M., Tian, P., Zeng, C.Q., Morris, A.P., Estes, M.K. (1996). Age-dependent diarrheainduced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. Science 272 (April (5258)),101–104.
- Barreto, F.M., Simao, A.N.C., Morimoto, H.K., Lozovoy M.A.B., Dichi I., and da Silva Miglioranza H.L. (2014). Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. Nutrition 30:939–942.
- Bartlett, J.D., Luethy, J.D., Carlson, S.G., Sollott, S.J., Holbrook, N.J. (1992). Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, gadd153. Ca²⁺ increases transcriptional activity and mRNA stability. J Biol Chem. 1992;267(28):20465–70.
- Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilleley, M., Pre´vost H, , Connil N. (2011). Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. Res Microbiol 162:159–163.
- Berkova, Z., Crawford, S.E., Trug nan, G., Yoshimori, T., Morris, A.P., Estes, M.K., (2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. J. Virol. 80 (June (12)), 6061–6071.

- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- Besselink, M.G., Van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A., Van Goor, H., Timmerman, H.M., et al. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;371:651–9.
- Boshuizen, J.A., Reimerink, J.H., Korteland-van Male, A.M., Van Ham, V.J., Koopmans, M.P., Buller, H.A., et al.(2003). Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol.* 77(24):1300516.
- Bravo-Sagua, R., Parra, V., López-Crisosto, C., Díaz, P., Quest, A.F., Lavandero, S., (2017). Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Compr Physiol* 7, 623–634. <https://doi.org/10.1002/cphy.c16001>.
- Brinques, G. B., M. A. Z., Ayub. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *J. Food Eng.* 103:123–128.
- Broome, R.L., Vo, P.T., Ward, R.L., Clark, H.F., Greenberg, H.B., (1993). Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *J. Virol.* 67 (May (5)), 2448–2455.
- Brunet, J.P., Cotte-Laffitte, J., Linxe, C., Quero, A.M., Geniteau- Legendre, M., Servin, A. (2000). Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol.* 74(5): 2323–32.
- Bugaric, A., Taylor, J.A. (2006). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 80 (December (24)),12343–12349.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.* 72, 3666–3670.

- Chaibi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandre, C., Esclatine, A., Servin, A.L., Quero, A.M., et al.(2005). Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology*. 332(2):480–90.
- Chakraborty, P., Bhattacharjee, M.J., Sharma, I., Pandey, P., Barman, N.N. (2016). ‘Unusual rotavirus genotypes in humans and animals with acute diarrhoea in northeast India’. *Epidemiol Infect* 144:2780–9
- Chang-Graham, A.L., Perry, J.L., Strtak, A.C., Ramachandran, N.K., Criglar, J.M., Philip, A.A., Patton, J.T., Estes, M.K., Hyser, J.M. (2019). Rotavirus calcium dysregulation manifests as dynamic calcium signaling in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. *Scientific Reports*, 9:10822 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46856-8>.
- Choi, Y., Gyoo Park, S., Yoo, J.-h., Jung, G. (2005). Calcium ions affect the hepatitis B virus core assembly. *Virology* 332 (1), 454–463. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.019>.
- Chowdhury, M.A. ve diğerleri , (2020). Immune response in COVID-19: A review, *J Infect Public Health* 13 (11) 1619–1629 .
- Chuah, L. , Shamila-Syuhada, A.K., Liong, M.T. , Rosma, A., Thong, K.L. , Rusul, G. (2016). Physio-chemical, microbiological properties of tempoyak and molecular characterisation of lactic acid bacteria isolated from tempoyak. **Food Microbiology** Volume 58, September 2016, Pages 95-104.
- Clark, H.F., Lawley, D.A., Schaffer, A., Patacsil, J.M., Marcello, A.E., Glass, R.I., Jain, V., Gentsch, J. (2004). Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995–1996 season, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 1434–1438.
- Clarke, E., Desselberger, U. (2015). Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. *Mucosal Immunol* 2015;8:1–17.
- Cordle, C.T., Schaller, J.P, Winship, T.R, Candler, E.L., Hilty, M.D., Smith, K.L., et al.(1991) Passive immune protection from diarrhea caused by rotavirus or E. coli: an animal model to demonstrate and quantitate efficacy. *Adv Exp Med Biol.* 310:317–27.

- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., Estes, M.K., (2012). Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase signaling is required for rotavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (December(50)), E3405–E3413.
- Crawford, S.E., Estes, M.K., (2013). Viroporin-mediated calcium-activated autophagy. *Autophagy* 9 (May (5)), 797–798.
- Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, Article number:17083 doi:10.1038/nrdp.2017.83 Published online 9 Nov 2017.
- Das, D., Goyal, A. (2014). Characterization of a noncytotoxic bacteriocin from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 with potential as a food preservative. *Food Funct* 5:2453–2462.
- Delaleu, N., Bickel, M.. (2004). Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol.* 2000 (35), 42–52. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6713.2004.003569.x>
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Research* 190 (2014) 75–96.
- Diaz, Y., Chemello, M.E., Pena, F., Aristimuno, O.C., Zambrano, J.L., Rojas, H., Bartoli, F., Salazar, L., Chwetsoff, S., Sapin, C., Trugnan, G., Michelangeli, F., Ruiz, M.C. (2008). Expression of nonstructural rotavirus protein NSP4 mimics Ca²⁺ homeostasis changes induced by rotavirus infection in cultured cells. *J Virol.* 82(22):11331–43.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. (1994). The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 160–166.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Majano, P.L., Benedicto, I., Rosado, J.A., Salido, G.M., Gonzalez-Gallego, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated

- calcium signalling alterations in hepatocytes. *J. Hepatol.* 50 (5), 872–882.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.026>.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.Y., Blixt, O., Paulson, J.C., Wagner, G., Harrison, S.C.(2002).Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J. Virol.* 76 (October (20)), 10512–10517.
- Drider, D, Bendali, F., Naghmouchi, K., Chikindas, M.L. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 8(4):177-182.
- Estes, M.K., Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function, *Microbiol. Mol.Biol. Rev.* 53 (1989) 410–449.
- Estes, M.K., Conner, M.E., Gilger, M.A., Graham, D.Y. (1989) Molecular biology and immunology of rotavirus infections. *Immunol Invest* 1989;18:571–81.
- Estes, M.K., Kang, G., Zeng, C.Q., Crawford, S.E., Ciarlet, M. (2001). Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.* 238:82–96.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PZR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol.* 2003;82:59–70.
- Feng, N., Yasukawa, L.L., Sen, A., Greenberg, H.B., (2013). Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J. Virol.* 87 (August (15)), 8307–8316.
- Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H., Woode, G.N., Bridger., J.C., Derrick, J.M.. (1974). *Lancet.* 2 (July (7872)) (1974), pp. 61-63.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Nuñez, G., (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* 10, 241–247.<https://doi.org/10.1038/ni.1703>.
- Fredericksen, F., Carrasco, G., Villalba, M., Olavarría, V.H. (2015). Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF-κB signaling pathway. *Mol. Immunol.* 68, 213–222.<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.08.010>.
- Ge, Y., Mansell, A., Ussher, J.E., Brooks, A.E., Manning, K., Wang, C.J., Taylor, J.A. (2013). Rotavirus NSP4 triggers secretion of proinflammatory cytokines from macrophages via toll-like receptor 2. *J Virol* 87(20): 11160–7.

- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535, 34–38. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03851-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03851-6).
- Hakima, M., Dinga, S., Chena, S., Yina, Y., Sua, J., Woudea, C.J., Fuhlera, G.M., Peppelenboscha, M.P., Pana, Q., Wang, W. (2018). Viruses TNF- α exerts potent anti-rotavirus effects via the activation of classical NF- κ B pathway. Contents lists available at ScienceDirect *Virus Research Journal* homepage: www.elsevier.com/locate/.
- Halasz, P., Holloway, G., Coulson, B.S. (2010). Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *J Gen Virol.* 91(Pt 8):2007–18.
- Hancock, R.E.W, Scott, M.G., (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 8856–8861
- Hancock, R.E.W., (2001). Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet, Infect. Dis.* 1 (2001) 156–164
- Holloway, G., Coulson B.S. (2013). Innate cellular responses to rotavirus infection. *Journal of General Virology* (2013), 94, 1151–1160 DOI 10.1099/vir.0.051276-0.
- Hornbeck, P. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol* 2001, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0201s01> (Chapter 2: Unit 2.1)
- Hsing, C-H., Chou, W., Wang, J-J., Chen, H-W., Yeh, C-H. (2011). Propofol increases bone morphogenetic protein-7 and decreases oxidative stress in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 26, Issue 4, April 2011, Pages 1162–1172, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq572>.
- Hyser, J.M., Collinson-Pautz, M.R., Utama, B., Estes, M.K. (2010). Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *mBio.* doi: 10.1128/mBio.00265-10.
- Hyser, J.M., Estes, M.K. (2015). Pathophysiological consequences of calcium-conducting viroporins. *Annu Rev Virol* 2, 473–496.

- Jayaram, H., Estes, M.K., Prasad, B.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 101 (April (1)), 67–81.
- Jennsen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491–511
- Kalliolias, G.D., Ivashkiv, L.B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 49–62.
- Kato, R., Mizuno, S., Kadowaki, M., Shiozaki, K., Akai, M., Nakagawa, K., Oikawa, T., Iguchi, M., Osanai, K., Ishizaki, T., Voelkel N., Toga, V. (2016). Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Kato et al. *Respiratory Research* (2016) 17:139 DOI 10.1186/s12931-016-0452-2
- Keljo, D.J., Smith, A.K. (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 249–256.
- Kim, S.Y., Solomon, D.H. (2010). Tumor necrosis factor blockade and the risk of viral infection. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 165–174.
- Kiyoung, K., Gyeonghweon, L., Hien, D., Thanh, Jong-Hwa, K., Maytiya, K., Seokmin, Y., Wonyong, K. (2017). Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 101:5702–5712 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14151>
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M, Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256–3267.
- Klaenhammer, T.R., (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 (1993) 39–85.
- Klaenhammer, T.R., Kleerebezem, M., Kopp, M.V., Rescigno, M. (2012). The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat Rev Immunol* Nature Publishing Group. 2012;12:728–34.
- Kocabaş, E., Timurtaş Dayar, G., (2015). Rotavirüs aşılı. *Journal of Pediatric Infection.* 9(4):166-74.

- Kristiansen, P.E., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. (2005). Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22945–22950
- Kumariya, R., Garsa, A.K., Rajput, Y.S., Sood, K., Akhtar, N., Patel, S. (2019). Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria, *Microb. Pathog.* 128 (2019) 171–177.
- Laing, A.G. ve diğerleri. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis, *Nat. Med.* 26 (10) (2020) 1623–1635 .
- Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., Black, R.E. (2013). Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 2013;8:e72788.
- Lepage, P., Vergison, A. (2012). Impact of rotavirus vaccines on rotavirus disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10:547–61.
- Li, Y., Boehning, D.F., Qian, T., Popov, V.L., Weinman, S.A. (2007). Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺-uniporter activity. *FASEB J.* 21 (10), 2474–2485. <https://doi.org/10.1096/fsb2.v21.1010.1096/fj.06-7345com>
- Li, W., Liu, M., ve Xie, J. (2016). *Journal of Interferon & Cytokine Research* Vol. 36, No. 2 Research Reports Rv3369 Induces Cytokine Interleukin-1 β Production and Enhances Mycobacterium smegmatis Intracellular Survival. Published Online: 2 Feb 2016 <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0090>.
- Li, K., Guo, W., Li, Z., Wang, Y., Sun, B., Xu, D., Ling, J., Song, H., Liao, Y., Wang, T., Jing, B., Hu, M., Kuang, Y., Wang, Q., Yao, F., Sun, A., Zhu, L., Wang, L., Deng, J. (2019). LDH2 Repression Promotes Lung Tumor Progression via Accumulated Acetaldehyde and DNA Damage. *Neoplasia*. Volume 21, Issue 6.
- Liua, C., Huangb, P., Zhaoc, D., Xiab, M., Zhongb, W., Jiangb, X., Tan M. (2021). Effects of rotavirus NSP4 protein on the immune response and protection of the SR69A-VP8* nanoparticle rotavirus vaccine . *Vaccine* 39 (2021) 263–271.

- Ludert, J.E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F., Esparza, J., (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27 (2), 95–101.
- Lundgren, O., Svensson, L., (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 3:1145–56.
- Manninen, A., Saksela, K. (2002). HIV-1 Nef interacts with inositol trisphosphate receptor to activate calcium signaling in T cells. *J. Exp. Med.* 195, 1023–1032. <https://doi.org/10.1084/jem.20012039>.
- Maragkoudakis, P.A., Chingwaru, W., Gradisnik, L., Tsakalidou, E., Cencic, A. (2010). Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *Int J Food Microbiol* 141:S91–S97.
- Martinon, F. (2012). Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden). 2012;51(7):822–30.
- Mathur, H., Rea, M.C, Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P, (2015). The lactobionic subclass of bacteriocins: an update, *Curr. Protein Pept. Sci.* 16 (2015) 549–558.
- Mattila-Sandholm, T., Mattö, J., Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int Dairy J* 1999;9:25–35. 22.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst M., Johne, R. (2012). *Arch. Virol*, 157 (June (6)) (2012), pp. 1177-1182
- McElhaney, R.N, Prenner, E.J. (Eds.), (1999). Special issue on the interactions of antimicrobial peptides with model lipid bilayer and biological membranes, *Biochem. Biophys. Acta*, 1462, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1999, pp. 1-2.
- Meindl, K., Schmiederer, T., Schmiederer, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértesy, L., Wink J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, G.M., Süßmuth R.D. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (2010) 1151–1154.
- Merk, K., Borelli, C., Korting, H.C. (2005). Lactobacilli - bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *Int J Med Microbiol* 2005;295:9–18.

- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Rossero, A., Ferchichi, M., Pre'vost, H., Drider, D., Manai, M., Dousset, X. (2011). Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *Int Microbiol* 14:103–110
- Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., et al.(2014). Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*. 42:48–53.
- Michelangeli, F., Liprandi, F., Chemello, M.E., Ciarlet, M., Ruiz, M.C. (1995). Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J Virol*. 69(6):3838–47.
- Mikirova, N.A., Kesari, S., Ichim, T.E., ve Riordan, N.H. (2017). Effect of Infa-Kine supplementation on the gene expression of inflammatory markers in peripheral mononuclear cells and on C-reactive protein in blood. Mikirova et al. *J Transl Med* (2017) 15:213 DOI 10.1186/s12967-017-1315-4.
- Morales-Aguilara, A., López-Reyesa, Y., Regalado-Huitróna, M., Sarmiento-Silvab, R.E., Arriaga-Pizanoc, L., Benitez-Guzmana, A. (2020). The NADL strain of bovine viral diarrhea virus induces the secretion of IL-1 β through caspase 1 in bovine macrophages. *Science Direct Research in Veterinary Science journal homepage:www.elsevier.com/locate/*
- Mujagic, Z., P. De Vos, M. V. Boekschoten, C. Govers, H.-J. H. Pieters, N. J. De Wit, P. A. Bron, A. A. Masclee, and F. J. Troost. (2017). The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; A randomized double-blind placebo controlled trial. *Sci. Rep.* 7:40128..
- Nes, I. F., Yoon, S. S. and Diep, D. B., (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology*, 16, 675-690.
- Newton, K., Meyer, J.C., Bellamy, A.R., Taylor, J.A. (1997). Rotavirus nonstructural gly-coprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J.Virol.* 71 (December (12)), 9458–9465.

- Ngaa, N.T.H., Ngoca, T.T.B., Trinha, N.T.M., Thuoca, T.L., Thao, D.T.P., (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry* 610 (2020) 113937 Available online 5 September 20200003-2697/© 2020 Elsevier Inc.
- Oda, T., Kosuge, Y., Arakawa, M., Ishige, K., Ito, Y. (2008). Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res.* 2008;60(1):29–39.
- O’Ryan, M. (2009). The ever-changing landscape of rotavirus serotypes *pediatr, Infect.Dis.J.*28(2009)S60–S62, <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181967c29>.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., Lopez, S. (2001). Influence of Calcium on the Early Steps of Rotavirus Infection. *Virology* 295,190–200 (2002) doi:10.1006/viro.2001.1337, available online at <http://www.idealibrar>
- Pintoa, D., Marzanib, B., Minervinia, F., Calassoa, M., Giulianib, G., Gobbettia, M., Angelisa, M. (2011). Plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces in vitro proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF- α 1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes *Peptides* 32. 1815–1824 Science Direct *Peptides* journal homepage:www.elsevier.com/locate/peptides.
- Preciado, G.M, Michel, M.M., Villarreal-Morales, S.L., Flores-Gallegos, A.C., Aguirre Joya, J., Morlett-Chavez, J., Aguilar, C.N., Rodriguez-Herrer, R., (2016). Antibiotic Resistance, Elsevier Inc., 2016, pp. 329–350, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00016-2>
- Quintero-Gil, C., Parra-Suescún, J., Lopez-Herrera, A., Orduz, S. (2017). In-silico design and molecular docking evaluation of peptides derivatives from bacteriocins and porcine beta defensin-2 as inhibitors of Hepatitis E virus capsid protein. *Virus disease.* 28(3):281-288.
- Radaica, A. , Bispo de Jesusb, M., Kapilaa, Y.L. (2020). Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. *Journal of Controlled Release* journal homepage www.elsevier.com/locate/jconrel.
- Remy, K.E. ve diğeri. (2020). Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections, *JCI Insight* 5 (17) (2020).

- Rios, A.C., Mountinho, C.G., Pinto, F.C., Del Fiol, F.S., Chauad, M.V., Vila, M.D.C., Teixeira J.A., Balcao V.M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art, *Microbiol. Res.* 191 (2016) 51–80.
- Rossi, A., Pizzo, P., Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1866 (7), 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.0>
- Ruiz, M.C., Cohen, J., Michelangeli, F. (2000). Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 28:137–49.
- Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., López, S. (2004). Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78 (March (5)), 2310–2318.
- Sand, S.Y., Nissen-Meyer, J., Sand, O., Haug, T.M. (2013). Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828 (2013) 249–259.
- Sastri, N.P., Crawford, S.E., Estes, M.K. (2016). In *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*, Elsevier Academic Press, 2.4, 145–174.
- Seo, N.S., Zeng, C.Q., Hyser, J.M., Utama, B., Crawford, S.E., Kim, K.J., Höök, M., Estes, M.K., (2008). Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for rotavirus enterotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (July (26)), 8811–8818.
- Settembre, E.C., Chen, J.Z., Dormitzer, P.R., Grigorieff, N., Harrison, S.C., (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 30(2): 408–16.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878–888.
- Sedger, L.M., McDermott, M.F. (2014). TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 453–472.
- Shahrabadi, M.S., Babiuk, L.A., Lee, P.W., (1987). Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology* 158, 103–111.

- Silvestri, L.S., Taraporewala Z.F., Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.*78 (July (14)),7763-7774.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 1985, 150(1), 76–85.
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Tinari, A., Bucci, B., Giammarioli, A.M., Rainaldi, G., et al. (1996). Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus. *J Med Virol.*50(4):325–34.
- Tang, S., Wang, X., Shen, Q., Yang, X., Yu, C., Cai, C., Cai, G., Meng, X., Zou, F. (2015). Mitochondrial Ca²⁺ uniporter is critical for store-operated Ca²⁺-entry-dependent breast cancer cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458 (1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.092>.
- Tanganurat, W., B. Quinquis, V. Leelawatcharamas, and A. Bolotin. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. *J. Basic Microbiol.* 49:377–385.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U.D. (2016). World Health Organization Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis* 2016;62:S96–105.
- Taylor, J.A., O'Brien, J.A., Yeager, M., (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endo-plasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.* 15 (September (17)),4469–4476.
- Tian, P., Hu, Y., Schilling, W.P., Lindsay, D.A., Eiden, J., Estes, M.K., 1994. The non-structural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J. Virol.*68 (January (1)), 251–257.
- Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q., Estes, M.K. (1996). The rotavirus nonstructural glyco-protein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J. Virol.* 70 (October(10)), 6973–698

- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised exvivo organ culture model. *Gut*. 2012;61:1007–15
- Van der Veek, P.P., Van den Berg, M., De Kroon, Y.E. (2005). Verspaget HW and Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:2510–6.
- Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., Reinheimer, J.(2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Front Microbiol*. 2011;2:1–6.
- Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., De Vries, J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174:1209–20.
- Wang, R., Zhu, Y., Lin, X., Ren, C., Zhao, J., Wang, F., Gao, X., Xiao, R., Zhao, L., Chen, H., Jin, M., Ma, W., Zhou, H., (2019). Influenza M2 protein regulates MAVS- mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production. *Autophagy* 15 (7), 1163–1181. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1580089>.
- Ward, L.A., Rosen, B.I., Yuan, L., Saif, L.J. (1996). Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J Gen Virol* 77(Pt 7):1431–41.
- World Health Organization. (2016). Immunization, Vaccines and Biologicals. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013, 215 000 [Internet]. Geneva: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavi/
- World Health Organization, (2018). Rotavirus.
- World Health Organization. (2021). <https://www.who.int/news/item/04-03-2021-rotavirus-vaccines-made-available-for-use-in-humanitarian-crises>
- Wu, S.C. (2020). Progress and Concept for COVID-19 Vaccine Development, *Biotechnol J* 15 (6) (2020) e2000147 .

- Xia, W., Shen, Y., Xie, H., Zheng, S., (2006). Involvement of endoplasmic reticulum in hepatitis B virus replication. *Virus Res.* 121 (2), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.020>.
- Yanga, Y., Peia, J., Qina, Z., Wei L. (2019). Efficacy of probiotics to prevent and/or alleviate childhood rotavirus infections. www.elsevier.com/locate/jff
- Yodmeeklin, A. , Khamrin, P., Chuchaona, W., Kumthip, K., Kongkaew, A., Vachirachewin, R ,..., Maneekarn, N. (2017). ‘Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus’. Elsevier.
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.C., Ngan, B.Y. (2006). Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 2006;55:1553–1560
- Zhang, M., Zeng, C.Q., Morris, A.P., Estes, M.K. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 74 (December(24)),11663–11670.
- Zhao, H., Kinnunen, P.K.J., (2003). Modulation of the activity of secretory phospholipase A2 by antimicrobial peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*47 (2003) 965–971.
- Zhaoa, H., Sooda, R., Jutilaa, A., Bosea, S., Fimlandb, G., Nissen-Meyerb, J., Kinnunena, P.K.J. (2006). Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of for a novel mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 1461–1474.
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., Huang, G., (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 781–789.

Ekler

Bu araştırma TÜBİTAK "1002-Hızlı Destek Programı" kapsamında 120S761 numarası ile desteklenmiştir.

Ek 1. 120S761 Numaralı Proje Karar Yazısı



Teşekkür

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca ilgisini ve desteklerini her daim hissettiren, fikir ve düşüncelerimi her zaman özgürce paylaşabildiğim, akademik duruşunu her zaman örnek alacağım çok değerli danışmanım Prof. Dr. Hüseyin TAŞLI'ya,

Tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen ve ihtiyacım olan tüm laboratuvar imkanlarını sunan çok kıymetli ikinci danışmanın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e,

Doktora sürecinde tüm iyi niyeti ve hoşgörüsüyle her konuda bana yardımcı olan Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN'a,

Ders dönemi boyunca akademik birikimlerini ve tecrübelerini paylaşan, farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan çok değerli hocalarım, Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU'ya, Prof. Dr. Mehmet EMİN LİMONCU'ya, Doç. Dr. Bayri ERAÇ'a, Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ'a,

Çalışmada kullanılan Caco-2 hücre hattını temin etmemizde yardımcı olan hocam Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'a,

Bu tez çalışmasını SBAG 120S761 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Desteğini ve yardımlarını esirgemeyen eşim Öğr. Gör. Serkan ŞEN'e ve gücüme güç katan sevgili oğlum Tuna'ya,

Çok teşekkür ederim.

İzmir, 26.09.2021

Merve ŞEN

