

Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferel Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine
Etkisinin Araştırılması

Majed S.M. Sabah

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Eylül 2020

Investigation of the Effects of Various Natural Components on Peripheral Blood
Mononuclear Cells (PBMC)

Majed S.M. Sabah

MASTER THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

September 2020

Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferel Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine
Etkisinin Araştırılması



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliğı Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı'nda
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Eylül 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

20.05.2019 tarih ve 80558721-050.99-E.59984 sayılı Karar (Onay no: 2019-33) ile araştırmaya etik kurul onayı alınmıştır 28/09/2020.

Majed S.M. Sabah

ÖZET

Periferal kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) yuvarlak çekirdek içeren kan hücreleridir. Bu hücrelerin çoğu lenfosit ve dendritik hücrelerdir. Diğer hücre dizilerine göre kolay ulaşılabilir ve hassas olmaları nedeniyle, terapötik testleri yapmak için PBMC'ler tercih edilir.

D vitamini birçok fonksiyondan sorumlu olan çok önemli bir vitamindir. Bağırsak ve kemik metabolizmasında, kalsiyum ve fosfat Emilimi sağlamanın yanında immünomodülatör etkileri de vardır. İnsanların %50'sinden fazlasında D vitamini eksikliği vardır, bu nedenle gıda endüstrisi ürünlere D vitamini takviyesi yapmaktadır. Tannik asit günlük öğünlerde bulunan polifenoldür. Tannik asitin proteinlerle kompleks oluşturması ve bazı sindirim problemlerine neden olması kendisinden istenmeyen bir molekül olarak bahsedilmesine yol açmıştır. Ancak hayvan modellerinde kanıtlandığı gibi antimikrobiyal ve antiviral etkiye sahiptir. Probiyotikler belirli dozlarda kullanıldığında insana fayda sağlayabilen mikroorganizmalardır. Probiyotikler yer ve besin için yarışarak insanları patojenlerden koruyabilir. Ayrıca bazı probiyotikler epitel hücrelerinin yüzeyinde mukus üretimini artırarak fiziksel destek sağlar, bu da hücreye patojenlerin bağlanmasını zorlaştırır. Monosodyum glutamat (MSG); Asya'nın doğusunda kullanılan yaygın bir tatlandırıcıdır. Ancak MSG'nin yüksek miktarda tüketilmesi hafif ağrı ve kızarıklığa (Çin restoranı sendromu), obezite ve nörolojik hastalıklara yol açmaktadır. Mitokondriyal solunum zincirindeki bir elektron taşıyıcı olan koenzim Q10 (CoQ10) çeşitli hücre tiplerini oksidatiflere karşı korur ve apoptozu inhibe eder.

Bu çalışmada yukarıda adı geçen maddelerin sağlıklı bir donörden alınan PBMC'lerin canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. PBMC'ler LPS ile uyarılmış ve 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle D vitamini, tannik asit, probiyotikler, MSG ve CoQ10 ile muamele edilmiştir. Tannik asidin hücreler üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği ve bunu CoQ10'nin takip ettiği; ancak D vitamini ve MSG'nin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur. Ayrıca probiyotikler hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. Aynı şekilde CoQ10 farklı bir zaman noktasında yüksek toksisite göstermiştir. Bu alanda daha önce az çalışma yapılmış ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: D vitamini, MSG, Probiyotikler, CoQ10, tannik asit ve PBMC

SUMMARY

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are the blood cells contain round nuclei. The majority of the cells are lymphocyte and dendritic cells. PBMCs have some features such as: easily accessible and more sensitive than other cell lines to some substances making them ideal to test some therapeutic assays.

Vitamin D is a crucial vitamin that is responsible for a lot of functions. Calcium and phosphate absorption in the intestine and bone metabolism and it has immunomodulatory effects. More than %50 of humans have vitamin D deficiency therefore; food industry section adds vitamin D to their products. Tannic acid is polyphenol exist in our daily meals. In general tannic acid is an undesirable molecule because it causes a lot of digestive problem including forming a complex with proteins. But its show anti-microbial and anti-viral effect as it proved in animal models.

Probiotics are the microorganism that can confer benefits to the human when it's used at a specific dose. Probiotics can protect humans from pathogens by competing for places and nutrients. Furthermore, some probiotics provide physical support by increase mucus production on the surface of epithelial cells making pathogens attachment to the cell harder. Monosodium glutamate (MSG) is a common flavoring used in the east of Asia. But consumption of MSG at high concentration leads to mild pain and redness (Chinese restaurant syndrome), obesity, and neurological diseases. Coenzyme Q10 (CoQ10) an electron transporter in the mitochondrial respiratory chain protects a variety of cell types against oxidative and it inhibits apoptosis.

In this study, it was aimed to investigate the effect of the above mentioned substances on the viability of PBMCs isolated from healthy donors. PBMCs were stimulated with LPS and treated with vitamin D, tannic acid, probiotics, MSG, and CoQ10 for 24, 48, 72 and 96 hr. Tannic acid has the highest cytotoxic effect on the cells, followed by CoQ10; however, it has been found that vitamin D and MSG have no effect on cell viability. Probiotics also reduced significantly cell viability. In the same way, Coenzyme Q10 show high toxicity at a different time point, the previous researches in this field are really few and more researches are needed.

Keywords: vitamin D, MSG, Probiotics, CoQ10, tannic acid and PBMCs.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi sırasında bilgi birikiminden yararlandığım, bana her zaman hoşgörülü olan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN'a;

Çalışmalarımda bilgi ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli Arş. Gör. Dr. İbrahim Uğur ÇALIŞ'a;

Sağladığı imkanlardan dolayı Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na;

Hayatımın her anında benden hiç bir zaman desteğini esirgemeyen, maddi manevi her şekilde yanımda olan, sevgili annem, babam, kız kardeşlerim, başta Mohammed olmak üzere erkek kardeşlerime tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	6
2.1.D Vitamini	6
2.2.Tanenler	10
2.3.Probiyotikler	12
2.4.Koenzim Q10	15
2.5.Monosodyum Glutamat	17
2.6.Lipopolisakkaritler (LPS)	19
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1.Materyal	21
3.1.1.Kullanılan gereçler.....	21
3.1.2.Kullanılan kimyasallar	21
3.1.3.Kan örneği.....	21
3.2.Yöntem.....	22
3.2.1.PBMC'lerin izolasyonu	22
3.2.2.Uygulanacak LPS konsantrasyonlarının belirlenmesi	23
3.2.3.Gruplar	24
3.2.4.Kültür ortamında hücre çoğalması.....	26
3.2.5.In vitro testler.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
<i>3.2.5.1.XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) testi</i>	26
<i>3.2.5.2.Tripan mavisi testi</i>	27
3.2.6.İstatistiksel analiz.....	27
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1.Bulgular	29
4.2.Tartışma	50
4.3.D3 vitamininin Etkisinin Tartışılması.....	50
4.4.Tanenlerin Etkisinin Tartışılması.....	54
4.5.Probiyotiklerin Etkisi Tartışılması.....	58
4.6.Monosodyum Glutamatın Etkisinin Tartışılması.....	62
4.7.Koenzim Q10'ın Etkisinin Tartışılması	65
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
EK AÇIKLAMALAR.....	84
Ek Açıklama – A : Etik Kurul Kararı	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>sayfa</u>
2.1.7-hidro kolesterolün D vitaminine dönüşümü.....	8
2.2. LPS ile aktiveleştirilen yollar	20
4.1. LPS 20 (Doz ana grup 1) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri.....	46
4.2. LPS 1250 (Doz ana grup 2) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri.....	47
4.3. LPS 20000 (Doz ana grup 3) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri.....	49
4.4.geniş LPS konsantrasyonu aralığının PBMC'lerin canlılığı üzerindeki etkisi	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Greenhouse-Geisser yöntemine göre grup içi değişime ait varyans çizelgesi	29
4.2 Gruplar arası değişime ait varyans çizelgesi	30
4.3 LPS 20 (Doz ana grup 1) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	31
4.4 LPS 1250 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	32
4.5 LPS 20000 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	34
4.6 LPS 20 (Doz ana grup 1) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	37
4.7 LPS 1250 (Doz ana grup 2) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	39
4.8 LPS 20000 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları.....	41
4.9 Doz ana grup faktörüne göre doz alt grup çoklu karşılaştırma sonuçları.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklamalar

Annexin V-FITC	Annxin V Fluresan isotiyosiyanat
ATP	Adenozin 3'-trifosfat
BA	Benzoik asit
Bax	Bcl-2-bağı X proteini
Bcl-2	B-Hücreci CLL/Lenfoma 2
BCR	B hücreci reseptörü
BMD	Kemik mineral yoğunluğu
BoMac	Sığır makrofaj hücre dizisi
C	C sabit bölge
CD	Crohn hastalığı
CD4	Başkalaşım kümesi 4
CHPG	2-Kloro-5-hidroksifenilglisin
Con A	Konkanavalin A
COX-2	Siklooksijenaz-2
CoQ ₁₀	Koenzim Q ₁₀
CPCCOEt	7-hidroksiiminisiklopropan[b]kromen-1a-karboksilik asit ester
CRP	C-reaktif protein
D	Dalton
DC	Dendritik hücreler
DHPG	Dihidroksifenil glikol
EGCG	Epigallokatekin galat
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent tahlili
ETC	Elektron taşıma sistemi
GMP	Glukomannan protein kompleksi
GOS	Galaktooligosakkaridler
HBeAg	Hepatit B e-antijen
HBV	Hepatit B virüsü
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HT22	Fare hipokampal nöronal hücre dizisi
IBD	İltihabi bağırsak hastalığı
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
IOM	Amerika Tıp Enstitüsü
IRF7	İnterferon regülasyon faktörü 7
IU	Uluslararası birim
IVA	İzovanilik asit
LAB	Laktik asit bakterisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LD50	Öldürücü doz
LPS	Lipopolisakkarid
LR	Laminin reseptörü
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MCF-7	İnsan meme adenokarsinomu
mGluR	Metabotropik glutamat reseptörü
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MPEP	2-Metil-6-(feniletinil)piridin
MSG	Monosodyum glutamat
MTS	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF- κ B	Nükleer faktör kappa b
ng	nanogram
NHF	Normal İnsan Fibroblastları
NO	Nitrik oksit

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
N1E-115	Fare nöroblastoma hücreleri
OSHA	Amerika İş güvenliği ve sağlığı idaresi (Occupational Safety and Health Administration)
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PCA	Protokatekuik asit
PCNA	Çoğalan hücre nükleer antijeni
PFM	Probiyotik fermente süt
PI	Propidyum iyodür
PMN	Polimorfonükleer lökositler
PRR	Kalıp tanıma reseptörleri
PTH	Paratiroid hormonu
PHA	Fitohemaglutinin
PWM	Pokeweed mitojen
P3G	Peonidin-3-glukozit
RA	Romatoid artrit
RANKL	Reseptör aktivatör nükleer kappa B
RBC	Kırmızı kan hücreleri
RCF	Rölatif santrifüj gücü
RIG-1	Retinoik asit bağlı gen
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEB	Stafilokokal Enterotoksin B
Stat1	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon aktivatörü
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TH1	Yardımcı T hücresi 1
TH2	Yardımcı T hücresi 2
THP-1	Akut monositik lösemi
TLR2	Toll benzeri reseptör

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
TNF	Tümör nekroz faktörü
TPA	12-0-tetradekanoilforbol-13-asetat
Treg	Regulatör T hücreler
UC	Ülseratif kolit
UV	Ultraviyole
V	V değişken bölgesi
VA	Vanilik asit
VDD	D vitamini eksikliği
VDR	D vitamini reseptörü
VDRE	D vitamini tepki elemanı
ZAP-70	Zeta zinciri bağlı protein
WBC	Beyaz kan hücreleri
WST-1	Suda çözünür tetrazolyum tuzları-1
4HBA	4-hidroksibenzoik asit
°C	Celsius
µg	Mikrogram

1 GİRİŞ

Erken bağışıklık sistemi araştırmaları; insanlar aşılanmaya başladığında hastalığın vücutta yayılmasını önlemeyi amaçlamıştır. Bu araştırmalarda, Koch tarafından hastalıkların esas nedeni olarak mikroorganizmaların tanımlanmasından, Edward Jenner tarafından çiçek hastalığına karşı yapılan aşılamanın başarılı olmasına kadar, mikroorganizmaların ölüme neden olduğuna veya bağışıklık hücrelerinin mikroorganizmaları yok edebileceği dair kanıtlar yoktu (Janeway vd., 2001). Bağışıklık sistemi, patojenleri ve yabancı parçacıkları yok eden hayati işleve sahip olması nedeniyle, insan vücudundaki en önemli sistemlerden biridir ve etkinliğinde herhangi bir aksaklığın oluşması ‘fırsatçı hastalıklar’ adı verilen spesifik hastalıklara yol açabilir.

Bağışıklık sistemi insan vücudundaki diğer sistemlerde olduğu gibi hücreler, dokular ve organlardan oluşur. Organlar arasında diyaframın altında sol üst karın boşluğunda bulunan dalağın yapısı, lenf düğümüne benzer ve kan rezervuarı olarak çalışabilir, böylece oksijene ihtiyaç duyulduğunda organlara kan sağlayabilir. Başka bir işlevi ise, özellikle beyaz pulpada meydana gelen lenfositlerin çoğalması ve farklılaşmasıdır. Dalak pulpası fonksiyonel ve morfolojik olarak farklı iki bölüme ayrılır: **a)** beyaz pulpa (çoğunlukla lenfosit içerir) **b)** kırmızı pulpa (RBC ve lenfosit içerir). Her iki pulpa da kanın saflaştırılmasına yardımcı olur. Timus, areolar doku ile birbirine bağlı iki lobdan oluşmaktadır ve onları lopçuklara ayıran lifli kapsül ile çevrelenir. Timustaki mikro ortam, korteks ve medulla (Rezzani vd., 2014) olarak bilinen iki kısma sahip olan stroma (Taub vd., 2005) adı verilen farklı hücrelerden oluşur. Timus, göğüs kemiğinin arkasındaki soluk borusu yanında bulunur. Bu salgı bezinin büyüklüğü yaşlanarak azalmaktadır, bu nedenle genç insanlarda yaşlı insanlara göre daha büyüktür. Medulla, T hücrelerinin olgunlaşmasında önemli bir kurala sahip olduğu düşünülen timozini salgılar. Kemik iliği, kalça kemiği gibi uzun düz kemiklerin içi boş bölümünde bulunan süngerimsi dokudur. Çok fazla yağ içeren sarı kemik iliği ve kan hücrelerinin üretildiği kırmızı kemik iliği olmak üzere iki tip kemik iliği vardır. Lenf düğümleri, çok sayıda lenfosit üretmek ve depolamak için lenf damarlarına bağlı küçük boyutlu (1-25 mm) özel lenfoid organlardır. Lenf dolgulu sinüsler ve kapsülle

çevrili çoklu lenfoid lopçuklardan oluşurlar. Tek başlarına veya ağızda bademcikler ve bağırsak duvarındaki peyer plakları gibi gruplar halinde bulunurlar.

Lenfoid doku, cilt, sindirim ve solunum yollarına dağılmış bir bağışıklık hücreleri topluluğudur. Bağırsak vücuttaki en büyük lenfoid doku kitlesine sahip olduğu için sindirim sistemi bağışıklık sisteminde önemli bir parça kabul edilir. Lenfoid doku kadın üreme yolunda mukoza ile ilişkilidir.

Cilde giren mikroorganizmalar çoğalmaya ve vücuda yayılmaya çalışır; ancak bu mikroorganizmalarla bağışıklık sistemindeki ana savaşçılar olan fagositler ve lenfositler tarafından enflamasyon ile mücadele edilir (Exploring Immunology: Concepts ve Evidence, 2013).

Tüm bağışıklık hücreleri kemik iliğindeki kök hücrelerden üretilir, daha sonra kan veya lenf içinde dolaşır, bağ dokusuna geçer veya bağışıklık organlarında toplanır. İmmün sistem hücreleri çeşitli gruplara ayrılır. Mast hücreleri bağ dokusunda ve mukozada bulunur, mikroorganizmaların varlığını tespit edebilir. Bu hücreler uyarıldığında, sitokin ve histamin içeren granülleri sayesinde enflamasyon regülasyonunda önemli bir rol oynar. Histamin enflamasyona ek olarak allerji ve anafilaksi vakaları ile de ilişkilidir. Makrofaj iki fagosit türünden biridir. Spesifik savunma sistemindeki hücrelerin üretimini uyaran interferon ve interlökin salgıladıkları için enflamasyonda rol oynarlar. Makrofajlar aynı zamanda temizleyici görevi görür, vücudu ölü hücrelerden ve diğer döküntülerden kurtarır. Kan dolaşımında dolaşan monositlerden oluşurlar. Monositler kan akışından ayrılırken makrofaja farklılaşır, bu nedenle makrofajların kanda olmayıp dokularda ve organlarda bulunması dikkat çekicidir. Plazmositler ve efektör B hücreleri olarak da bilinen plazma hücreleri, antijene bağlanan antikorlar (immünoglobulin) üretir. Glikoprotein veya lipoprotein vb gibi bir madde, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından yabancı olarak tanınabilir, bu durum bağışıklık yanıtı uyarır. Antijen-antikor kompleksi oluştuğunda, patojeni yok ederek bir dizi eylemi aktifleştirir. Lökositler (beyaz kan hücreleri) iki gruba ayrılır: a) ilk grup bazofiller, eozinofiller ve nötrofiller; b) ikinci grup ise lenfositler ve monositler gibi granülsüz lökositlerdir. Bazofiller nadir lökositlerdir, bazik leke (ismi nedeniyle) nedeniyle sitoplazmada koyu mavi lekeli granüllere sahip iki loblu bir çekirdeğe

sahiptir. Mast hücreleri ile bazı benzerlikleri vardır, öyle ki heparin ve histamin üretme kabiliyetleri nedeniyle güçlü enflamasyon uyarıcılarıdır. Eozinofiller, iki loblu çekirdekler gibi bazofiller ile aynı karaktere sahiptir ve seyrekler; ancak granülleri boya nedeniyle turuncu renge sahiptir (eozin). Parazitik enfeksiyon ve alerjik cevap ile ilişkili enflamasyon bölgelerine taşınırlar. Eozinofiller ve mast hücreleri, patojenlerin epitel hücrelerin bağlanmasını önlemek için mukus üretimi gibi ortak fonksiyonlara sahiptirler. Nötrofiller, insan kanında en fazla bulunan ve toplam beyaz kan hücreleri (WBC)'lerinin yaklaşık %70'ini oluşturan hücrelerdir. Nötrofiller, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi çeşitli enflamasyona neden olan bakterilere karşı aktiftir. Kemik iliğinde üretilir ve olgunlaştırılır, patojeni yok ettikten sonra enflamasyon bölgelerine doğru hareket eder ve kan dolaşımına salınırlar. Bu yüzden uzun ömürlü değildir (Human Anatomy ve Physiology, 2014).

Monositler kandaki başlıca fagositlerdir. Kemik iliğinde üretilir ve makrofajlara farklılaştıkları hedef dokuya ulaştıklarında kana salınırlar. 1-2 günlük kısa bir ömürleri vardır. Ayrıca insanların kan ve dendritik hücrelerinde, cilt, akciğer, mide, burun gibi periferik epitel dokusunda bulunurlar. Doğal ve adapte olmuş bağışıklık cevap arasında bağlantı olarak çalışırlar; çünkü PRR (patern tanıma reseptörleri)'ler gibi farklı bir molekül tipini algılayabilirler. Bazı bakteri ve virüsleri de tanıyabilirler.

Enfeksiyonun tipine ve sitokin gibi enflamasyon bölgesinde salgılanan madde türü gibi bazı uyarıcılara bağlı olarak dentritik hücreler (DC) özelliklerini değiştirir. Periferik dokudan düğümler gibi ikincil lenfoid dokuya göç ederler, bu göçün sonucu olarak periferik dokuda enfeksiyon sırasında oluşan antijen, T hücreleri tarafından tanınabilir. Bu organlarda DC'ler antijene özgü T lenfositler özellikle CD4 T hücreleri ile etkileşime girebilir. Saf T hücrelerinin tam aktivasyonu için gereken özel moleküler özellik gösterdikleri için, birçok tipte adaptif bağışıklık sistemini başlatabilirler. Plazmasitoid DC'ler bu hücrelerin farklı tipleridir, çok sayıda endoplazmik retikulum içerirler ve bu açıdan plazma hücrelerine benzerlik gösterirler. Tip 1 interferon (IFN) adı verilen spesifik sitokinleri salgırlar ve antiviral yanıtta rolleri vardır. Ayrıca insanlarda, tamamen farklı olan ve yukarıda belirtilen DC tipleri ile karıştırılmaması gereken foliküller DC'ler bulunur, bunlar T hücresi tepkisinde yer alan önceki tiplerin karşısında B hücresi tepkisinde rol oynarlar (Human Anatomy ve Physiology, 2014).

Bağışıklık sistemi, her yabancı maddeyi savaşmak ve yok etmek için tanınmalıdır; yabancı maddeler bakteri ve virüs gibi farklı kaynaklardan gelen antijenler olarak adlandırılır. B hücrelerinin antijen tanıma molekülleri, immunoglobulinler (Ig) adlandırılır. Bu proteinler çok çeşitli antijen B hücreleri tarafından üretilir, böylece her antikor farklı antijene bağlanır. Membrana bağlı immünoglobulinler antijen için reseptörler olarak işlev görür ve bu B hücrelerinin (plazma hücreleri) ana Sfonksiyonudur. Antikorum iki ayrı işlevi vardır: İlk işlev V bölgesi de denen değişken bölge tarafından gerçekleştirilen antijene spesifik olarak bağlanmaktır. Çünkü bu bölge antikor molekülleri arasında farklı bir amino asit dizisine sahiptir. İkinci fonksiyon, kısaca C bölgesi olarak adlandırılan sabit bir bölge tarafından gerçekleştirilen bağışıklık hücrelerinin etki ettikleri hücreleri çekmektir. C bölgesi fonksiyonu, antijenin V bölgesine bağlanmasını tanıyan bir reseptördür ve sonunda antikor üretimini sağlayan bir sinyal iletir. Ayrıca T hücrelerinde sadece T hücrelerinin aktivasyonu için sinyaller indükleyen bir antijen tanıma molekülü bulunur. Bu T-hücresi reseptörlerinin her ikisi de V ve C bölgelerine sahip olduğundan, hem yapısal olarak hem de spesifik hale getiren genetik mekanizmalara sahip olduklarından, genetik olarak immünoglobulinler ile ilişkilidir. Ancak T hücreleri farklıdır; çünkü antijeni doğrudan tanımaz ve bağlamazlar, bunun yerine diğer hücrenin yüzeyindeki büyük histokompabilite kompleksi (MHC) moleküllerine bağlı bir peptit antijeninin bir kısmını tanırlar. MHC molekülleri, MHC olarak bilinen geniş bir gen kümesi tarafından üretilen glikoproteindir. En dış yüzeyleri boyunca uzanan yarıklara sahip olmaları nedeni ile önemli bir karaktere sahiptirler, böylece çeşitli peptitleri bağlanabilirler. Yukarıda belirtildiği gibi T hücresi reseptörü, MHC moleküllerine bağlı bir antijenin özelliklerini tanıyabilir. Bu, T hücresi tarafından MHC sınırlaması olarak bilinen bu tanıma yeni bir özellik ekler, çünkü herhangi bir T hücresi reseptörü bir antijene özgü değildir; ancak antijenin bir MHC molekülü ile kombinasyonu içindir.

PBMC, lenfositler (T ve B hücreleri), monositler, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler gibi yuvarlak çekirdeğe sahip olan bağışıklık hücreleridir. Bazofiller, eozinofiller ve nötrofiller gibi granüler bağışıklık hücreleri PBMC'lerin bir parçası olarak kabul edilmemektedir. Belirli kimyasallar ve santrifüj kullanılarak PBMC'ler kolaylıkla izole edilebilir. Kolay izole edilebilir olması avantajlarından biri olarak kabul

edilir; ancak bağırsak mukozasındaki bağışıklık hücrelerine farklı bir fenotipleri vardır. (Verhoeckx vd., 2015)

Bu çalışmada maddelerin sağlıklı bir donörden alınan PBMC'lere uygunduktan sonra canlılık üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.



2 LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 D Vitamini

D vitamini eksikliği dünya nüfusunun yaklaşık %50'sini etkiler (Holick, 2007). Dünya çapında yaklaşık 1 milyar insanda D vitamini eksikliği görülür (Holick, 2007) (Lips vd., 2006). Gelişmekte olan araştırmalar, D vitaminin kanser, kalp hastalığı ve tip 2 diyabet gibi bazı hastalıklara karşı olası rolünü desteklemektedir, birçok bilim insanı, insanların D3 vitamini takviyesini en az 1000 IU'ya yükseltmelerini önermektedir. D vitaminin iki formu vardır. İlk form güneşe maruz kalan mantarda bulunan D2'dir. Bu D vitamini formu insanlar tarafından sentezlenemez; bunun yerine insan güneşte kaldığında D₃ vitamini sentezleyebilir. Doğal olarak sentezlenen D vitamini inaktif ve aktif D_{1,25}(OH)₂D formunu oluşturmak için karaciğerde ve böbrekte daha fazla enzimatik modifikasyona ihtiyaç duyar (Lips vd., 2006). D vitamini, kalsiyum ve fosfor emilimini sırasıyla %30-40 ve %80 artırmada önemli bir role sahiptir (Lips vd., 2006) (Lappe vd., 2008). D vitamininin aktif formu 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)₂D)'dir. D_{1,25}(OH)₂D hücrel proliferasyonun inhibisyonu, anjiyogenezin inhibisyonu, insülin üretiminin uyarılması ve makrofaj katelisin üretiminin uyarılması gibi birçok biyolojik etkiye sahiptir (Stolzenberg-Solomon vd., 2006, Chlebowski vd., 2008, Stolzenberg-Solomon vd., 2009).

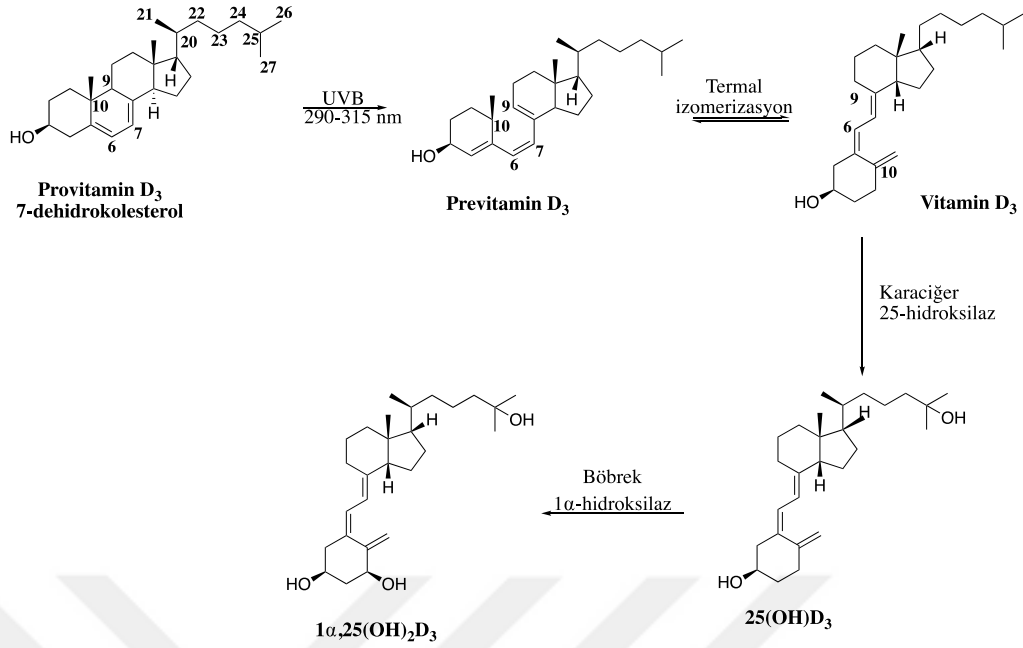
Amerika Tıp Enstitüsüne göre (Institute of Medicine, IOM), 21-29 ng/ml 25(OH)D, D vitamini eksikliği olarak tanımlanmıştır (Malabanan vd., 1998, Heaney vd., 2003), Heaney, 2004, Holick, 2007, Hansen vd., 2008, Bischoff-Ferrari vd., 2008). Çocuklar ve yetişkinler için D vitamini için ana kaynak güneş ışığıdır (Brot vd., 2001, Holick, 2007, Moan vd., 2008, Maeda vd., 2007), güneş koruyucu kullanmak cildin D vitamini sentezini %95'inden fazla azaltır (Matsuoka vd., 1987).

D vitamini eksikliği (VDD) kalsiyum, fosfor ve kemik metabolizmasında bazı anormalliklerle sonuçlanır (Heaney, 2004, Lips vd., 2006, Holick, 2007, Holick vd., 2014). VDD kalsiyum ve fosfor emiliminde azalmaya neden olur ve bu da paratiroid hormon (PTH) seviyelerinde artışa neden olur. Bu yüksek PTH seviyelerinin bir sonucu olarak, osteoklast aktivitesi lokal kemik zayıflığı oluşturarak artar ve kemik materyali

yoğunluğunda (BMD) azalmaya neden olur, bu da osteopeni ve osteoporoz ile sonuçlanır. İskeletteki yetersiz miktarda mineral, özellikle çocuklarda raşitizm olarak bilinen iskelet deformasyonlarına yol açar (Holick, 2006a),

Çeşitli faktörler D₃ vitamini üretimini olumsuz yönde etkileyebilir. Bunlar, artan cilt pigmentasyonu, yaşlanma ve güneş koruyucuların topikal uygulanmasıdır (T.L vd., 1977, Matsuoka vd., 1987, Holick, 2007). Enlem değişikliği, mevsim değişikliği, günün saati gibi coğrafi faktörler, güneşin zirve açısını değiştirerek D₃ vitamin üretimini önemli ölçüde etkilemektedir (Holick, 2007, Holick vd., 2018).

D vitamini steroid hormonu görevi gören yağda çözünen bir vitamindir. UV'nin ciltte 7-hidroksilesterolün D vitaminine dönüşümünü indüklediği bilinmektedir (Jäpelt vd., 2013) (Şekil 2.1). D vitamini aktifleşmek için iki hidroksilasyona uğrar. İlki karaciğerde ikincisi ise böbrekte gerçekleşmektedir. Vitaminin aktif formuna kalsitron (1,25-dihidroksivitamin D₃) denir ve yarılanma ömrü yaklaşık 15 saattir; kalsidoil (25-hidroksivitamin D₃) yaklaşık 15 günlük yarılanma ömrüne sahiptir (Melissa K., 1998). 1 α -hidroksilaz, böbrekte ve diğer dokularda bulunan ve 25(OH) D formundan 1,25(OH)₂D formuna dönüştürülmesinden sorumlu olan bir enzimdir. Bu vitaminin aktif formu kanda 25(OH)D'den daha düşük konsantrasyonda bulunur; ancak D vitamini reseptörüne (VDR) daha yüksek bir afinitesi vardır (Dusso vd., 2005).



Şekil 2.1.7-hidroolesterolün D vitaminine dönüşümü
(Şekil 2.1 ChemDraw Professional programı ile çizilmiştir.)

Yapılan en erken çalışmalardan biri; 1,25(OH)₂D tedavisinin, keratinosit, nötrofiller ve makrofajlar gibi çeşitli hücre dizilerinde ve birincil kültürde katelisinin mRNA'yı up-regüle ettiğini göstermiştir (Wang vd., 2014). Katelisinin, insandaki üç ana antimikrobiyal peptit ailesinden biridir. Nötrofiller, makrofajları ve deri (Stern, 2005), solunum yolu (Bals vd., 1998) ve sürekli olarak patojenlere maruz kalan gastrointestinal sistem (Gallo vd., 1997) gibi periferel epitel hücreleri içeren immün hücreleri katelisinin üretir.

Katelisinin virüs ve mantarlara ek olarak gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri karşı geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Ramanathan vd., 2002). Ayrıca, antimikrobiyal peptit katelisinin ve β-defensini kodlayan genlerin kolaylaştırıcısı üzerinde D vitamini yanıt elementinin (VDRE) varlığı bildirilmiştir (Wang vd., 2014). β-defensin başka bir antimikrobiyal protein ailesidir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada; TLR2/1L insan makrofajı ile Toll benzeri reseptörün (TLR) uyarılmasının VDR ve D vitaminin aktif forma dönüştürülmesinden sorumlu enzim olan 1α-hidroksilazın up-regülasyona yol açtığı gösterilmiştir (Liu vd., 2006). Aynı zamanda, insan makrofaj kültürünün TLR2/1L uyarımı varlığında 1,25(OH)₂D₃'ün katelisinin mRNA ekspresyonunun up-regüle edildiği gözlemlenmiştir.

Makrofaj kültüründe *Mycobacterium tuberculosis*'in ölümüne yol açan bir katelisin konsantrasyonu fark edilmiştir (Liu vd., 2006). Otoimmünitenin doğal seyri belirsiz olsa da; teori genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin klinik hastalığın gelişiminde rol oynadığı yönündedir (Cannell vd., 2008). D vitaminin T hücreleri, B hücreleri ve dendritik hücreler gibi çeşitli hücre tipleri üzerinde immünomodülatör bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Deluca vd., 2001, Arnson vd., 2007). Daha önce bahsedilen tüm hücre tipleri VDR ifade eder ve kendi aktif D vitaminini üretebilecek kapasiteye sahip enzimler üretir (Veldman vd., 2000, Etten vd., 2008, Correale, 2009, Norman, 2014). D vitamini T hücresi reseptörünün neden olduğu T hücresi proliferasyonunu baskılar ve sitokin üretim profilini değiştirir (Veldman vd., 2000). Toplam kayma bir yardımcı T hücresi 1 (TH1) fenotipinden bir TH2 tepkisine doğrudur (Mattner vd., 2000). T hücresi tarafından interlekin-2 (IL-2) ve INF- α gibi sitokin üretimi, D vitaminine maruz bırakılarak azaltılırken, IL-5 ve IL-10, TH2 tepkisine doğru bir kayma ile istikrarlı bir şekilde artar (Overbergh vd., 2000, Boonstra vd., 2014).

D vitamininin en derin etkisi dendritik hücreler (DC) üzerinedir (Griffin vd., 2001, Steinmeyer vd., 2009). D vitamini bu hücreler üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Monositlerin olgunlaşmamış DC'lere farklılaşmasını, DC'lerin olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını etkileyebilir (Griffin vd., 2001, Canning vd., 2001, Halteren, vd., 2004, Piemonti vd., 2014 and Gauzzi vd., 2015). Ayrıca D vitamini IL-12'yi azaltarak düzenler ve DC'ler tarafından IL-10 üretimini artırır; böylece TH2 fenotipine geçişi uyarır (Penna vd., 2016).

D vitamini IgG üretimini azaltır, ayrıca periferik tek çekirdekli hücre proliferasyonu üzerinde olumsuz bir etkisi vardır (Lemire vd., 1984). Ayrıca KH 1060 ve EB 1089 gibi D vitamini analoglarının PMBC'lerin proliferasyonu üzerinde inhibitör etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle bazı hastalıkların tıbbi tedavisinde önemli rol oynayabilir (Stio vd., 2001). KH1060, anti- tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile sinerjik olarak iltihabi bağırsak hastalığında (IBN) TNF- α seviyesini azaltır. VDR proteini Crohn hastalığı (CD) hastalarında önemli ölçüde azalırken, aynı protein seviyesi

KH1060 veya anti-TNF- α veya bunların ülseratif kolit (UC) hastalarındaki kombinasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. CD hastalarında anti-TNF- α veya KH 1060 ile kombinasyon kullanıldığında Bcl-2 seviyelerinde hafif bir azalma görülürken Bax protein seviyelerinde hafif bir artış olmaktadır. Yapılan bir çalışmada UC hastalarında Bcl-2 ve Bax protein düzeylerinde artış olduğu görülmüştür (Stio vd., 2006). D vitamininin ve analogu EB1089'un hem sağlıklı hem de IBD hastalarında PMBC proliferasyonunu inhibe ettiği ve sadece sağlıklı ve CD hastalarında apoptozu indükleyebildikleri bulunmuştur (Maria Martinesi, 2008).

2.2 Tanenler

Bate-Smith ve Swain bitkisel tanen moleküllerini 500-3000 Dalton (D) arasında bir moleküler ağırlığa sahip, suda çözünür fenolik bileşikler olarak tanımlamışlardır. Bu bileşikler çok sayıda hidroksil grubuna sahip olduğu için diğer proteinler ve makromoleküllerle çok fazla etkileşime girebilirler (Iax, 1994). Tanenler; proteinler, nişasta ve sindirim enzimi ile kompleksler oluşturdıkları için besin yönünden 'istenmeyen' olarak kabul edilir. Tanenlerin büyüme oranı, yem verimliliği ve protein sindirilebilirliğindeki azalmadan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Hulse, 1979, Deshpande vd., 1984, Taylor vd., 2009). Ayrıca başka etkileri de vardır. Gastrointestinal sistemin mukozasına zarar verirler; bazı katyon atılımında, proteinlerin ve aminoasitlerin artan atılımında bazı değişikliklere sebebiyet verir (Singleton, 1969). Tanenler ve tannik asit, iş sağlığı güvenliği ve yönetimi (Occupational Safety and Health Administration, ABD) (OSHA) tarafından kategori 1 geçici kanserojen olarak kabul edilmişlerdir (Safety ve health Administration, 1977).

Önceki çalışmalarda da tanenler hem mutajen hem de karsinojen kabul edilmiştir. Bazı bölgelerde tannik asit, bir sıçana hepatokarsinojenik olduğu için insan karaciğer kanserinin etiolojisi olarak kabul edilir (Kirby, 1960). Sebze ve meyve tüketen birey ile kanser gelişme riski arasında ters bir ilişki vardır. Yeşil çayın kanser oluşumu üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Yeşil çay polifenol fraksiyonunun uygulanmasının, fare derisinde 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ile indüklenen tümör gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur. Yeşil çayın oral uygulaması fare derisinde UV ışığa bağlı tümör oluşumu gelişimini baskılar (Conney vd., 1992). Ayrıca 10-20g/l Merulius

lacrymans ve *Penicillium* türlerinin büyümesini engellediğinden tanenlerin antimikrobiyal etkileri olduğu bulunmuştur (Ehmcke, 2014).

Tanenler ayrıca antioksidan ve radikal tutucu aktiviteye sahiptir. Antioksidan ve radikal tutucu aktivite dahil tanen aktivitesinin büyük ölçüde yapıya bağlı olduğu görülmüştür. Örneğin antiradikal etkideki artışın polimerizasyon derecesindeki artışla ilişkili olduğu görülmüştür (Sieniawska, 2015). Polifenol sınıfı olan proantosiyanidin, *in vitro* lipid peroksidasyonunu ve lipooksijenazları inhibe eder ve yapılan birkaç çalışmada hidroksil, süperoksit ve peroksil radikallerini çıkarma yetenekleri kanıtlanmıştır (Georgiev vd., 2014). Bu bileşiklerin bazıları, örneğin prosiyanidin B1 ve prosiyanidin B3, etkili antioksidanlar olarak kabul edilir; askorbik asitten (C vitamini) veya α -tokoferolden daha güçlü antioksidanlardır (Iglesias vd., 2012).

Tanenlerin antiviral aktivitesi tanenlerin yapısıyla sınırlı görünmektedir. Tanenlerin *Herpes simplex* ve HIV virüsleri ve bunların sitopatik etkilerinin emilimini engellediği düşünülmektedir (Lipińska vd., 2014, Ekambaram vd., 2016). Bu mekanizmanın, tanenlerin virüsün zarf bileşenine bağlanma kapasitesi ile ilgili olduğu görülmüştür. Hidrolize edilebilir tanenlerden biri olan ellagaik asit, HBV ile enfekte olmuş hücrelerde Hepatit B e-antijen (HBeAg) salgılanmasını inhibe etmesi nedeniyle hepatit B virüsüne karşı antiviral aktiviteye sahiptir (Marín vd., 2015). Son zamanlarda araştırmacılar bir dizi polifenol reseptörü üzerinde çalışmaktadırlar. Bitkilerde bulunan yaygın polifenol bileşiklerinden biri olan epigallocatechin gallate (EGCG) üç farklı reseptörü hedefler. Bunlar; laminin reseptörü (67LR), zeta zincirleriyle ilişkili protein (ZAP-70) ve retinoik aside bağlı gen (RIG-1)'dir (Magrone vd., 2014, Zhu vd., 2018). Laminin reseptörü (67LR), nötrofiller, monositler/makrofaj (Achibana, 2011),(Sprangers vd., 2016), mast hücreleri ve T hücreleri (Yang vd., 2010, Ding vd., 2018) ile ifade edilir ve bu hücreler tarafından enflamasyon ve adezyon gibi bazı işlemleri düzenler. EGCG ayrıca lösemik hücrelerde CD3'ün aracılık ettiği T hücresi ile indüklenen yolu inhibe ederek ZAP-70'in aktivitesini inhibe edebilir (Bode vd., 2010).

Polifenollerin bağırsak hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Bir grup sağlıklı periferik kan mononüklear hücreleri (PBMC)'ler NO (nitrik oksit) üretimini izlemek için bir model olarak kullanılmış, kırmızı şarabın insan

monositleri tarafından NO üretimini indükleyebildiği ve salınan NO'nın vazodilatör etkisinin ateroskleroza önlemeye yardımcı olduğu bulunmuştur (Loke vd., 2008). Bazı çalışmalarda polifenollerin farklılaşması ve olgunlaşmayı (Jing vd., 2014) etkilediği bulunmuştur; fakat mekanizma tamamen aydınlatılamamıştır. TLR bağlantısı, mutajenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), Akt ve nükleer faktör- (NF- κ B) yollarının aktivasyonunu indükleyerek DC aktivasyonuna (Jing vd., 2014, Lin vd., 2017) yol açar. Ayrıca dihidroksil fenolik asit gibi bazı mikrobiyal metabolitler, sağlıklı PBMC'lerden üretilen TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın spesifik olarak in vitro olarak antiinflamatuvar özelliklerini inhibe eder (Khan vd., 2009).

Polialkolün büyük bir grubu sitokin üretimi ve metabolik aktivite üzerinde etkili maddeler olarak kabul edilen flavonoidlerdir. Apigenin, krisin ve luteolin PBMC'lere uygulanmış ve bu flavonoidlerin metabolik aktiviteyi ve sitokin üretimini (TNF- α , IL-1b ve IL-6) inhibe ettiği görülmüştür; ancak kersetin ve naringenin uygulanması durumunda metabolik aktivite veya sitokin üretimi gözlenmiştir (Hougee vd., 2005). Başka bir çalışmada flavonoidlerin, metabolitlerinin ve flavonoid-metabolit kombinasyonlarının akut monositik lösemi (THP-1) monositleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 100 μ M'de hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olan flavonoidlerin, kersetin ve naringenin olduğu bulunmuştur. Geri kalan flavonoidler, metabolitler ve kombinasyonun THP-1 monositleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca iki flavonoid, beş metabolit ve dört kombinasyonu THF- α protein seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. THF- α mRNA ekspresyonu RT-qPCR ile ölçülmüştür. Bu bileşiklerin hiçbiri THF- α mRNA ekspresyonunu inhibe etmemiştir (Yalamanchili vd., 2015). Polifenollerden biri, PBMC'ler gibi çeşitli hücre tiplerinde tannik asidin bileşeni olan ellagik asittir. Fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılan PBMC'lerin ve uyarılmayan PBMC'lerin, hücreler üzerinde tehlikeli bir etki göstermeden ellagik aside direnç gösterdikleri bulunmuştur (Juranić vd., 2001).

2.3 Probiyotikler

Bilindiği üzere, bağışıklık yanıtı yabancı maddelere maruz kaldıktan sonra başlar. Bununla beraber, dengesiz bağışıklık yanıtı enflamasyonlara, doku hasarlarına ve hastalıklara yol açar. Bağırsak florasının bağışıklık sistemi tarafından algılanması,

bağırsak homeostazının korunmasında önemli bir faktördür. Bu nedenle bağırsak florasının manipülasyonunun sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesi gibi alternatif bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Probiyotik terimi yiyeceklerde tüketildiklerinde konağa yarar sağlayan bakterileri ifade etmektedir. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak kullanılan probiyotik bakterilerdir (Yan vd., 2014).

Probiyotiklerin bağışıklık sistemini desteklemek için çeşitli mekanizmaları vardır. Patojenik bakteri etkisini bloke eden ve bağırsak epiteline toksinler ve patojenlerle rekabet eden bazı bakteriyosidal maddeler üretebilirler. Ek olarak, bağırsak epitel hücrelerinden koruyucu tepkiyi uyarır, bariyer fonksiyonunu artırır ve bağırsak epitel hücre yaşamını destekler. Probiyotiklerin faydalı etkisinin altında yatan en önemli mekanizmalardan biri bağışıklık sisteminin modülasyonudur. Probiyotikler doğuştan gelen bağışıklığı artırır ve TLR ayarlı sinyal yolu ile patojenle indüklenmiş enflamasyonu düzenler (Vanderpool vd., 2008). Probiyotikler dendritik hücrelerin, makrofajların ve T ve B lenfositlerinin işlevlerini modüle ederek bağışıklık sistemini düzenler (Vanderpool vd., 2008, Yan vd., 2011). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada probiyotiklerin bağışıklık sistemini nasıl aktive ettiği gösterilmiştir. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* ve *Streptococcus thermophilus*'tan oluşan bir karışım yüksek seviyelerde IL-10, TGF- γ , COX-2 ve indoleamin 2,3-dioksijenaz üreten düzenleyici DC'leri artırmıştır, bu da CD4 + CD25 popülasyonundan CD4 + Foxp3 + düzenleyici T hücresi (Tregs) üretimini indüklediğini ve doğal olarak oluşan CD4 + CD25 + treglerin baskılayıcı aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu karışım, apoptozu ve T hücrelerini uyarmadan T yardımcı (Th) 1, Th2 ve Th17 sitokinlerini uyarmıştır ve B hücresi hipo cevaplanabilirliği bu karışım tarafından uyarılmıştır. In vivo olarak bu bakteri karışımının, inflamasyon yerinde CD4 + Foxp3 + Treg'lerin zenginleşmesiyle ilişkili bağırsak iltihabını baskıladığı görülmüştür. Bu, probiyotikler iltihaplı hastalıklar için alternatif bir tıbbi yaklaşımı temsil etmektedir (Kwon vd., 2009)

Bağırsak epitelyumu konakçı bağ dokusunu dış ortamdan tek epitel hücreleri tabakası, hücreler arası sıkı bağlantılar ve mukus gibi fiziksel bariyerler ile ayrılır (Gourbeyre vd., 2010). Fiziksel bariyerlere ek olarak, goblet hücreleri tarafından glikozile edilmiş müsin bakımından zengin katmanın salgılanması ve eklenmesi ile

oluşan glikokaliks gibi biyokimyasal adaptasyon vardır. Fiziksel bariyerler ve biyokimyasal adaptasyon birlikte epitelin apikal yüzeyinde viskoz tabakasını güçlendiren goblet hücresi sayısını artırarak bağırsak bariyerlerini güçlendirme yeteneğine sahiptir (Schiavi vd., 2011). Yapılan başka bir çalışma, yüksek dozda *L. rhamnosus* Lcr35'in, gen ekspresyonunda önemli bir değişikliğe neden olduğunu ve TNF, IL-1 β , IL-12p70, IL-12p40 ve IL-23 gibi pro-Th16 sitokinlerinin üretimini artırdığını göstermiştir. Ayrıca *L. rhamnosus* Lcr35, dendritik hücre zarının fenotipinin olgunlaşması üzerinde, CD86, CD83, HLA-DR ve TLR4 üretiminde artış ve DC-SIGN, MR, CD14 üretiminin azalması ile bir etki göstermiştir. Sonuç olarak, *L. rhamnosus*, insan dendritik hücrelerinin doza bağlı bir immünomodülasyonunu yükseltir; bu nedenle bu hücrelerin yarı olgunlaşmasında önemli bir role ve güçlü bir proinflamatuvar aktiviteye sahiptir (Evrard vd., 2011).

Lactobacillus johnsonii N6.2, insan Caco-2 hücresi tek katmanında bağırsak epitel immünolojik fonksiyonunu düzenleyebilir. TLR7 ve TLR9 seviyelerini ve sonrasında IFN Tip 1 ve IFN regülatörlerinin Stat1 ve IRF7 seviyelerini arttırdığı görülmüştür. Bu bakterinin bağırsak epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde TLR9'u epitel immünolojik değişikliğin daha yüksek bir hale çıkması için uyardığı görülmüştür (Kingma vd., 2011).

Probiyotiklerin bağırsak mikroorganizmalarının bileşiminde spesifik yararlı bakterilere doğru kayma gibi iyi bir değişiklik indüklediği de fark edilmiştir. Örnek olarak, Th17 polarizasyonunu azaltan ve bağırsaktaki antiinflamatuvar Treg/Tip1 düzenleyici T (Tr1) hücrelerinin farklılaşmasını indükleyen antiinflamatuvar metabolitler ürettiği bilinen *Prevotella* ve *Oscillibacter* verilebilir (Li v., 2016).

Bağırsağın büyük miktarda lenfoid doku içerdiği bilinmektedir; bu nedenle bağışıklık sistemi yanıtında önemli bir role sahiptir. Bağırsaktaki bağışıklık sistemin düzenlenmesi, folikül ve peyer plakalarında toplanan ve bağırsak epitel salgı bölgelerinde mukoza içinde dağıtılan farklı bölmelerde gerçekleştirilir. İndükleyici ve yardımcı fenotik gösteren lamina propria, B hücresi lenfositleri ile sarılıken interepitelyal T lenfositleri sitotoksik ve baskılayıcı fenotipi gösterir. Antikorlar mukozal yüzeylerde çok fazla üretilir. IgA, kompleman sistemini veya inflamatuvar

yanıtı aktifleştirmez; ayrıca intralüminal proteolize dayanıklıdır. Daha önce bahsedilen tüm özellikle IgA'yı mukozal koruma için ideal kılar.

Probiyotiklerin oral uygulanması bağırsakta bronş ve ürogenital mukoza gibi enfeksiyonu durdurmaya yardımcıdır (Hao vd., 2011, Microbiol vd., 2017, Barbieri vd., 2018). 6 ay boyunca günlük probiyotik tüketiminin serviks kanserin nedenlerinden biri olan *Papillomavirüs* gibi bazı virüslerin temizlenmesini kolaylaştırır (Verhoeven vd., 2010). Hayvan modellerinde probiyotikler, periton ve dalak makrofajlarının fagositik ve mikrobisidal aktivitesini etkinleştirerek *Salmonella typhimurium* gibi bakterilere karşı koruma sağlayabilirler (Polti vd., 2017). *Laktobasil*'ler, çocuklarda ve yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal riskini azaltmaktadır (Mcfarland, 2010). Yetersiz beslenme, tüketilen gıda miktarı ile enerji ihtiyacı arasındaki dengesizlikten kaynaklanan uluslararası bir sorundur. Kesinlikle bağışıklı sistemini etkiler, timüs gibi bağışıklık organlarında önemli hasarlara neden olur ve konağı enfeksiyonlara karşı daha hassas hale getirir. Bir çalışmada, yetersiz beslenen fare modelinde probiyotik fermente sütün (PFM) yeniden beslenme diyeti olarak uygulanması, lokal ve sistematik bağışıklığı artırdığı ve bağırsak mukozası yapısını geliştirdiği görülmüştür (Leblanc vd., 2013). In vivo çalışmalar, probiyotiklerin uygulanmasının yağ dokusu, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-kolesterol ve trigliseritlerin ve serum/plazma toplam kolesterolün azaltılması gibi birçok etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Taylor vd., 2015, S. Torres vd., 2018), Klinik çalışmalarda, probiyotiklerin diyabet hastalarını olumlu yönde etkileyebileceğini kanıtlamıştır; çünkü probiyotikler kan şekeri ve insülin düzeylerini düşürebilir (Shah vd., 2017).

2.4 Koenzim Q10

Koenzim Q10 (CoQ10) veya ubikinon, benzokinon halkası ve bir izoprenoid yan zincirinden oluşan küçük bir lipofilik yapıdır. CoQ10 tüm hücre zarlarında bulunur. İnsanda, mitokondri iç zarında bulunan çeşitli enzimler tarafından sentezlenir. CoQ10 elektron taşıma zincirinde (ETS) önemli bir role sahiptir; çünkü birinci kompleksteki nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)-koenzim Q oksidoredüktaz elektronları alabildiği gibi ikinci kompleksteki (süksinat dehidrojenaz) elektronları da alabilir (Gutierrez-mariscal vd., 2018). Ayrıca, yağ asidi oksidasyonu ve dallanmış amino asit

ve elektron transfer faktörü oksidoredüktazın kompleks 3'e rolü vardır (Giorgio Lenaz vd., 1999). CoQ10'un tamamen oksitlenmiş (ubikinonon), yarı oksitlenmiş (semiubikinon) ve indirgenmiş (ubikinol) olmak üzere 3 formu vardır (G Lenaz vd., 1993, Alcázar-fabra vd., 2016).

Mitokondriyal membran içindeki CoQ10 translokasyonu ile hücrelerin ana enerji kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) üretiminin yolu olarak kabul edilen proton hareket etme kuvvetinin üretilmesine yardımcı olur. Son zamanlarda, matriks zarındaki komplekslerin respirozomlar oluşturarak fiziksel olarak etkileşime girebileceği kabul edilmiştir. Bu nedenle CoQ havuzunun ETC ile etkileşmesinin daha karmaşık olduğu düşünülmektedir. Ayrıca membran fosfolipidini peroksidasyondan koruduğu için membranı stabilize eden bir antioksidan etkiye sahiptir (Gutierrez-mariscal vd., 2018). Yaşlanmanın CoQ seviyesi üzerinde olumsuz bir etkisi vardır; çünkü yaşlanma ile CoQ seviyesi azalır ve bu da membranlarda çok sayıda yaralanmaya yol açar. Bu koenzimin antioksidan etkisinin, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan proteinlerin enzimatik aktivitesi ile artırıldığı kanıtlanmıştır (Blatt vd., 2011). Son araştırmalarda CoQ'un antiaterojenik faktör olarak da çalıştığı sonucuna varılmıştır; çünkü düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu engellemektedir (Rodrı vd., 2010).

CoQ10 bir antioksidan etkiye sahiptir; böylelikle hücrelerimizden serbest radikalleri uzaklaştırır. Bunun sonucunda NF- κ B hücrelerinin aktivasyonunu azaltır ve sonuç olarak TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri azaltır (Olivieri vd., 2013). Yaşlanma enflamasyona katkıda bulunan CoQ10 seviyesinin düşmesine yol açar ve CoQ10 takviyesinin antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma vardır. Meta analizde CoQ10 takviyesinin iltihap belirteçleri CRP, IL-6 ve TNF- α 'yı (Fan vd., 2017) azalttığına dair kanıtlar vardır. Metabolik hastalığı olan hastalarda (obezite, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalık ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi) CoQ10 takviyesinin IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerinde önemli bir azalma olmayıp sadece TNF- α 'yı azalttığı bildirilmiştir (Fan vd., 2017). CoQ10'un sitokinlerin ve süperoksit anyonlarının üretimi üzerindeki etkisine de bakılmıştır. IL-1 β , IL-6, IFN- γ IL-1Ra ve IL-10 üretimi, CoQ10'dan etkilenmezken TNF- α üretimi PBMC'lerin 0.6 ve 1.25 μ M CoQ10 ile inkübe edilmesiyle önemli ölçüde azalmıştır.

Süperoksit anyon üretimi, PBMC'ler tarafından farklı CoQ10 konsantrasyonları kullanılarak büyük ölçüde değişmemiştir (Jaldetti vd., 2010). CoQ10 için ilk kaynak iç üretilir. Benzokinon, tirozin ve fenilalaninden; isoprenoid yan zinciri ise mevalonik asitten oluşur. Sentez çekirdekte gerçekleşir, ardından matrise giriş yapmak için mitokondriyal hedefleme dizisine eklenir (Awad vd., 2018). Sentez mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizomlarda meydana gelir (Bentinger vd., 2010). Yaşlanma ile CoQ10 seviyesi düşer, bu nedenle az gıda alımını telafi etmek, enflamasyon ve hastalıkların potansiyel risklerinden korunmak daha önemli hale gelir. CoQ10 birçok hayvansal protein kaynağında (domuz eti, kuzu eti, dana eti, tavuk, balık), sebzelerde (ıspanak, brokoli ve bezelye), meyvelerde (portakal, çilek, elma) ve tahıllarda (çavdar, buğday) bulunur (Gutierrez-mariscal vd., 2018). Düşük seviyede CoQ üretiminin bazı nedenleri vardır. Bunlar; beslenme eksikliği, CoQ10 biyosentez yolunda kofaktör olan B6 vitamini gibi temel besinleri ve vitaminleri içerir. Günlük diyetimize ek olarak, CoQ10'un kendisi, genetik mutasyon veya CoQ10 sentez genine zarar veren bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar Friedreich ataksisi, Nieman-Pick tip C hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi düşük CoQ10 seviyesiyle ilişkili bazı tıbbi hastalıklar içerir (Bentinger vd., 2010, Garrido-maraver vd., 2014). Özellikle miyelom (omurilik tümörü) (Folkers vd., 1997) ve melanoma (kara tümör) (Rusciani vd., 2007), gibi bazı kanserler ile kandaki düşük CoQ10 seviyesi arasında bir ilişki vardır. Ayrıca CoQ10 takviyesinin fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz gen ekspresyonunu, serbest radikal üretimini modüle ettiği ve insan prostat kanseri hücre hattında (PC3) tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatabildiği kanıtlanmıştır (Quiles vd., 2003).

2.5 Monosodyum Glutamat

Monosodyum glutamat (MSG), yaygın ve esansiyel olmayan bir amino asit olan glutamik asidin sodyum tuzudur. Tüm dokularda, soya sosu ve hidrolize bitkisel proteinler gibi fermente proteinler ve et, balık, süt ve bazı sebzeler gibi protein açısından zengin gıdalarda bulunur. Glutamat hücrelerde ancak serbest olduğunda aktif olur, böylece hücreyi reseptörlerine bağlanarak uyarabilir (Yamaguchi, 1991, Loliger, 2018). Gıda endüstrisinde MSG önemli bir role sahiptir, tatlandırıcı olarak kullanılır. MSG balık ve et suyunun tadını tanımlayan 'umami tadını' sağlar. Bu amino asit, lezzet artırıcı etki gösteren iki forma sahiptir, bunlar L-glutamat ve D-glutamat formlarıdır.

Endüstriyel olarak üretilen glutamik asit, doğal gıdalarda daha yüksek oranda bulunan baskın L-glutamat formunun %99.6'sından fazlasını içerir (Halpern, 2018).

MSG'nin obezite üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir; Çin'de yapılan bir çalışmada yemeklerini yaparken işlenmiş gıda kullanmayıp çok miktarda MSG tüketenlerin aşırı kilolu olmaları muhtemel olduğu (spor veya fiziksel aktivite ve MSG'yi kullananlarla toplam gıda tüketimi dikkate alınmadan) kanısına varılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda obez hale getirmek için farelere MSG enjekte edilmiştir. Araştırmacılar MSG'nin beyinde kusurlara neden olduğunu ve leptin sürecini engellemeye çalıştığını düşünmüşlerdir (Shi vd., 2010, He vd., 2011). Leptin yeterince yediğiniz ve doyduğunuzu beyine işaret eden bir hormondur. Leptin sinyali ile ilgili probleme leptin direnci adı verilir.

MSG gıdaları lezzetlendirmek için yaygın bir gıda katkı maddesi olarak bilinir. Aynı zamanda bağımlılık yapıcı özelliklere sahip olduğu ve kilo almaya yol açabileceği bilinmektedir. Ancak gıda endüstrisi özellikle yaşlı bireylerde; bazen yetersiz gıda alımı olduğundan; yararlı etkisi ile kullanımını haklı çıkarmaktadır. MSG'nin ana bileşeni olan glutamat beyindeki birincil nörotransmitördür, yüksek miktarda glutamat nörolojik semptomlarla ilişkili olabilir (Torres vd., 2004, Maragakis vd., 2015). Glutamat düzeylerinde bir dengesizlik olduğunda, bu enzimatik kaskadın aktivasyonu ile sonuçlanan nörotoksin oluşumuna yol açabilir (Pelaez vd., 1999). 2007de yayımlanan Avrupa Klinik Beslenme Dergisi, MSG'nin tüm toplum için zararsız olduğunu, günde 16 mg/kg tüketilmesi güvenli sınır olduğunu beyan etmiştir (Husarova vd., 2013).

MSG insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik bir etkiye sahiptir; çünkü çekirdek bölünmesi ve replikasyon üzerinde olumsuz etkisi olmadan kromozom sapmasında ve kardeş kromatid değişiminde bir artışa neden olur. Bir çalışmada, artan MSG konsantrasyonu (1-100 mM), B hücrelerinin canlılığında bir etki göstermiştir. Glutamat, metabotropik glutamat reseptörüne (mGluR 7) bağlanmış, bu bağlanmanın sonucu olarak apoptoz, hem bellekte hem de saf B hücrelerinde indüklenmiştir (Jovic vd., 2009). Bir çalışmada MSG'nin yenidoğan sıçanlara uygulanmasının sitokin üretimi üzerinde farklı bir etkisi olduğu görülmüştür; çünkü interleukin (IL)-1 β ve IL-12 konsantrasyonu yükselirken, IL-4, IL-10 ve tümör büyüme faktörü (TGF)- β

konsantrasyonları azalmıştır (Falalyeyeva vd., 2017). Başka bir çalışmada, MSG'nin yenidoğan sıçanlara uygulanması kortikotropik-adrenal yanıt, leptin, insülin ve trigliserit seviyeleri gibi metabolik ve nöroendokrin bağışıklık fonksiyonlarında bir değişiklik gösterdiği; proinflamatuvar sitokin tepkisinin bozulduğu; ancak antiinflamatuvar sitokinlerin tepkisinin hala etkilenmediği görülmüştür (Castrogiovanni vd., 2008). MSG uygulamasının patojenlere karşı bağışıklık yanıtında bir zayıflığa neden olabileceği düşünülmektedir (Nakadate vd., 2016).

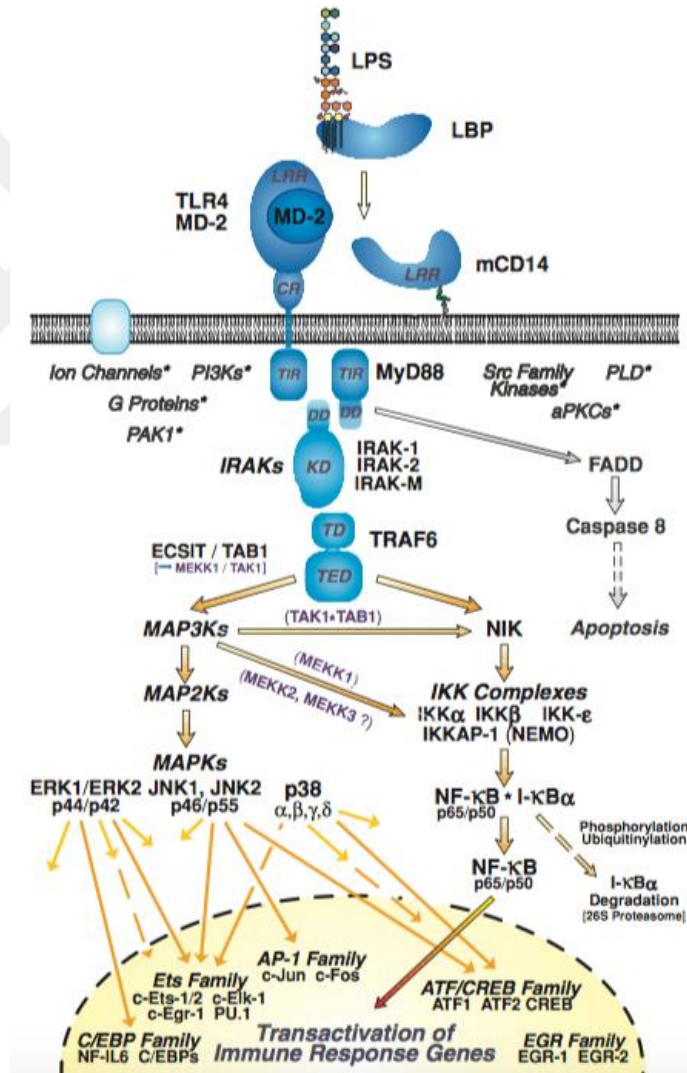
2.6 Lipopolisakkaritler (LPS)

Lipopolisakkaritler (LPS) gram-negatif bakterilerinin dış hücre zarının en önemli bileşenlerinden biridir ve bakteri canlılığının bir önkoşuludur. LPS bakteri hücre zarına bağlandığında bakterinin kendisine ve konak üzerinde toksisite göstermez. Ancak LPS bakteriden ayrıldığında ve bağışıklık sistemine maruz kaldığında toksik kısmı bir inflamatuvar yanıtı neden olur. LPS salınımının bakteri çoğalması ve ölümü sırasında gerçekleştiğini belirtmek gerekir. LPS'nin yapısal özellikleri dış zarın bir bariyer olarak çalışmasına izin verir; böylece bakterilerin toksik maddelerden korunmasını ve zorlu ortamlarda hayatta kalmasını sağlar. LPS, İnterlökin 8'in (IL-8, CXCL8, CXC ligand 8) ve çeşitli hücre tiplerinde diğer enflamatuvar sitokinlerin salınmasını uyarak patojenlere karşı akut bir enflamatuvar yanıtı yol açar.

LPS dört farklı bölümden oluşur. Bunlardan birincisi en önemli bölüm olan Lipit A'dır. Lipit A'da altı veya daha fazla yağ asidi artığı, iki fosforile glukozamin şekerine bağlıdır. Bu yağ asitlerinden dördü, üçüncü karbon üzerinde bir hidroksil grubu taşıırken, diğer ikisi hidroksile formda değildir. LPS'nin ikinci kısmı ise Lipit A glukozamine ve bazı heptoz şeker moleküllerine bağlı iki veya daha fazla 2-keto-3-deoksitonik (KDO) şekerinden oluşan iç çekirdektir. Üçüncü kısım yan zincirlere bağlı şeker moleküllerinden oluşan dış çekirdektir. LPS'nin son kısmı dış çekirdekteki şekerlere bağlı olan ve oldukça immünojenik olan O antijenidir.

Sınırlı sayıda gram-negatif bakterinin dış zarında LPS gözlenmez; örnek olarak *Sphingomonas paucimobilis*'de LPS yerine dış zarda bir şeker ve lipit modeli bulunur. Bu membran modifikasyonu bu bakterinin hayatta kalmasını ve gelişmesini sağlar. LPS

ve diğer bakteriyel bileşenler, kompleman sistem ve antikorlar tarafından tanınır, bu da bileşenlerin nötralizasyonuna yol açar. Beyaz kan hücrelerinin Fc reseptörü tarafından nötrleştirilmiş bakterileri yok ettiği söylenebilir (Amersfoort vd., 2003). LPS, kullanılan konsantrasyona bağlı olarak PBMC’lerde THP1’de ve monositlerde TNF- γ gibi sitokinlerin üretimine yol açar (Schildberger vd., 2013). LPS’nin CD56+ gibi bazı bağışıklık hücrelerinde hücre bölünmesine neden olabileceği kanıtlanmıştır (Goodier vd., 2000). Başka bir çalışmada LPS uygulanmış PBMC’lerin azalmış T hücresi proliferasyon yanıtına ve IFN- γ salgısının değişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Poujol vd., 2015). Şekil 2.2 LPS ile aktifleştirilen yolları gösteriyor.



Şekil 2.2. LPS ile aktifleştirilen yolları
(Alexander vd., 2001)

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan gereçler

Santrifüj, kan tüpü, buzdolabı, CO₂ inkübatörü, otomatik pipet, optik mikroskop, hemasitometre, ölçek, tüpler, 96 oyuklu plaka.

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Liposakkaritler (LPS) (Sigma Aldrich-Lipopolysaccharides from Eschericciha coli O111:B4, Saint Louis, USA.), Ficoll–Hypaque (Histopaque-1077), fosfat tamponlu tuzlu su (PBS), Tripan mavisı, XTT kiti, tannik asit (Acros Organics Morris Plains, New Jersey, USA), D vitamini [D vitamininin aktif formu 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)₂D)] (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA.), Koenzim Q10 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Probiyotik (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Monosodyum glutamat (MSG) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), RPMI, büyüme faktörü ve PBS.

3.1.3 Kan örneği

24 yaşında sağlıklı bir erkek bu çalışmaya gönüllü katılmıştır (ESOGÜ Klinik Araştırmalar Etik kurulu, Karar no: 2019–33, Tarih: 20.05.2019). Çalışmaya başlamadan önce, katılımcıya herhangi bir hastalığı olup olmadığı, kullandığı ilaç, diyet ve sigara, alkol kullanımı sorulmuştur. Dışlama kriterleri müdahaleden dört hafta önce antibiyotik tedavisini, gastrointestinal hastalıkları, antibiyotik tedavisi ile idrar yolu enfeksiyonlarını ve kemoterapötiklerin kullanımını içermektedir. Kan medyan kübital damardan alınmıştır.

- i) Tüm kişisel koruyucu ekipmanlar kullanılmıştır. Eldivenler, önlük, eller temiz ve etanol ile sterilize edilmiştir.
- ii) Kan örneğinin alımı için seçilen bölge; damarın kan alım işlemini kolay ve hızlı hale getirecek kadar görünür olduğu dirsek bölgesidir.
- iii) Kol çevresine turnike sarılmış, damarın daha belirgin olması için el yumruğu oluşturulmuş, iğnenin gireceği bölge %70 izopropil alkol ile dezenfekte edilmiş; dezenfekte edilen bölgeye dokunmadan 30 saniye beklenmiştir.
- iv) Kan alma tüpü tutucuya yerleştirilmiştir.
- v) Gönüllü kişinin kolu tutularak ve iğnenin gireceği yerin altına başparmak koyularak damar tutulmuştur. İğneyi yönlendirmek için parmağın iğnenin üzerinden çekilmesi gerekmektedir.
- vi) İğne damara hızlıca 30° açıyla girmelidir.

3.2 Yöntem

Bu tez çalışmasında, çeşitli doğal bileşiklerin PBMC'lerin canlılık oranı üzerine etkisi araştırılmıştır. PBMC'ler santrifüj yoluyla toplanıp çoğalması XTT testi ile yapılmıştır. 7 farklı grup oluşturulmuştur. Tripan mavisi kullanılarak bu doğal bileşiklerin PBMC'lerin canlılığına etkileri 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülmüştür.

3.2.1 PBMC'lerin izolasyonu

PBMC'ler 1.077 g/mL'lik bir gradyan besiyeri kullanılarak izole edilir, bu besiyeri kanı fraksiyonlara ayırır. Birinci fraksiyon plazma (üst kısım), ikinci fraksiyon bulutlu tabaka gibi görünen PBMC'ler (orta kısım), üçüncü fraksiyon ise kırmızı kan hücreleri ve polimorfonükleer lökositlerdir (bazofiller, eozinofiller ve nötrofiller).

PBMC'lerin izolasyon basamakları aşağıda verilmiştir:

- i) Kan her tüpte 4 mL olacak şekilde 4 farklı tüpe aktarılmıştır.
- ii) Her tüpteki hücreler 8 mL tampon çözeltisi PBS ile seyreltilmiştir.
- iii) 4 mL Ficoll-histopaque, 12 mL seyreltilmiş hücre süspansiyonu üzerine katmanlanmıştır.
- iv) Numuneler 30 dk boyunca 1800 rpm ile santrifüjlenmiştir.

- v) Santrifüjlemeden sonra 3 katman oluşmuştur. Ortadaki katman küçük kümeler içeren şeffaf bir katmandır. Bu küçük kümelenmeler bir pipet yardımıyla PBS içeren başka bir tüpe aktarılmıştır.
- vi) 1800 rpm ile 10 dk daha santifüjleme yapılmıştır.
- vii) Süpernatant çıkarılıp RPMI medyum ilave edilmiş ve PBMC'ler homojenleştirilmiştir.
- viii) Hücreler 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücre canlılığını ölçmek için tripan mavisi testi yapılmıştır. Hücre konsantrasyonu $5.52 \times 10^6/\text{mL}$ 'ye ayarlanmıştır.

3.2.2 Uygulanacak LPS konsantrasyonlarının belirlenmesi

IC50 değeri yüzde inhibisyonun 50 olduğu ve en az iki bağımsız deneyin ortalaması olan bileşik konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Öncelikle LPS %100 fosfat tamponlu tuzlu su ile çözünmüştür. Çözeltinin konsantrasyonu 20000 ng/mL LPS olarak ayarlanmıştır, ardından seri seyreltme yaparak 13 farklı LPS çözeltisi hazırlanmıştır. Hücre sayısı $5.52 \times 10^6/\text{mL}$ 'dir, hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de farklı LPS konsantrasyonların ile eppendorf tüplerinde kültürlenmiştir. Hücre canlılığını ölçmek için tripan mavisi testi yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre sonraki deneyler için hangi konsantrasyonun kullanılacağı belirlenmiştir.

1. 20000 ng/mL LPS stok çözeltisi. LPS, PBS içinde çözünerek hazırlanmıştır.
2. 100 µl stok+ 100 µl ortam (10000 ng)
3. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri
4. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (2500 ng/mL)
5. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (1250 ng/mL)
6. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (625 ng/mL)
7. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (312.5 ng/mL)
8. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (156 ng/mL)
9. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri(78 ng/mL)
10. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (39 ng/mL)
11. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri(20ng/mL)
12. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (10 ng/mL)

13. 100 µl önceki çözelti + 100 µl besiyeri (5 ng/mL)

3.2.3 Gruplar

Tripan mavisi testinde elde edilen sonuçlara göre PBMC'leri indükleyen, 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda LPS kullanılmıştır. Hücreler, her grup hücre ve bir madde içeren 7 gruba ayrılmıştır.

i) Hücre + besiyeri

Hücreler ortamda başka madde olmadan besiyeri ilave edilmiştir. Bu kontrol gruptur.

ii) Hücre + LPS

300 µl hücre ve LPS eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL olmak üzere 3 farklı LPS çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltiler LPS'nin PBS çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Hücreler 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığı tripan mavisi testi ile ölçülmüştür. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde inkübe edilmiştir.

iii) Hücre + Probiyotik + LPS

LPS uygulanan hücrelerin 300 µL'si probiyotik bakteri olan *Saccharomyces boulardii* ile eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. Konsantrasyon 6.108 hücre/mL'ye ayarlanmıştır. 20ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda LPS kullanılmıştır. LPS çözeltileri, LPS'nin PBS çözeltisi içinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Hücreler 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığının ölçümü tripan mavisi testi ile yapılmıştır. Hücrelerin inkübasyonu 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde gerçekleşmiştir.

iv) Hücre + CoQ10 + LPS

LPS ile uyarılmış 300 µL hücre PBS içinde çözünmüş 100 µM CoQ10 ile eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL olarak üç farklı konsantrasyonda LPS çözeltisi kullanılmıştır. LPS çözeltileri LPS'nin PBS içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır ve hücrelerin inkübasyonu 4 gün sürmüştür. İnkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığı tripan mavisi testi ile ölçülmüştür. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda inkübe edilmiştir.

v) Hücre + D vitamini + LPS

LPS ile uyarılmış 300 µL hücre, PBS içinde çözünen 100 µM D vitamininin aktif formu 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)₂D) ile eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL olmak üzere 3 farklı LPS çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltiler LPS'nin PBS çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Hücreler 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı ölçümü inkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra tripan mavisi testi ile yapılmıştır. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda inkübe edilmiştir.

vi) Hücre + Tannik asit + LPS

LPS uygulanan 300 µL hücre, PBS içine çözünmüş 50 µM tannik asit ile eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL LPS çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler LPS'nin PBS çözeltisi içinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Hücreler 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığının ölçümü tripan mavisi testi ile yapılmıştır. Hücrelerin inkübasyonu 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleşmiştir.

vii) Hücre + MSG + LPS

LPS ile uyarılan 300 µL hücre, PBS içinde çözünmüş 10 µg/ml MSG ile eppendorf tüpünde kültürlenmiştir. 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL LPS çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiler LPS'nin PBS içinde çözünmesiyle

hazırlanmıştır. Hücreler 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığının ölçümü tripan mavisi testi ile yapılmıştır. Hücreler 37 °C’de %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda inkübe edilmiştir.

3.2.4 Kültür ortamında hücre çoğalması

PBMC’ler, 25 mM HEPES, %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş FBS, 60 mg/L (100 u/L) penisilin, 100 mg/L streptomisin ve 0.29 g/L L-glutamin ile desteklenmiş RPMI-1640 içinde kültürlenmiştir. 5.52x10⁶ hücre içeren 1 mL; 20 ng/mL, 1250 ng/mL ve 20000 ng/mL konsantrasyonlarındaki LPS çözeltileri, D vitamini (100 µM), MSG (10 µg/ml), CoQ10 (100 µM), tannik asit (50 µM) ve probiyotik bakteri (6.108 hücre/mL) içeren eppendorf tüplerine dağıtılmıştır. Kontrol deneyleri sadece besiyeri ile yapılmıştır. Kültürler 37 °C’de, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde inkübe edilmiştir.

3.2.5 In vitro testler

XTT testi ve tripan mavisi deneyi olmak üzere iki farklı test yapılmıştır.

3.2.5.1 XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) testi

PBMC’lerin proliferasyonunu ölçmek için XTT testi yapılmıştır. XTT’nin temel çalışma prensibi, çoğalan hücrelerde artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumun kullanılması ve formazan boya üretilmesi sonucu renk değişiminin absorbansın spektrofotometre ile ölçülmesine dayanır (Terzioğlu vd., 2013).

Çalışmamızda 96 kuyucuk içeren platelere 7x10⁴ hücre aktarıldı ve her bir ölçüm için 6’şar kuyucuk kullanıldı. 5ml XTT reaktifine 0.1ml aktivasyon çözeltisi eklenerek aktivasyon solüsyonu hazırlandı. İçerisinde 100’er µl taze besiyeri bulunan kuyucuklara 50µl olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 34.5⁰C’ de %5 CO₂’ de inkübasyona bırakıldı. 2 450nm’de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında absorbans okundu.

3.2.5.2 Tripan mavisi testi

Tripan mavisi ile boyama yöntemi hücre canlılığını ölçmek için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir. 5-10 dk içinde yapılabilir. Aşağıda belirtilen adımlarda gerçekleştirilmektedir.

- i) 100 µl numune, 100 µl %0.4 tripan mavisi ile karıştırılır.
- ii) Bu karışım 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- iii) Bir hemasitometreye bir damla bu karışımdan uygulanır, ardından hemasitometre bir binoküler (iki gözlü) mikroskop içine yerleştirilir (10 kat büyütme kullanılır) ve hücrelere odaklanılır.
- iv) Hemasitometrede boyanmamış (canlı) ve boyanmış (cansız) hücreler sayılır.
- v) Her bir kare başına canlı hücre sayısını elde etmek için toplam canlı hücre sayısı 2 (tripan mavisi için seyreltme faktörü) ile çarpılır.
- vi) Canlı hücre yüzdesini belirlemek için, boyanmamış hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına bölünerek 100 ile çarpıldı.

NOT: Hemasitometrenin her iki tarafında birden fazla kare bulunur. Hemasitometrenin her köşesinde bulunan büyük karelerdeki tüm hücreler sayıldı (açık ve mavi). Her büyük kare 16 küçük kareden oluşmaktadır. Her büyük kare sayımında; yalnızca iki yandaki sınır çizgisinde bulunan hücreler sayıldı. Canlı olmayan hücreler mavi boyanan hücrelerdir.

3.2.6 İstatistiksel analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 22.0 programında “(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).” Değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenler değişkenler ortalama± standart hata (SH) olarak gösterilmiştir. Küresellik varsayımı olarak Mauchly's Test of Sphericity testi ve kürelik bozulduğunda Greenhouse-Geisser düzeltmesi testi uygulanmıştır. Tekrarlı denemelerde varyans analiz ile değerlendirilmiştir. Varyans analizi modeli üç faktörlü deneme düzeninde verilmiştir. Bağımlı bir faktör, zaman (24. 48. 72. ve 96. saatler) olarak alınmıştır. Bağımsız iki faktör, doz ana grup (Lps 20, Lps 1250, Lps 20000) ve doz alt grup (madde uygulanmayan kontrol grubu, LPS, LPS+ Monosodyum glutamat, LPS+ Tannik asit, LPS+ Kalsitriol, LPS+ Saccharomyces

boulardii, LPS+ Koenzim Q10) olarak alınmıştır. Çoklu karşılaştırma testi olarak Sidak testi kullanılmıştır. $P<0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.



4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

Mauchly's Test of Sphericity testi sonucuna göre küresellik sağlanamamıştır (Mauchly's $W=0.843$ $sd=5$ $p<0.001$). Küresellik varsayımı bozulduğu için F değeri için Greenhouse-Geisser düzeltmesi yapılmıştır. Greenhouse-Geisser düzeltmesine göre grup içi değişime ait varyans analizi ve gruplararası değişime ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelgeler için kodlamalar:

Doz Ana Grup 1: LPS 20 ng/ml

Doz Ana Grup 2: LPS 1250 ng/ml

Doz Ana Grup 3: LPS 20000 ng/ml

Doz Alt Grup 0: Madde uygulanmayan kontrol grubu

Doz Alt Grup 1: LPS (20 ng/ml ya da 1250 ng/ml ya da 20000 ng/ml)

Doz Alt Grup 2: LPS+Monosodyum glutamat (10µg/mL)

Doz Alt Grup 3: LPS+Tannik asit (50µM)

Doz Alt Grup 4: LPS+Kalsitriol (100µM)

Doz Alt Grup 5: LPS+Saccharomyces boulardii (6.10⁸ ml)

Doz Alt Grup 6: LPS+Koenzim Q10 (100µM)

Çizelge 4.1. Greenhouse-Geisser yöntemine göre grup içi değişime ait varyans çizelgesi

Değişim Kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	P
Zaman	7996,123	2,690	2972,709	116,358	<0.001
Zaman * Doz Ana Grup	1523,383	5,380	283,173	11,084	<0.001
Zaman * Doz Alt Grup	20556,304	16,139	1273,699	49,855	<0.001
Zaman * Doz Ana Grup * Doz Alt Grup	25081,202	32,278	777,034	30,415	<0.001
Hata (zaman)	10101,820	395,407	25,548		

Çizelge 4.2 Gruplar arası değişime ait varyans çizelgesi

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	P
Sabit	5150507,905	1	5150507,905	125485,269	<0.001
Doz Ana Grup	647,828	2	323,914	7,892	<0.001
Doz Alt Grup	64978,594	6	10829,766	263,853	<0.001
Doz Ana Grup * Doz Alt Grup	33359,346	12	2779,946	67,730	<0.001
Hata	6033,574	147	41,045		

Zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’de verilmiştir.

PBMC’lerin canlılığının P değerleri>0.05 iken tüm farklı zaman noktalarında LPS 20 (1), LPS+ monosodyum glutamat (2) ve LPS+ kalsitriol (4) kullanıldığında etkilenmediği gözlemlenmiştir. LPS+ tannik asit (3) kullanıldığında (P değerleri>0.05), 24. ve 48. saatte hücre canlılığında önemli bir azalma görülmüş ve sırasıyla %74.62 ve %54.98 olarak ölçülmüştür. 72. Saatte önemli ölçüde bir artış görülmüştür. 96. saatte ise hücre canlılığında yeniden azalma olmuş ve %54.87 olarak ölçülmüştür. LPS+ *Saccharomyces boulardi* kullanıldığında son zaman noktalarında önemli bir sitotoksik etki görülmüş 72. ve 96. saatlerdeki hücre canlılığı oranı sırasıyla 85.15% ve 43.62%’dir (P değerleri<0.05). 24 ve 48. saatlerdeki etkiler istatistiksel olarak anlamsızdır (P değerleri>0.05).

Koenzim Q 24. 48. ve 72.saatlerde yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir ve hücre canlılığı sırasıyla %97.87, %87.08 ve %78.81 (P değerleri<0.05) ölçülmüştür. 96. saatte hücre canlılığının %94.51’e yükselmesi 96. saatte koenzim Q’nun sitotoksik olmadığını göstermektedir (P değerleri>0.05). LPS ile tannik asit kullanıldığında hücrelerin canlılığının bütün zaman noktalarında inhibe edildiği, bu da tannik asidin hücre sayısını azaltabileceğini göstermektedir. Buradan da tannik asidin kullanılan bileşikler arasında en önemli antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Tannik asidin tersine, LPS, LPS+ monosodyum glutamat ve LPS+ kalsitriolün antiinflamatuvar etkisi bulunmamaktadır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 LPS 20 (Doz ana grup 1) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Doz Alt Grup	Zaman	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları			
					24	48	72	96
1	0	24	100.00±2.01	96.02, 103.98				
		48	100.00±1.71	96.61, 103.39	1.000			
		72	100.00±2.07	95.90, 104.10	1.000	1.000		
		96	100.00±1.56	96.91, 103.09	1.000	1.000	1.000	
	1	24	99.43±2.01	95.45, 103.40				
		48	95.57±1.71	92.18, 98.95	0.582			
		72	93.43±2.07	89.34, 97.53	0.160	0.872		
		96	93.43±1.56	90.35, 96.52	0.146	0.874	1.000	
	2	24	95.88±2.01	91.90, 99.86				
		48	94.30±1.71	90.91, 97.68	0.990			
		72	92.10±2.07	88.00, 96.20	0.663	0.856		
		96	97.32±1.56	94.23, 100.40	0.995	0.586	0.133	
	3	24	74.62±2.01	70.64, 78.60				
		48	54.98±1.71	51.60, 58.37	<0.001			
		72	65.03±2.07	60.94, 69.13	0.003	<0.001		
		96	54.87±1.56	51.79, 57.96	<0.001	<0.001	<0.001	
	4	24	98.69±2.01	94.71, 102.66				
		48	95.14±1.71	91.75, 98.53	0.673			
		72	93.25±2.07	89.15, 97.35	0.250	0.923		
		96	97.47±1.56	94.39, 100.56	0.998	0.821	0.335	
	5	24	95.28±2.01	91.31, 99.26				
		48	88.63±1.71	85.24, 92.01	.062			
		72	85.16±2.07	81.07, 89.26	.002	.419		
		96	43.62±1.56	40.54, 46.71	<0.001	<0.001	<0.001	
	6	24	97.87±2.01	93.89, 101.85				
		48	87.08±1.71	83.70, 90.47	<0.001			
		72	78.81±2.07	74.71, 82.90	<0.001	<0.001		
		96	94.51±1.56	91.42, 97.59	.756	<0.001	<0.001	

Çizelge 4.4 üzerinde LPS konsantrasyonu 1250 yükseltilmiştir. Kontrol grubu, LPS 1250+ monosodyum glutamat, LPS 1250+ kalsitriol ve LPS 1250+ *S. Boulardii* kullanıldığında hücre canlılığı oranında önemli bir azalma olmadığı kaydedilmiştir (P değerleri>0.05). LPS 1250, 48.saatte 91.36% olarak ölçülen hücre canlılığı üzerinde anlamlı inhibisyon etkisi göstermiştir (P değeri<0.05); ancak 72. ve 96. saatlerde LPS 1250'nin anlamlı bir inhibe edici etkisi görülmemiştir. Ayrıca canlı hücreler artmıştır (P değerleri>0.05).

Tannik asit tüm zaman noktalarında önemli bir inhibisyon göstermiştir. 24. saatte canlılık oranı %76.44 iken 48. saatte %54.21'e düşmüştür (P değeri<0.05), bu da anlamlı bir düşüştür. Hücre canlılığı oranı da 72. saatte %51.0'a düşmüştür (P

değeri<0.05). 96.saatte hücre canlılığında biraz artış olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamsızdır (P değeri<0.05).

Koenzim Q; 24., 48. ve 72. saatlerde hücre canlılığını inhibe ettiği için yüksek bir antiinflamatuvar etki göstermiştir. Hücre canlılığı değerleri sırasıyla %97.82, %83.30 ve %69.81dir (P değerleri<0.05). Ancak 96 saat sonunda hücre canlılığı oranı %91.09'a ulaşmıştır. Koenzim Q'nun 96. saatte hücre canlılığını inhibe etmediğini göstermektedir (P değeri>0.05). Bu sonuca göre LPS konsantrasyonu arttığında, PBMC'lerin canlılığı üzerine inhibisyon etkisi uygulamaya başlamıştır. LPS+ tannik asit, PBMC'lerin canlılığı üzerinde en anlamlı inhibisyon etkisini göstermiştir ve bu da Çizelge 4.4'teki sonucu doğrular niteliktedir.

Çizelge 4.4 LPS 1250 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Doz Alt Grup	Zaman	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları			
					24	48	72	96
2	0	24	100.00±2.01	96.02, 103.98				
		48	100.00±1.71	96.61, 103.39	1.000			
		72	100.00±2.07	95.90, 104.10	1.000	1.000		
		96	100.00±1.56	96.91, 103.09	1.000	1.000	1.000	
	1	24	99.32±2.01	95.35, 103.30				
		48	91.36±1.71	87.98, 94.75	.014			
		72	94.28±2.07	90.18, 98.37	.332	.619		
		96	94.28±1.56	91.19, 97.36	.312	.624	1.000	
	2	24	92.15±2.01	88.17, 96.13				
		48	95.74±1.71	92.39, 99.12	.661			
		72	91.22±2.07	87.13, 95.32	1.000	.147		
		96	95.87±1.56	92.77, 98.96	.660	1.000	.232	
	3	24	76.44±2.01	72.46, 80.41				
		48	54.21±1.71	50.82, 57.60	<0.001			
		72	51.00±2.07	46.91, 55.10	<0.001	<0.001		
		96	55.55±1.56	52.46, 58.63	<0.001	.511	.255	
	4	24	94.98±2.01	91.00, 98.95				
		48	94.73±1.71	91.34, 98.11	1.000			
		72	91.10±2.07	87.00, 95.20	.636	.365		
		96	95.15±1.56	92.07, 98.24	1.000	1.000	.383	
	5	24	94.68±2.01	90.70, 98.65				
		48	92.12±1.71	88.73, 95.51	.902			
		72	89.48±2.07	85.39, 93.59	.299	.721		
		96	88.58±1.56	85.49, 91.66	.133	.398	.999	
	6	24	97.82±2.01	93.84, 101.80				
		48	83.80±1.71	80.41, 87.19	<0.001			
		72	69.81±2.07	65.72, 73.91	<0.001	<0.001		
		96	91.09±1.56	88.01, 94.18	.074	<0.001	<0.001	

Önceki denemenin aksine LPS 20000 tüm zaman noktalarında (24., 48., 72. ve 96. saatlerde) yüksek bir hücre canlılığı engelleme potansiyeli göstermiştir. 48 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı oranında anlamlı bir inhibisyon olduğu görülmüştür. Hücre canlılık oranı %78.98'dir (P değeri<0.05). Bu azalma 72. saatte %38.14'e kadar devam etmiştir ve bu oranın 96. saatte aynı kaldığı; ancak yine de istatistiksel olarak bir anlamı olduğuna dikkat çekilmiştir (P değeri<0.05).

LPS 20000+ tannik asit 24 saat sonunda genel olarak yüksek canlılığı inhibe etmiş ve canlılık oranı %90.89 çıkmıştır. 48. saatte önemli bir azalma görülmüştür. Canlılık oran %78.55'e düşmüştür (P değeri<0.05). Bunu takiben 72. saatte ölçülen hücre canlılığında bir artış olmuş ve %85.32 olarak ölçülmüştür. Bu da LPS 20000+ tannik asit uygulamasının PBMC'lerin canlılığı üzerinde inhibe edici etki göstermediği anlamına gelmektedir. Son olarak 96. saatte hücre canlılığında önemli bir azalmanın meydana geldiği görülmüş ve canlılık oranının %58.13 değerine ulaştığı kaydedilmiştir (P değeri<0.05).

Çizelge 4.5 ayrıca LPS+ kalsitriolün tüm zaman noktalarında inhibe edici etkiye sahip olmadığını göstermiştir (P değerleri>0.05). LPS+ *S. Boulardii* uygulandığında 96. saatte hücre canlılığında artış olurken diğer zaman noktalarında anlamlı bir canlılık inhibisyonu olmamıştır. 96. saatte ölçülen canlılık oranı %93.99'dur. Koenzim Q 72. saatte önemli bir sitotoksik etki göstermiştir. Ölçülen canlılık oranı 81.55%'tir (P değeri<0.05). 96 saat sonunda %96.3 olarak ölçülen hücre canlılığında görülen artış, LPS+ koenzim Q'nun etkisinin anlamlı olmadığı anlamına gelir.

LPS+ monosodyum glutamat 24 saatte hücre canlılığını düşürmüş ve canlılık oranı %70.24 olarak ölçülmüştür. Bunu hücre canlılığı oranı %88.85 (P değeri<0.05) olarak ölçülen 48.saatteki istatistiksel olarak anlamlı artış izlemiştir. LPS 20000 ve LPS 200000+ tannik asit, PBMC'lerin canlılığı üzerindeki en önemli antiinflamatuvar etkiyi göstermiştir. LPS 20000+ monosodyum glutamatın aksine hücre canlılığını önemli ölçüde arttığı için uyarıcı bir etki göstermiştir.

Çizelge 4.5 LPS 20000 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda zaman faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Doz Alt Grup	Zaman	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları			
					24	48	72	96
3	0	24	100.00±2.01	96.02, 103.98				
		48	100.00±1.71	96.61, 103.39	1.000			
		72	100.00±2.07	95.90, 104.10	1.000	1.000		
		96	100.00±1.56	96.91, 103.09	1.000	1.000	1.000	
	1	24	95.38±2.01	91.41, 99.36				
		48	78.98±1.71	75.59, 82.37	<0.001			
		72	38.14±2.07	34.05, 42.24	<0.001	<0.001		
		96	38.14±1.56	35.06, 41.23	<0.001	<0.001	1.000	
	2	24	70.24±2.01	66.27, 74.22				
		48	88.85±1.71	85.46, 92.24	<0.001			
		72	95.47±2.07	91.37, 99.56	<0.001	.007		
		96	95.49±1.56	92.40, 98.57	<0.001	.007	1.000	
	3	24	90.89±2.01	86.92, 94.87				
		48	78.55±1.71	75.17, 81.94	<0.001			
		72	85.32±2.07	81.22, 89.42	.226	.006		
		96	58.13±1.56	55.05, 61.22	<0.001	<0.001	<0.001	
	4	24	92.04±2.01	88.06, 96.01				
		48	95.74±1.71	92.35, 99.12	.629			
		72	92.38±2.07	88.28, 96.47	1.000	.456		
		96	95.09±1.56	92.01, 98.18	.827	1.000	.800	
	5	24	91.29±2.01	87.32, 95.27				
		48	85.25±1.71	81.87, 88.64	.115			
		72	87.70±2.07	83.60, 91.80	.712	.784		
		96	93.99±1.56	90.91, 97.08	.894	<0.001	.038	
	6	24	97.21±2.01	93.23, 101.19				
		48	90.58±1.71	87.20, 93.97	.064			
		72	81.55±2.07	77.45, 85.64	<0.001	<0.001		
		96	96.32±1.56	93.23, 99.40	1.000	.030	<0.001	

Çizelge 4.6’da 24. saatte LPS+ tannik asit hücre canlılığında en anlamlı inhibisyon etkisini göstermiştir. Canlılık oranı ölçülmüş ve %74.62 bulunmuş (P değeri<0.05); ancak diğer gruplar anlamlı inhibitör etki göstermemiştir (P değerleri>0.05). 48 saatte LPS+ tannik asit %51.60 olarak ölçülen hücre canlılık oranıyla önemli bir inhibitör etki göstermiştir (P değeri<0.05). LPS+ *S. Boulardii* ve LPS+ koenzim Q’nun her ikisi de inhibe edici özellik göstermiştir. Hücre canlılık oranları sırasıyla %88.63 ve %87.08’dir (P değerleri<0.05). 72 saatte LPS+tannik asit hücre canlılığı oranı üzerinde %60.94 olarak kaydedilen önemli bir inhibisyon etkisi göstermiştir (P değeri<0.05).

Ayrıca LPS+ *S. Boulardii* ve LPS+ koenzim Q da canlılık oranları üzerinde inhibe edici özellik göstermiştir. Sırasıyla %85.16 ve %78.81’dir (P değerleri<0.05). 96.saatte

LPS20 inhibitör etki göstermiştir; fakat bu etki istatistiksel olarak önemsizdir (P değeri<0.05). LPS+ tannik asit canlılık değeri %54.87 (P değeri<0.05) bulunduğundan dolayı, hücrelerin canlılığı üzerine engelleyici bir etki uygulamıştır. LPS+ *S.boulardii* kullanıldığında bir inhibitör etki görüldüğü söylenebilir. Bulunan canlılık oranı %43.62'dir (P değeri<0.05). Ancak LPS+ koenzim Q hücre canlılığı oranı üzerinde inhibitör etki göstermemiştir (P>0.05). Bu sonuca göre LPS+ tannik asit kontrol grubuna kıyaslandığında PBMC canlılığı üzerinde tüm zaman noktalarında en yüksek inhibitör etkiyi gösterirken; LPS+ *S. Boulardii* ve LPS+ koenzim Q zamana bağlı olarak inhibitör etki göstermiştir. Geriye kalan maddeler belirgin inhibitör etki göstermemiştir.

Çizelge 4.7'de LPS 1250+ tannik asit 24. saatte diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında önemli bir inhibitör etki göstermiş ve PBMC'lerin canlılığı %76.44 olarak ölçülmüştür (P değeri<0.005). 48. saatte LPS 1250 sadece kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 91.36% olarak bulunan (P değeri<0.05) canlılık oranı üzerinde inhibitör etki göstermiştir. LPS 1250+ tannik asit tüm gruplar ile kıyaslandığında hücre canlılık oranını %54.21'e ulaşana kadar inhibe etmiştir (P değeri<0.05).

LPS+ Koenzim Q uygulaması kontrol, LPS+ monosodyum glutamat ve LPS+ kalsitriol gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre canlılık oranını %83.30'a inhibe etmiştir (P değeri<0.05). Bu canlılık oranı LPS+ tannik asit uygulamasındaki canlılık oranı ile kıyaslandığında anlamlı bir etkinin var olduğu fark edilmiştir; ancak bu etki inhibitör etki değil de uyarıcı bir etkidir. 72. saatte LPS+ tannik asit ve LPS+ koenzim Q diğer gruplarla kıyaslandığında sırasıyla %51.00 ve %69.81 bulunan (P değerleri<0.05) canlılık oranları üzerinde inhibitör etki uygularken; LPS+ *S. Boulardii* sadece kontrol grubu ile kıyaslanmış ve %89.48 canlılık oranı ile inhibitör etki göstermiştir (P değeri<0.05).

LPS+ kalsitriol ve LPS+ *S. boulardii* uyarıcı etki göstermiştir. Hücre canlılık oranları LPS+ tannik aside kıyasla %91.10 ve %89.48 değerlerine ulaşmıştır (P değeri<0.05). 96.saatte LPS+ tannik asit hücre canlılığını 55.55%'e düşürmüştür; bu da diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir inhibisyonudur (P değeri<0.05). LPS+ *S. Boulardii*' nin inhibitör etkisi gözlenmiştir, hücre canlılık oranı %88.58 bulunmuştur. Sadece kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir inhibisyon ifade etmektedir (P

değeri<0.05). LPS+ *S. boulardii*, LPS+ kalsitriol ile kıyaslandığında inhibitör etki göstermiş ve canlılık oranı %88.58 bulunmuştur (P değeri<0.05).



Çizelge 4.6 LPS 20 (Doz ana grup 1) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Zaman	Doz Alt Grup	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları						
					0	1	2	3	4	5	6
1	24	0	100.00±2.01	96.02,103.98							
		1	99.43±2.01	95.45, 103.40	1.000						
		2	95.88±2.01	91.90, 99.86	.967	.994					
		3	74.62±2.01	70.64, 78.60	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	98.69±2.01	94.71, 102.66	1.000	1.000	1.000	<0.001			
		5	95.28±2.01	91.31, 99.26	.890	.965	1.000	<0.001	.996		
		6	97.87±2.01	93.89, 101.85	1.000	1.000	1.000	<0.001	1.000	1.000	
	48	0	100.00±1.71	96.61, 103.39							
		1	95.57±1.71	92.18, 98.95	.779						
		2	94.30±1.71	90.91, 97.68	.345	1.000					
		3	54.98±1.71	51.60, 58.37	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	95.14±1.71	91.75, 98.53	.634	1.000	1.000	<0.001			
		5	88.63±1.71	85.24, 92.01	<0.001	.096	.355	1.000	.156		
		6	87.08±1.71	83.70, 90.47	<0.001	.013	.069	.355	.023	1.000	
	72	0	100.00±2.07	95.90, 104.10							
		1	93.43±2.07	89.34, 97.53	.432						
		2	94.30±1.71	90.91, 97.68	.153	1.000					
		3	65.03±2.07	60.94, 69.13	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	93.25±2.07	89.15, 97.35	.382	1.000	1.000	<0.001			
		5	85.16±2.07	81.07, 89.26	<0.001	.108	.335	<0.001	.129		
		6	78.81±2.07	74.71, 82.90	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	.492	
	96	0	100.00±1.56	96.91, 103.09							
		1	93.43±1.56	90.35, 96.52	.070						
		2	97.32±1.56	94.23, 100.40	.995	.830					
		3	54.87±1.56	51.79, 57.96	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	97.47±1.56	94.39, 100.56	.998	.780	1.000	<0.001			
		5	43.62±1.56	40.54, 46.71	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		
		6	94.51±1.56	91.42, 97.59	.256	1.000	.992	<0.001	.985	<0.001	

Bu sonuçlara göre LPS 1250+ tannik asidin test edilen diğer gruplar arasında tüm zaman noktalarında en etkili inhibitör grup olduğu görülürken; LPS+ *S. boulardii* ve LPS+ koenzim Q belirli zaman noktalarında diğer gruplarla kıyaslandığında canlılık oranı üzerinde inhibitör etki göstermiştir.



Çizelge 4.7 LPS 1250 (Doz ana grup 2) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Zaman	Doz Alt Grup	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları						
					0	1	2	3	4	5	6
2	24	0	100.00±2.01	96.02, 103.98							
		1	99.32±2.01	95.35, 103.30	1.000						
		2	92.15±2.01	88.17, 96.13	.129	.237					
		3	76.44±2.01	72.46, 80.41	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	94.98±2.01	91.00, 98.95	.825	.945	1.000	<0.001			
		5	94.68±2.01	90.70, 98.65	.747	.902	1.000	<0.001	1.000		
		6	97.82±2.01	93.84, 101.80	1.000	1.000	.645	<0.001	1.000	.999	
	48	0	100.00±1.71	96.61, 103.39							
		1	91.36±1.71	87.98, 94.75	.010						
		2	95.74±1.71	92.39, 99.12	.828	.798					
		3	54.21±1.71	50.82, 57.60	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	94.73±1.71	91.34, 98.11	.486	.978	1.000	<0.001			
		5	92.12±1.71	88.73, 95.51	.029	1.000	.956	<0.001	.999		
		6	83.80±1.71	80.41, 87.19	<0.001	.045	<0.001	<0.001	<0.001	.016	
	72	0	100.00±2.07	95.90, 104.10							
		1	94.28±2.07	90.18, 98.37	.680						
		2	91.22±2.07	87.13, 95.32	.066	.999					
		3	51.00±2.07	46.91, 55.10	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	91.10±2.07	87.00, 95.20	.058	.999	1.000	<0.001			
		5	89.48±2.07	85.39, 93.59	.009	.901	1.000	<0.001	1.000		
		6	69.81±2.07	65.72, 73.91	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
	96	0	100.00±1.56	96.91, 103.09							
		1	94.28±1.56	91.19, 97.36	.199						
		2	95.87±1.56	92.77, 98.96	.748	1.000					
		3	55.55±1.56	52.46, 58.63	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	95.15±1.56	92.07, 98.24	.469	1.000	1.000	<0.001			
		5	88.58±1.56	85.49, 91.66	<0.001	.204	.025	<0.001	.069		
		6	91.09±1.56	88.01, 94.18	.002	.968	.496	<0.001	.772	.998	

Çizelge 4.8’de her bir grubun etkisinin farklı zaman noktalarında diğer gruplarla karşılaştırılması verilmiştir. 24. saatte LPS 20000+ monosodyum glutamat ve LPS+ tannik asit hücre canlılığında anlamlı bir inhibisyon göstermiştir; hücre canlılık oranları sırasıyla %70.24 ve %90.89 bulunmuştur (P değeri<0.05). LPS+ *S. boulardii*’ninise hücre canlılığı oranı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan inhibisyonu gözlemlenmiştir (P değeri>0.05). Tüm maddelerin 24. saatte LPS+ monosodyum glutamat ile karşılaştırıldıklarında uyarıcı etki göstermesi dikkat çekicidir; çünkü hücre canlılığı oranları artmıştır. Bu da LPS+ monosodyum glutamatın diğer gruplar arasında en fazla inhibisyon özelliğe sahip olan grup olduğu anlamına gelmektedir. 48.saatte LPS+ kalsitriol hariç tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında inhibitör etki göstermiştir (P değeri<0.05). LPS+ kalsitriol kullanıldığında bulunan hücre canlılık oranı %95.74’tür (P değeri>0.05). 48.saatte LPS+ tannik asit her ikisi de aynı canlılık değerlerine sahip olduğundan LPS ile karşılaştırıldığında önemli bir fark göstermezken LPS+ monosodyum glutamat, LPS+ kalsitriol ve LPS+ koenzim Q hücre canlılığı oranlarında önemli artış göstermiştir (P değerleri<0.05). LPS + tannik asit; LPS + kalsitriol ve LPS + Koenzim Q ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı oranında anlamlı bir inhibisyon göstermiştir (P değeri <0.05). 72. saatte LPS kullanıldığında hücre canlılığında önemli ölçüde bir düşüş olmuştur ve 38.18% bulunmuştur (P değeri<0.05). Aynı şekilde LPS+ tannik asit; LPS+ *S. boulardii* ve LPS+ koenzim Q kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı hücre canlılığı inhibisyonu göstermiştir; canlılık oranları sırasıyla %83.32, %87.70 ve %81.55 bulunmuştur (P değerleri<0.05). Tüm maddeler, LPS ile karşılaştırıldığında hücre canlılık oranlarında önemli artışlar göstermiştir (P değerleri<0.05). LPS+ koenzim Q; kontrol, LPS+ monosodyum glutamat ve LPS+ kalsitriol grupları ile karşılaştırıldığında %81.55 olarak ölçülen canlılık oranı üzerinde inhibitör etki göstermiştir (P değeri<0.05). Bu zaman noktasında LPS; diğer gruplar arasında en fazla inhibisyon gösteren maddedir. 96. saatte LPS ve LPS+ tannik asidin diğer gruplarla karşılaştırıldığında en fazla inhibitör etkiye sahip oldukları açıkça görülmektedir. LPS+ tannik asit uygulamasından sonra hücre canlılığı oranı ölçülmüş ve %58.13 bulunmuştur, bu LPS uygulamasından sonra ölçülen hücre canlılığı ile kıyaslandığında önemli bir artıştır (daha sonra hücre canlılığı %38.14 ölçülmüştür) (P değeri<0.05).

Çizelge 4.8 LPS 20000 (Doz ana grup 3) uygulanan gruplarda doz alt grup faktörüne göre çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Ana Grup	Zaman	Doz Alt Grup	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları						
					0	1	2	3	4	5	6
3	24	0	100.00±2.01	96.02, 103.98							
		1	95.38±2.01	91.41, 99.36	.907						
		2	70.24±2.01	66.27, 74.22	<0.001	<0.001					
		3	90.89±2.01	86.92, 94.87	.035	.926	<0.001				
		4	92.04±2.01	88.06, 96.01	.115	.997	<0.001	1.000			
		5	91.29±2.01	87.32, 95.27	.054	.969	<0.001	1.000	1.000		
		6	97.21±2.01	93.23, 101.19	1.000	1.000	<0.001	.448	.788	.569	
	48	0	100.00±1.71	96.61, 103.39							
		1	78.98±1.71	75.59, 82.37	<0.001						
		2	88.85±1.71	85.46, 92.24	<0.001	.002					
		3	78.55±1.71	75.17, 81.94	<0.001	1.000	.001				
		4	95.74±1.71	92.35, 99.12	.829	<0.001	.102	<0.001			
		5	85.25±1.71	81.87, 88.64	<0.001	.201	.958	.127	.001		
		6	90.58±1.71	87.20, 93.97	.003	<0.001	1.000	<0.001	.529	.466	
	72	0	100.00±2.07	95.90, 104.10							
		1	38.14±2.07	34.05, 42.24	<0.001						
		2	95.47±2.07	91.37, 99.56	.938	<0.001					
		3	85.32±2.07	81.22, 89.42	<0.001	<0.001	.015				
		4	92.38±2.07	88.28, 96.47	.195	<0.001	.999	.307			
		5	87.70±2.07	83.60, 91.80	.001	<0.001	.172	1.000	.919		
		6	81.55±2.07	77.45, 85.64	<0.001	<0.001	<0.001	.991	.006	.552	
	96	0	100.00±1.56	96.91, 103.09							
		1	38.14±1.56	35.06, 41.23	<0.001						
		2	95.49±1.56	92.40, 98.57	.600	<0.001					
		3	58.13±1.56	55.05, 61.22	<0.001	<0.001	<0.001				
		4	95.09±1.56	92.01, 98.18	.446	<0.001	1.000	<0.001			
		5	93.99±1.56	90.91, 97.08	.143	<0.001	1.000	<0.001	1.000		
		6	96.32±1.56	93.23, 99.40	.884	<0.001	1.000	<0.001	1.000	.999	

Çizelge 4,9’da Kontrol grubu için; tüm zaman noktalarında LPS 20, LPS 1250 e LPS 20000 arasında anlamlı bir fark yoktur. Yalnızca LPS varlığında 24.saatte LPS 20, LPS 1250, LPS 20000 grupları arasında anlamlı bir fark olmamıştır. 48.saatte LPS 20000; LPS 20 ve LPS 1250 ile kıyaslandığında hücre canlılığında önemli bir inhibisyon göstermiştir. Canlılık oranı %78.98 bulunmuştur (P değeri<0.05). LPS 20000’in bu inhibitör etkisi 72. ve 96. saatlerde ölçüldüğünde tekrar görülmüştür. 24. saatte üçüncü grupta (LPS+ monosodyum glutamat), LPS 200000’in hücre canlılığı oranı üzerinde LPS 1250 ile karşılaştırıldığında %70.24 olarak ölçülen maksimum inhibisyon etkisini gösterdiği fark edilmiştir (P değeri<0.05). Diğer zaman noktalarında (48. 72. ve 96. saatlerde) anlamlı bir inhibisyon görülmemiştir (P değerleri>0.05).

24.saatte LPS+ tannik asit varlığında LPS 20000; LPS 20 ve LPS 1250 ile kıyaslandığında %90.89 bulunan hücre canlılık oranında önemli bir artış gözlenmiştir. 48.saatte LPS 20000 ile elde edilen hücre canlılığındaki artış; LPS 20 ve LPS 1250 ile karşılaştırıldığında daha az fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P değeri<0.05). 72. Saatte LPS 1250; yalnızca LPS 20 ile kıyaslandığında hücre canlılığı %51.00 bulunduğundan dolayı önemli inhibisyon göstermiştir (P değeri<0.05). Buna karşılık olarak LPS 20000; LPS 20 ve LPS 1250 ile kıyaslandığında hücre canlılık oranı 85.32%’ye ulaştığı için uyarıcı etki göstermiştir (P değeri<0.05).

LPS + kalsitriol durumunda, farklı konsantrasyonlarda LPS kullanılmasına rağmen tüm zaman noktalarında canlılık inhibisyonunun olmadığı sonucu çıkmıştır (P değerleri<0.05).

LPS+ *S. boulardii*’de 24. saatte LPS 20, LPS 1250 ve LPS 20000 birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir inhibisyon göstermemişken (P değerleri>0.05), 48. saatte LPS 20000 canlılık oranını %88.25’e düşürmüştür. Bu da LPS 1250’ye göre anlamlı bir azalmadır (P<0.05). 96.saatte LPS 20; hücre canlılığı %43.62 olarak ölçülen anlamlı bir inhibitör etki göstermiştir; ancak LPS 1250 ve LPS 20000 canlılık oranları sırasıyla %88.58 ve %93.99’a yükseldiği için uyarıcı etki göstermiştir. Sonuçta LPS 1250 ve LPS 20000’in karşılaştırılması anlamlı bir fark yaratmıştır (P değerleri<0.05). Aynı zamanda, LPS 20000 ile elde edilen hücre değerini; LPS 1250 ile elde edilen değerler karşılaştırmak anlamlı fark yaratmıştır (P değerleri<0.05).

Son grupta (LPS+ koenzim Q); 72.saatte LPS 20'nin hücre canlılık oranını 78.81%'e düşürmesi haricinde diğer zaman noktalarında hücre canlılığı oranlarında anlamlı bir inhibisyonun olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde LPS 1250 hücre canlılığını LPS 20'ye göre anlamlı bir azalma olan %69.81'e inhibe ederken; LPS 20000 hücre canlılığını %81.55'ye yükseltmiştir. Bu yükselme LPS 1250'ye göre anlamlı, LPS 20'ye göre anlamlı değildir (P değeri<0.05).

Çizelge 4.9 Doz ana grup faktörüne göre doz alt grup çoklu karşılaştırma sonuçları

Doz Alt Grup	Zaman	Doz anagrup	Ortalama± Standart Hata	%95 Güven aralığı	Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları		
					1	2	3
0	24	1	100.00±2.01	96.02,103.98			
		2	100.00±2.01	96.02, 103.98	1.000		
		3	100.00±2.01	96.02, 103.98	1.000	1.000	
	48	1	100.00±1.71	96.61, 103.39			
		2	100.00±1.71	96.61, 103.39	1.000		
		3	100.00±1.71	96.61, 103.39	1.000	1.000	
	72	1	100.00±2.07	95.90, 104.10			
		2	100.00±2.07	95.90, 104.10	1.000		
		3	100.00±2.07	95.90, 104.10	1.000	1.000	
	96	1	100.00±1.56	96.91, 103.09			
		2	100.00±1.56	96.91, 103.09	1.000		
		3	100.00±1.56	96.91, 103.09	1.000	1.000	
1	24	1	99.43±2.01	95.45, 103.40			
		2	99.32±2.01	95.35, 103.30	1.000		
		3	95.38±2.01	91.41, 99.36	.402	.425	
	48	1	95.57±1.71	92.18, 98.95			
		2	91.36±1.71	87.98, 94.75	.234		
		3	78.98±1.71	75.59, 82.37	<0.001	<0.001	
	72	1	93.43±2.07	89.34, 97.53			
		2	94.28±2.07	90.18, 98.37	.988		
		3	38.14±2.07	34.05, 42.24	<0.001	<0.001	
	96	1	93.43±1.56	90.35, 96.52			
		2	94.28±1.56	91.19, 97.36	.974		
		3	38.14±1.56	35.06, 41.23	<0.001	<0.001	
2	24	1	95.88±2.01	91.90, 99.86			
		2	92.15±2.01	88.17, 96.13	.473		
		3	70.24±2.01	66.27, 74.22	<0.001	<0.001	
	48	1	94.30±1.71	90.91, 97.68			
		2	95.74±1.71	92.39, 99.12	.911		
		3	88.85±1.71	85.46, 92.24	.076	.015	
	72	1	94.30±1.71	90.91, 97.68			
		2	91.22±2.07	87.13, 95.32	.987		
		3	95.47±2.07	91.37, 99.56	.582	.385	
	96	1	97.32±1.56	94.23, 100.40			
		2	95.87±1.56	92.77, 98.96	.886		
		3	95.49±1.56	92.40, 98.57	.793	.997	
3	24	1	74.62±2.01	70.64, 78.60			
		2	76.44±2.01	72.46, 80.41	.892		
		3	90.89±2.01	86.92, 94.87	<0.001	<0.001	
	48	1	54.98±1.71	51.60, 58.37			
		2	54.21±1.71	50.82, 57.60	.984		

Çizelge 4.10 Doz ana grup faktörüne göre doz alt grup çoklu karşılaştırma sonuçları(devam)

	72	3	78.55±1.71	75.17, 81.94	<0.001	<0.001	
		1	65.03±2.07	60.94, 69.13			
		2	51.00±2.07	46.91, 55.10	<0.001		
	96	3	85.32±2.07	81.22, 89.42	<0.001	<0.001	
		1	54.87±1.56	51.79, 57.96			
		2	55.55±1.56	52.46, 58.63	.986		
		3	58.13±1.56	55.05, 61.22	.369	.567	
4	24	1	98.69±2.01	94.71, 102.66			
		2	94.98±2.01	91.00, 98.95	.477		
		3	92.04±2.01	88.06, 96.01	.061	.662	
	48	1	95.14±1.71	91.75, 98.53			
		2	94.73±1.71	91.34, 98.11	.998		
		3	95.74±1.71	92.35, 99.12	.993	.967	
	72	1	93.25±2.07	89.15, 97.35			
		2	91.10±2.07	87.00, 95.20	.847		
		3	92.38±2.07	88.28, 96.47	.987	.962	
	96	1	97.47±1.56	94.39, 100.56			
		2	95.15±1.56	92.07, 98.24	.650		
		3	95.09±1.56	92.01, 98.18	.631	1.000	
5	24	1	95.28±2.01	91.31, 99.26			
		2	94.68±2.01	90.70, 98.65	.995		
		3	91.29±2.01	87.32, 95.27	.413	.554	
	48	1	88.63±1.71	85.24, 92.01			
		2	92.12±1.71	88.73, 95.51	.390		
		3	85.25±1.71	81.87, 88.64	.420	.016	
	72	1	85.16±2.07	81.07, 89.26			
		2	89.48±2.07	85.39, 93.59	.370		
		3	87.70±2.07	83.60, 91.80	.771	.905	
	96	1	43.62±1.56	40.54, 46.71			
		2	88.58±1.56	85.49, 91.66	<0.001		
		3	93.99±1.56	90.91, 97.08	<0.001	.045	
6	24	1	97.87±2.01	93.89, 101.85			
		2	97.82±2.01	93.84, 101.80	1.000		
		3	97.21±2.01	93.23, 101.19	.994	.995	
	48	1	87.08±1.71	83.70, 90.47			
		2	83.80±1.71	80.41, 87.19	.443		
		3	90.58±1.71	87.20, 93.97	.388	.017	
	72	1	78.81±2.07	74.71, 82.90			
		2	69.81±2.07	65.72, 73.91	.008		
		3	81.55±2.07	77.45, 85.64	.727	<0.001	
	96	1	94.51±1.56	91.42, 97.59			
		2	91.09±1.56	88.01, 94.18	.328		
		3	96.32±1.56	93.23, 99.40	.798	.057	

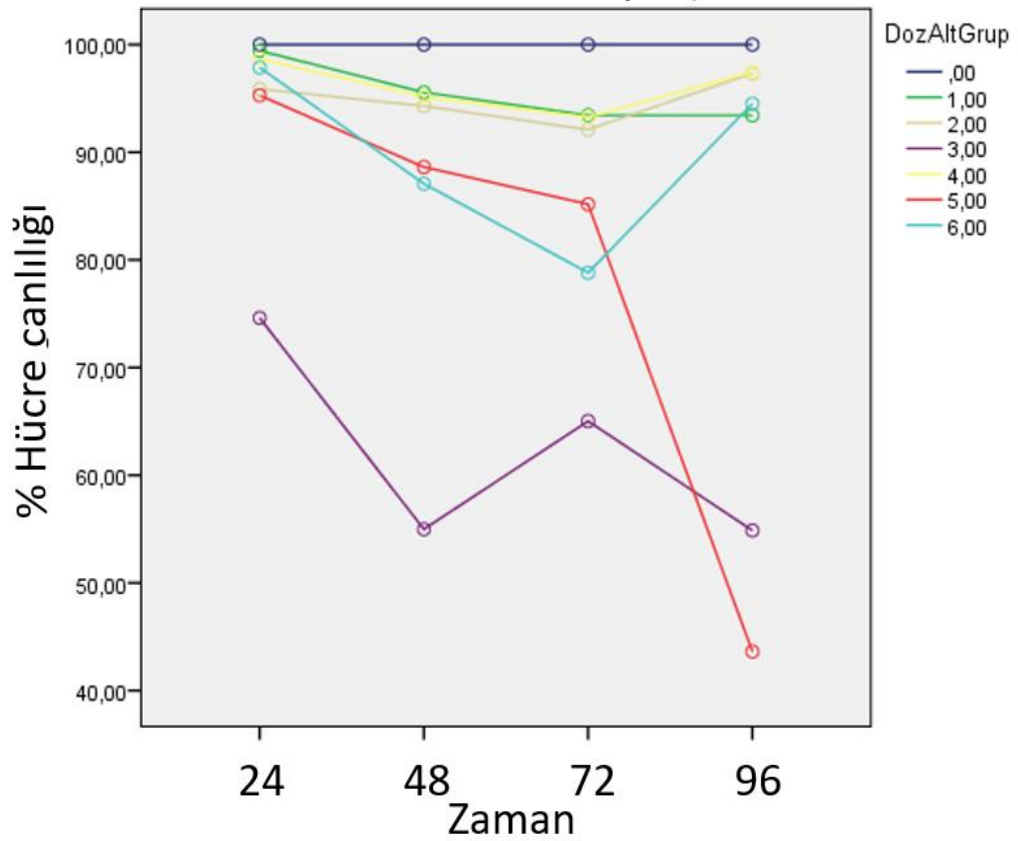
Şekil 4.1’de farklı bileşiklerin PBMC’ler üzerindeki etkisi gösterilmektedir. LPS 20; PBMC’lere 96 saatten fazla inkübasyonda anlamlı olmayan bir inhibitör etki göstermiştir. Hücre canlılığı hala yüksektir (yaklaşık %92).

Monosodyum glutamat tüm süre boyunca anlamlı bir inhibitör etki göstermemiştir. Hücre canlılığı yaklaşık %97’dir.

Tannik asit kullanıldığında 24.saatte anlamlı bir sitotoksik etki gözlemlenmiştir ve hücre canlılığı %75 bulunmuştur. 48.saatte hücre canlılığında %54 bulunan başka bir inhibisyon görülmüştür. Bu azalmadan sonra 72.saatte bir artış ve 96. saatte yine bir azalma olmuştur. Canlılık oranı yaklaşık %55’dir. LPS 1250+ kalsitriol test edilen süre boyunca zayıf bir inhibitör etki göstermiştir.

LPS+ *S. boulardii* 72.saatte kadar zayıf bir inhibitör etki göstermiş olup ardından hücre canlılığında keskin bir inhibisyon görülmektedir; bu da mayanın son zaman noktalarında bu etkiyi gösterebileceği anlamına gelmektedir.

LPS 20+ koenzim Q’da görülen inhibitör etki giderek artış göstermiştir. 72.saatte hücre canlılığı minimumken (yaklaşık %80) daha sonra %94’e ulaşmıştır.



Şekil 4.1. LPS 20 (Doz ana grup 1) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri

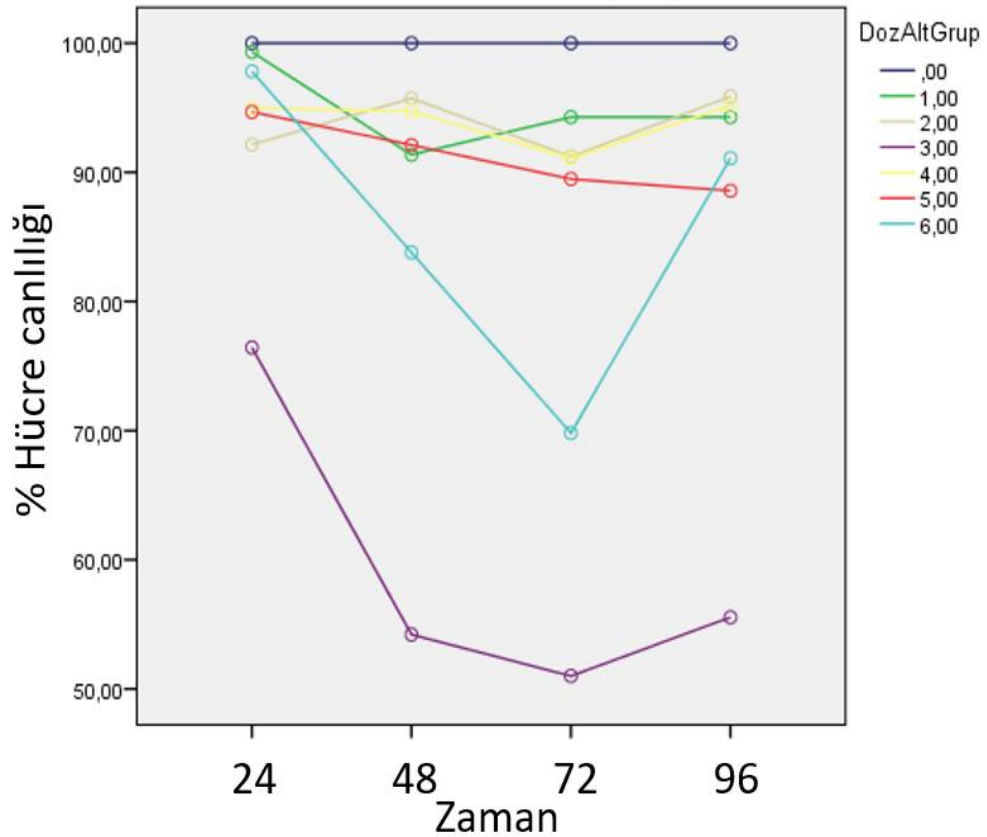
Şekil 4.2’de farklı bir grubun (LPS 1250) PBMC’lerin canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmektedir. LPS 1250; 48 saat sonra hafif bir inhibitör etki göstermiştir ve hücre canlılığı yaklaşık %90’dır. Sonrasında bir artış olmuştur ve hücre canlılığı 96.saatte yaklaşık %93’dür.

LPS 1250+ monosodyum glutamat hücre canlılığında önemsiz bir etki göstermiş ve yaklaşık %95’dir.

LPS 1250+ tannik asit anlamlı bir inhibitör etki göstermiştir. 24.saatte hücre canlılık oranı yaklaşık %78’dir. 48.saatte bu inhibisyon değeri yaklaşık 53%; 72.saatte hafif bir azalma ile %51; son olarak 96.saatte ise %54 olduğu görülmektedir.

LPS+ kalsitriol test edilen süre boyunca PBMC’ler üzerinde zayıf inhibitör etki göstermiştir. 96.saatteki hücre canlılığının %94 olduğu görülmektedir.

LPS+ *S. bouardii* tüm zaman noktalarında zayıf bir inhibitör etki göstermiştir. 24.saatte hücre canlılığının %89 olduğu görülmektedir. LPS 1250'de 48. Ve 72.saatlerde hücre canlılığındaki keskin düşüşten dolayı belirgin bir inhibisyon etkisi vardır. Canlılık oranlarının yaklaşık %83 ve %70 olduğu görülmektedir. Bunu 96.saatteki yaklaşık %92 ile hızlı bir artış izlemektedir.



Şekil 4.2. LPS 1250 (Doz ana grup 2) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri

Şekil 4.3'de LPS 20000 için farklı madde uygulamalarının PBMC'lerin canlılığına etkileri gösterilmektedir. LPS 20000 hücre canlılığı üzerinde anlamlı inhibitör etki göstermiştir. 48.saatte hücre canlılığını %80'e düşürmüştür. Bu azalma 72.ve 96.saatlerde 40%'ın altında bir değere kadar devam etmiştir.

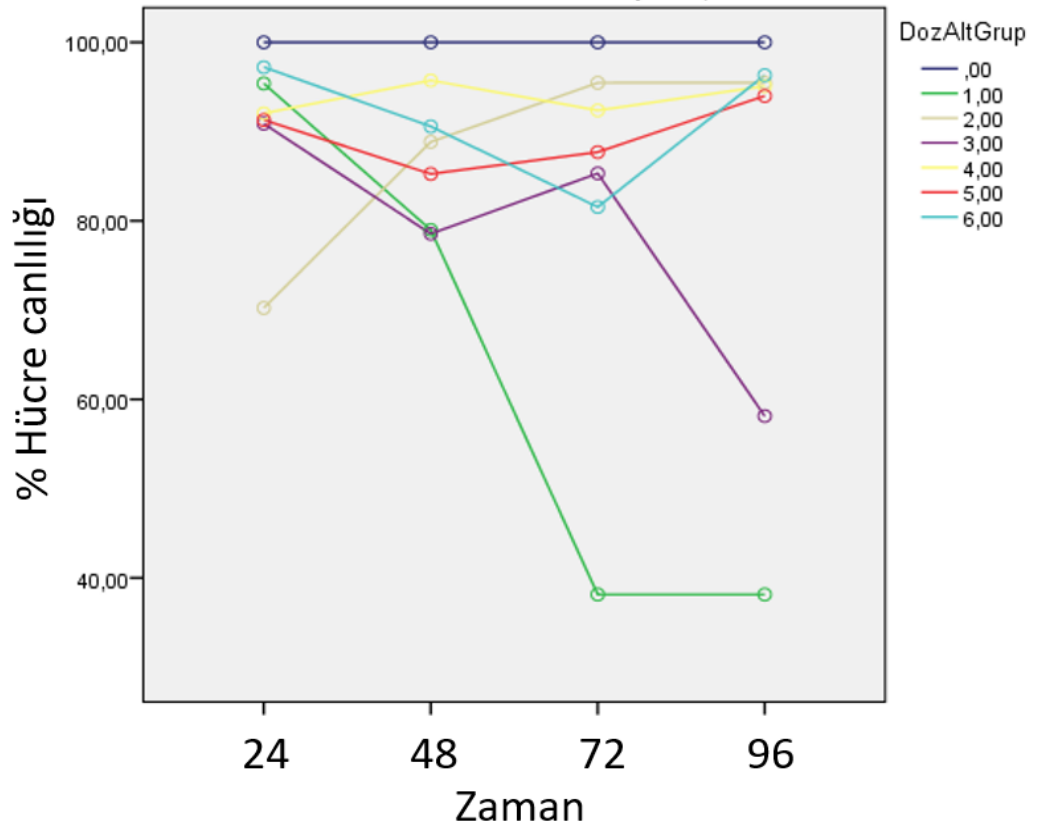
LPS 20000+ monosodyum glutamat, 24. saatte hücre canlılığında %70 ölçülen anlamlı bir azalma olmuştur; fakat bu bileşikler 48, 72 ve 96.saatlerde bu etkinliği göstermemiştir. Hücre canlılığı 96.saatte %93 bulunmuştur.

LPS 20000 + tannik asit de 24.saatte hücre canlılığında inhibitör etki göstermiştir ve bu oran yaklaşık %90'dır; ardından bu oran 48. Saatte %80'e düşmüş, sonra yeniden %85'e yükselmiş ve son olarak 96.saatte canlılık oranının %58'den daha az olduğu görülmektedir.

LPS 20000+ kalsitriol PBMC'lerin canlılıkları üzerinde zayıf bir inhibisyon göstermiştir; hücre canlılığı oranı 96.saatte ölçülmüş ve %90 olduğu görülmüştür.

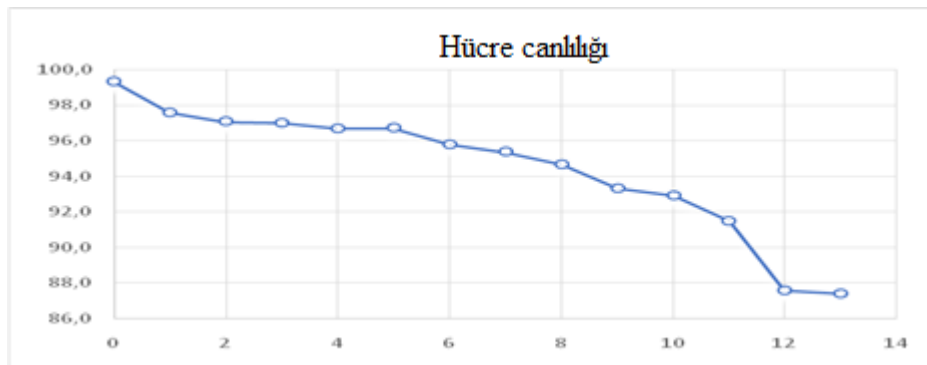
LPS+ *S. boulardii* hafif bir inhibitör etki göstermiştir. 48.saatte hücre canlılık oranına bakıldığında yaklaşık olarak %85 bulunmuştur. 96.saatte hafif bir yükselme olmuş ve canlılık oranı %92'ye ulaşmıştır.

LPS 20000+ koenzim Q; diğer tüm zaman noktalarının aksine yalnızca 72.saatte hücre canlılığı üzerinde anlamlı inhibisyon göstermektedir. Canlılık oranı %82'dir.



Şekil 4.3. LPS 20000 (Doz ana grup 3) için farklı madde uygulamalarının % hücre canlılığına etkileri

Şekil 4.4, geniş LPS konsantrasyonu aralığının PBMC'lerin canlılığı üzerindeki etkisini göstermektedir, hücre canlılığı konsantrasyona bağlı bir şekilde azalmıştır; hücrelerin canlılığı kontrol grubunda (LPS'siz hücreler) yüksekken, grup 12 ve 13'te (LPS konsantrasyonları sırasıyla 10000 ve 20000 ng / ml idi) %90'dan azdı. Bu sonuçlara göre, 20 ng / ml (grup 3), 1250 ng / ml (grup 9) ve 20000 ng / ml (grup 13) olan diğer deneyler için 3 farklı LPS konsantrasyonu seçildi.



Şekil 4.4. Geniş LPS konsantrasyonu aralığının PBMC'lerin canlılığı üzerindeki etkisi

4.2 Tartışma

PBMC'ler periferel kandan izole edilir ve yuvarlak bir çekirdek bulunduran herhangi bir kan hücresi olarak tanımlanır. PBMC'ler; lenfositler (T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücüler), monositler ve dendritik hücreleri hücreleri içerir. (Verhoeckx vd., 2015).

PBMC'ler saf hücrelerdir ve efektör hücelere farklılaşmak üzere aktive edilir. PBMC'ler tek bir antijene düşük bir gösterirler; bu nedenle T lenfositlerin proliferasyon aktivasyonu için fitohemaglutinin (PHA) ve concanavalin A (con A) gibi poliklonal aktivatörler kullanılır. *Phytolacca americana*'dan elde edilen bir mitojen (pokeweed mitojen) hem T lenfositlerin hem de B lenfositlerin proliferasyonunu indüklemek için kullanılır. PBMC'ler tam kan örneğinden veya buffy coat'lardan (sarımsı-beyaz lökosit tabakası) izole edildiğinden kolay bulunur. PBMC'ler bağırsak mukozasındaki bağışıklık hücrelerinin farklı fenotiplerine sahiptir (Verhoeckx vd., 2015).

PBMC'lerin aktive olması gerektiği bilinmektedir, aktivasyon işlemi Concanavalin A ve LPS gibi farklı malzemeler kullanılarak yapılabilir. LPS etkisini doğrudan göstermez ve Toll-benzeri reseptör (TLR) adı verilen bir transmembran proteine ulaşana kadar LBP ve mCD14 gibi bir periferel protein ile taşınması gerekir, bu da bağışıklık yanıtı genlerinin aktivasyonunu başlatan yolu aktive eder. Ayrıca LPS reseptör kaspaz 8 yoluyla aktifleştğinde hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. LPS'nin tam aktivasyonu için MD-2 ve TLR arasında konjugasyon gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında LPS uygulanmadan önce ve sonra, D₃ vitamini, polifenoller, MSG, koenzim Q10 ve probiyotikler gibi günlük öğünlerin önemli bir bölümünü oluşturan doğal maddelerin, sağlıklı gönüllü bir kişiden izole edilen PBMC'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

4.3 D3 vitamininin Etkisinin Tartışılması

D₃ vitamini güneş ışığına maruz kalındığında insan vücudunda doğal olarak üretilen bir steroid hormondur. Epidermis hücreleri önemli miktarda D vitamini için öncü olan 7-dehidrokolesterol içerir. Bileşikteki çift bağ provitamin D oluşturmak üzere izomerleştirilecek ve bu da 25-(OH)-hidroksilaz ile hidroksilasyon için karaciğere taşınacaktır. Bu form D vitaminin ana formudur; çünkü 15 gün gibi uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir; bu nedenle D vitamini testlerinde ölçülen formdur. Sağlıklı bireylerde D vitamininin konsantrasyonu 25(OH)D₃ en az 30ng/mL olmalıdır; ancak bu D vitamini formu aktif değildir ve daha fazla değişime ihtiyaç duyar. Böylece 25(OH)D₃'ün 1 α -hidroksilaz ile 15 saatlik bir yarılanma ömre sahip olan aktif form olan 1,25(OH)₂D₃ üretmek için bir kez daha hidroksilize edildiği böbreğe taşınır. Makrofaj ve nötrofilin 1 α -hidroksilaza sahip oldukları için, vitaminin aktif formunu üretebildikleri söylenebilir. D₃ vitamini biyolojik etkisini neredeyse tüm hücre tipleri tarafından ifade edilen VDR'ye bağlanarak uygular. VDR kodlamasından sorumlu gen, insanda 12.kromozomda (12q13) bulunur ve en az 14 ekson içerir (Nair vd. , 2012).

D vitamini vücutta birçok fonksiyondan sorumludur. Bağırsakta doğrudan %30-40 kalsiyum emilimini ve dolaylı olarak %80 fosfor emilimini sağlamaktadır. Ayrıca kemik metabolizmasında da önemli bir role sahiptir; çünkü D vitamini osteoblastta NF- κ B Ligand (RANKL) ekspresyonunun reseptör aktivatörünü, osteoklastın farklılaşmasına ve kalsiyumun kan dolaşımına uygun bir kalsiyum konsantrasyonu sağlayarak yukarı-regüle eder. D vitamini bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar. T ve B hücrelerinin çoğalmasını azaltır ve plazma hücreleri tarafından antikor üretimini azaltır. Ayrıca IFN- α ve IL-2 gibi sitokinlerin üretimini azaltır ve IL-5 ve IL-10 üretimini artırır, bu da TH-2 tepkisine doğru kayma anlamına gelir.

Makrofajlar ve nötrofiller D₃ vitaminine yanıt olarak antimikrobiyal, antiviral ve antitümör etkilerine sahip bir peptit olan katelisidin üretimini artırır. Dendritik hücreler, olgunlaşmasını engellediği ve MHC'nin tamamlanmasını önlediği için D₃ vitamininden olumsuz etkilenir. T hücrelerinin aktivasyonunda eksiklik ile sonuçlanır. D vitamini çok çeşitli kanser hücre dizilerine karşı antiproliferatif ajan olarak kabul edilmektedir. Bcl-2 ve bax içeriklerinin modülasyonu yoluyla ya da kalsiyuma bağlı proapoptik proteaz mikrokaspain ve kaspaz-12'yi aktive ederek kalsiyum konsantrasyonu artırarak bazı hücre dizilerinde apoptozu indükleyebilir. Gariptir ki; D vitamini diğer hücre dizisinde

kaspaz 3 inhibisyonuna yol açan kalbindin ekspresyonunu indükleyerek apoptozu önler. D vitamini ayrıca kanser hücrelerinin tamamen farklılaşmasını indükler, anjiyogenezi önler ve insülin üretimini indükler (Dusso vd. , 2005).

D vitamini eksikliği 25(OH)D₃'ün konsantrasyonu 20 ng/mL'den az olduğunda görülür ve insanların, özellikle de kışın yeterli derecede güneş ışığı alamayan kuzey enlemlerinde yaşayan insanların, %50'sinden fazlasını etkilediği zaman pandemik hastalık olarak kabul edilir. Bu problemin sonucunda gıda imalat sektörü insan vücudunda doğal olarak üretilen D vitamini eksikliğini gidermek için gıdaların içine D vitamini eklemektedir.

D vitamini eksikliği paratiroid hormon üretimini artırır. Bu hormon osteoklastı aktive ederek kemikten kan dolaşımına önemli miktarda kalsiyumun geçmesine yol açtığından kemiklerin zayıflamasına ve kemik mineralizasyon problemlerine sebep olur. Ve çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde kemik erimesi ve yaşlılarda kemik kırılma riskini artırır. D₃ vitamini eksikliğin kritik sonuçlarından biri kanda yüksek miktarda kalsiyum üreten dört paratiroid bezinin genişlemesi olarak tanımlanan paratiroid hiperplazisidir. Bu sorun P21 ve P27 gibi sikline bağımlı kinaz inhibitörlerini indükleyerek hücrelerin genişlemesini engelleyen D vitamini enjeksiyonu ile çözülebilir. D vitamin eksikliğinin iskelet kaslarında zayıflığa neden olduğu bildirilmiştir (Dusso vd., 2005).

Jacques M. Leire ve grubu D₃ vitaminin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃ ve 25(OH)D₃ ve 24,25(OH)₂D₃ gibi metabolitlerinin sağlıklı gönüllü kişilerden alınan PBMC'ler üzerindeki antiproliferatif etkisini araştırmış ve 1,25(OH)₂D₃'ün PHA, PWM ve dermafiton 0 gibi farklı bileşikler kullanarak PBMC'lerin uyarılmasından sonra DNA sentezinin doza bağlı inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur. Yarı maksimal DNA sentezi inhibisyonu PHA, PWM ile aktive edilen hücrede 10⁻¹¹-10⁻¹⁰ M D₃ vitaminin aktif formunun varlığında gerçekleşirken, DNA sentezindeki yarı maksimal inhibisyon dermafiton 0 ile aktive edilen hücrede 10⁻¹⁰-10⁻⁹ M D₃ vitamininin aktif formunun varlığında gerçekleşmiştir (Lemire vd., 1984).

Maria Stio ve grubu D₃ vitamini ve KH1060 ve EB1089 gibi analoglarının, Crohn hastalarından alınan PBMC'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışmalarında son konsantrasyon 1 nM D₃ vitamini ve analoglarının infliximab ile tedavi edilen hastalardan alınan PHA ile uyarılmış PBMC'ler üzerinde proliferasyonu engelleyici bir etki uyguladığını bulmuşlardır. Bazı hastalar tedaviye cevap vermeseler de; D vitamini ve türevleri, etkilerinin infliximab'dan bağımsız olduğunu gösteren inhibitör etki göstermiştir (Stio vd., 2006).

Maria Martinesi ve grubu hem sağlıklı bireylerden hem de iltihabi bağırsak hastalarından alınan PBMC'lerin proliferasyonu üzerinde D vitamini ve analogu olan EB1089'un etkisini incelemiştir. 10 ve 100 nM D₃ vitamini ve EB1089'un PHA ile uyarılan PBMC'lerin proliferasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca aynı koşullarda 5 günlük kültürden sonra ELISA PLUS kiti ile DNA parçalanmasını ölçmüşler ve D vitamini her iki konsantrasyonda da apoptozu indüklediği ve bunun da D vitamini ve analogunun antiproliferatif etkisinin apoptoz yoluyla olacağını görmüşlerdir (Maria Martinesi, 2008).

Shookooh Yousefi ve grubu tarafından PBMC'lerin çoğalması üzerinde D vitaminin etkisi incelenmiştir. Bu hücreler yapışık ve yapışmamış olarak iki gruba ayrılıp; 15 µg/ml concanavalin A ile uyarılmıştır. 300 nM D vitaminin [³H] timidin katılım testi ile ölçülen PBMC'lerin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Yousefi vd., 1989).

Maria Stio ve grubu tarafından yapılan başka bir çalışmada ise D₃ vitamini ve türevleri olan KH1060 ve EB1089'un T lenfositleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sağlıklı ve ülseratif kolit hastalarından PBMC'ler alındıktan sonra T lenfositleri saflaştırılmıştır. Daha sonra PHA ile uyarılmış T lenfositlerini bu bileşiklerin (D vit ve türevleri) farklı konsantrasyonları (0.1, 1, 10 nM) uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu [³H] timidin katılım testi ile ölçülmüş ve hem D₃ vitamini hem de türevi olan EB1089, 0.1 nM derişimde proliferasyon engellenmediği için, doza bağlı inhibisyon görülmüştür. 1 nM derişimde hücrelerde anlamlı bir proliferasyon gözlenmiştir. 10 nM derişimde en yüksek inhibisyon gözlemlenmiştir. Diğer taraftan KH 1060'ın proliferasyonu engelleyici etkisi 0.1 nM'da da anlamlı bir inhibisyon gösterdiğinden, doza bağlı

değildir. Bu bulguların sonucunda KH 1060, sağlıklı ve ülseratif kolit hastalarında D₃ vitamini ve EB1089'dan daha fazla proliferasyon baskılayıcı olarak kabul edilmiştir (Stio, vd., 2001).

Maria Stio ve grubu, başka bir çalışmada 0.1 nM ve 0.1µg/ml anti-TNF'nin crohn ve ülseratif kolit hastalarından alınan PBMC'lerin çoğalması üzerindeki etkisini araştırmıştır. İzole edilen hücreler 10µg/ml PHA ile uyarılmış ve kültürün bir grubu son 24 saat boyunca 10µg/ml LPS ile muamele edilmiştir. Hücre çoğalması testi [³H] timidin katılım testi ile yapılmış ve sonuçta KH 1060 hem de anti-TNF'nin hücre çoğalması engellediğini bulmuşlardır. LPS uygulanan grup ülseratif kolit hastalarından alınan PBMC'lerde hafif bir inhibisyon ve Crohn hastalarında hafif bir artış gözlemlenmiştir (Stio vd., 2004).

D₃ vitamini ayrıca birçok hücre dizisinde hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. Buna Mcf-7 hücre dizisi örnek olarak verilebilir. Saraçlıgil ve grubu D vitaminin geniş konsantrasyon aralığında (10-1000 nM) meme kanseri hücre dizisi olan Mcf-7 üzerindeki etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada doza bağlı inhibisyon gerçekleşirken; 500 ve 1000 nM derişimde D vitaminin hücreler üzerinde doğrudan toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Saraçlıgil vd., 2015).

Bu tez çalışmasında PBMC'ler izole edildikten sonra 3 farklı derişimde (20, 1250, 20000 ng/mL) LPS ile uyarılmıştır. Hücreler aynı anda 100 µM D vitamini ve LPS ile kültürlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LPS'nin herhangi bir konsantrasyonunda D vitamininin PBMC'ler üzerinde etkisi görülmemiştir.

4.4 Tanenlerin Etkisinin Tartışılması

Tannik asit flavonoid ve fenolik asit olmak üzere iki genel bileşik sınıfına sahip olan yaygın polifenollerden biridir. Tannik asit çok sayıda hidroksil grubuna sahip olduğundan suda kolaylıkla çözünür. Tanenler ağaç, yaprak ve kök gibi tüm bitki yapılarında bulunabilir. Tıbbi faydaları olduğu bilinmektedir. Geçmişte hasarlı dokuda bulunan proteinlerle çapraz bağ oluşturarak kanamaları durdurmak için kullanılmıştır.

Tanenler yapılarına göre iki gruba ayrılır: **i)** Hidrolize edilebilir ve **ii)** kondenze olmuş tanenler.

Tanenler protein ve sindirim enzimleriyle sindirim sürecinde problemlere yaratacak kompleksler oluşturabildikleri için besinsel olarak istenmezler. Ayrıca belirli dozlarda bazı hayvan modellerinde kanserojeneze neden olabileceği kanıtlanmıştır. Bu bileşenler, büyüme hızını engelleyebilir, protein sindirimini yavaşlatabilir. Tanenler patojenik bakterilerin büyümesini engelleme gibi bazı faydalı özelliklere sahiptir; ancak bu etki azot bağlayıcı bakterilere uygulandığında bitkiler ve toprak olumsuz etkilenebilir.

Z. Juranic ve grubu tanen sınıfına ait bir bileşik olan ellarjik asidin birkaç kanser hücre dizisinde ve PBMC'lerin çoğalmasında üzerindeki etkisini incelemiştir. Farklı konsantrasyonlarda (3.1- 50 μ M) kullanılan ellarjik asidin HeLa gibi hızlı bölünen hücre dizilerinin çoğalmasında inhibe ettiği bulunurken, PHA ile uyarılmış ve uyarılmamış PBMC'lerin IC50 her iki grupta da 50 μ M'dan fazla olduğu için ellarjik asidin antiproliferatif etkisine karşı bir direnç gösterdiği görülmüştür. (HeLa hücre dizisinde IC50: 27.4 $\pm$ 2.6) ((Juranic vd., 2001).

Zohara Sternberg ve grubu, bir flavonoid olan luteolin ile luteolin + IFN- β 'dan oluşan bir karışımın multipl skleroz hastalarından alınan PBMC'ler üzerindeki etkisini incelemiştir. Yapılan çalışmada luteolinin PHA ile uyarılan PBMC'ler üzerinde proliferasyonu doza bağlı olarak inhibe ettiği kanıtlanmıştır; çünkü luteolin konsantrasyonu arttıkça inhibisyonunda da artış görülmüştür. Maksimum inhibisyon 50 μ M derişimde olmuştur. Proliferasyonun engellenmesi luteolin + 2 IU IFN- β (international unit, konsantrasyon birimi) kullanıldığında daha fazla olmuştur; ancak luteolin ve kullanılan karışım arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Sternberg vd., 2009).

Farih Saleh ve grubu yeşil çayda bulunan epigallocatechin-3-gallate'ın (EGCG) PHA, anti-CD3, Her-2/neu ve p53 gibi farklı maddelerle uyarılmış, meme kanseri hastalarından alınan PBMC'lerin çoğalmasında ve IFN- γ üretimi üzerindeki etkisini incelemiştir. Geniş bir aralıkta EGCG konsantrasyonu hazırlanmıştır (0.125-50 μ g/ml).

Tüm uyarıcı maddeler ile muamele edilen PBMC'lerin 50µg/ml EGCG tarafından inhibe edildiği bulunmuştur. Proliferasyon timidin alımı ile ölçülmüştür (Saleh vd., 2014).

Sander Hougee ve grubu apigenin, chrysin, luteolin, kersetin ve naringenin gibi flavonoidlerin sağlıklı kişilerden alınan PBMC'ler üzerindeki etkisini incelemiştir. Yapılan çalışmada PBMC'ler bu bileşiklerin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve ardından 16 sa boyunca 10ng/mL LPS ile uyarılmıştır. Metabolik aktivite WST-1 deneyi ile ölçülmüştür. Sonuçta apigenin, chrysin ve luteolinin metabolik aktiviteyi (proliferasyonu) doza bağlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur. IC50 değerleri sırasıyla 8.9 ± 2.2 , 17.8 ± 1.7 and 7.9 ± 4.6 µM'dır. Deneyde kullanılan diğer bileşiklerin 20 µM'ın altında metabolik inhibitör etkileri olmamıştır. Ayrıca apigenin, chrysin ve luteolin monosit/makrofaj popülasyonları üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ancak bu bileşikler T ve B lenfositleri üzerinde inhibitör etki göstermemiştir (Hougee vd., 2005).

Jessica L. di. Gesso ve grubu hesperidin, naringenin, kersetin, epicatechin, cyanidin-3-O-β-glukozid gibi flavonoidlerin, bazı flavonoid metabolitlerinin (protocatechuic asit, (PCA) izovanilik asit acid (IVA), vanilik asit (VA), 4-hidroksibenzoik asit, peonidin-3-glukozid P3G, benzoik asit-glukuronid, BA-sülfat, PCA-3-glukuronid, PCA-4-glukuronid, PCA-3-sülfat, PCA-4-sülfat, IVA-glukuronid, IVA-sülfat, VA-glukuronid, and VA-sülfat) ve bunların THP-1 monositleri üzerindeki kombinasyonlarının antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkilerini incelemiştir. Yapılan çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlarda 24 saat kültürlenmiştir. Ardından WST-1 testi ile metabolik aktivite ölçümü yapılmıştır. Yalnızca kersetin ve naringenin metabolik aktiviteyi 100 µM derişimde azaltmıştır. Diğer bileşikler THP-1 monositleri üzerinde inhibisyon göstermemiştir (Yalamanchili vd., 2015).

Enrico Lugli bir flavonoid olan kersetin sağlıklı PBMC'ler ve CEM, U937, HL-60 gibi insan hücre dizilerindeki etkisini incelemiştir. PBMC'ler PHA ile 72 saat uyarılmış ve PHA ile uyarılmasından 24, 48 saat sonra ortama farklı derişimlerde kersetin ilave edilmiştir. Proliferasyonun engellenmesinin doza ve zamana bağlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca PI hipotonik çözeltisi ile boyama yapılarak kersetinin yukarıdaki

hücre dizilerindeki apoptoz üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Hücreler ‘flow cytometer’ cihazı ile analiz edilmiştir. SEB, anti-CD28 ve IL-2 ile uyarılan PBMC’lerde apoptozda anlamlı bir etki görülmemiştir; çünkü DNA parçalanması gerçekleşmemiştir; bu da kersetinin normal PBMC’ler üzerinde apoptoza neden olmadığı anlamına gelir (Lugli vd., 2009).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyuşmamaktadır. Literatürdeki çalışmalarda eugenol ve flavonoid gibi fenolik bileşikler ekstrakte edilmiş, ekstraksiyondan sonra PBMC’ler üzerindeki etkileri incelenmiştir, sonuçlarda anlamlı bir proliferasyon gözlemlenmezken; yapılan bazı çalışmalar sonucu elde edilen ekstraktlarda proliferasyonun arttığı görülmüştür.

Eric Banan-Mwine Daliri ve grubu tarafından dondurarak kurutma, ısıyla kurutma ve ısıyla kurutulmuş sarımsağın iki bakteri suşu (*Lactobacillus plantarum* KCTC21004 and *Leuconostoc mesenteroides* KCTC13302) tarafından fermentasyonu gibi farklı tekniklerle elde edilen sarımsak ürünleri, hangisinde daha fazla flavonoid bulunduğunu belirlemek üzere test edilmiştir. Sonuçta fermente edilmiş sarımsağın en fazla flavonoid bileşiği içerdiği bulunmuştur. Daha sonra bu ürünün PBMC’ler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Tüm sarımsakla muamele edilen hücrelerde kontrol grubuna göre çok daha iyi proliferasyon gözlenmiştir (Daliri vd., 2019).

Somaya Mateena ve grubu sinnamaldehit ve eugenolün sağlıklı ve ilihaplı romatizması olan kişilerden alınan PBMC’ler üzerindeki etkisini incelemiştir. Eugenol sağlıklı kişilerden alınan PBMC’lerin proliferasyonunu inhibe etmemiştir. Hem sinnamaldehit hem de eugenol, iltihaplı romatizma hastalarından alınan PBMC’lerde doza bağlı olarak TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürdüğü için antiinflamatuvar etki göstermiştir (Mateen vd., 2019).

Thea Magrone ve grubu kırmızı üzüm tohumlarından ekstrakte edilen polifenol bileşiklerinin obez ve sağlıklı kişilerden alınan PBMC’ler üzerindeki etkisini araştırmıştır ve sonuçta 1, 3, 5 μ g kullanılan polifenollerin sağlıklı ve obez kişilerden alınan PBMC’lerin sayısının değişmediği bulunmuştur (Magrone vd., 2017).

Tez çalışmasının bu aşamasında, tannik asidin PBMC'ler üzerindeki etkisi incelenmiştir. PBMC'ler 50µM tannik asit ve üç farklı konsantrasyonda (20, 1250, 20000) kullanılan LPS ile kültürlenmiştir. Tannik asidin 4 farklı zaman noktasında (24, 48, 72 ve 96 saat) PBMC'lerin çoğalması üzerinde anlamlı bir inhibisyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerdir.

4.5 Probiyotiklerin Etkisi Tartışılması

Probiyotikler uygun dozlarda alındığında, konağın sağlığına fayda sağlayan mikroorganizmalardır (Hill vd., 2015). Bu bakterilerin çoğu bağırsakta doğal olarak bulunur. Bağırsaktaki dengeyi koruyarak bağırsağı sağlıklı tutmak için yiyeceklere bazı bakteriler ilave edilir. Probiyotik olarak en sık kullanılan bakteriler laktik asit bakterileridir (LAB). Özellikle *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacteria* cinsleri ve *Saccharomyces boulardii* gibi bazı mayalar sık kullanılır (George vd., 2018). Probiyotikler hayvan modellerinde irritabl bağırsak semptomlarının hafifletilmesi gibi bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan patojenlerin tedavisinde kullanılmıştır (Hungin vd., 2013).

Probiyotikler bağışıklık sistemini geliştirmek için birçok mekanizmaya sahiptir; bu nedenle patojenik bakterilerin büyümesi engellenir. *Lactobacillus rhamnosus* suşu GG ve *L. plantarum* gastrointestinal sistemde enteropatojenik *Escherichia coli*'nin bağlanması engelleyebilir (Kenneth vd., 1988).

Galdeano ve grubu *L. casei* CRL 431 ve *L. paracasei*'nin Toll-benzeri reseptörler (TLR) yoluyla bağırsak epitel hücrelere (BEH) yapışabileceğini bildirmişlerdir (Galdeano vd., 2004). Böylece stimülasyona aracılık edebilir ve ardından IL-6 ve makrofaj kemoatraktan protein-1 gibi interlökin üretiminde BEH'lerden çoğalabilirler. Ek olarak probiyotikler mukus tabakasını güçlendiren Goblet hücrelerinin sayısını artırarak bağırsak epitel bariyerini destekleyebilir (Leblanc vd., 2008). Ayrıca, birçok *Lactobacillus* türünün insan bağırsak hücre dizisinde mukus ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Daniel vd., 2002).

J. Michałkiewicz ve grubu ‘trilac’ olarak adlandırılan 3 laktik asit bakterisi (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*) karışımını sağlıklı donörlerden alınan PBMC’lerin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Probiyotiklerin PBMC’ler üzerinde PHA kaynaklı proliferasyonu orta derecede oluşturduğunu bulmuşlardır. Deneyler farklı PBMC oranlarında yapılmış ve oran 2:1 olduğunda çoğalmanın maksimum seviyede olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, trilac CD+4 T hücresinin proliferasyonunu artırmış, CD4 ve tükenmiş PBMC’ler bakterilere yanıt vermemiştir. (Michałkiewicz vd., 2009).

Verónica Mata-Haro ve grubu; *Bifidobacterium angulatum*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus reuteri* gibi laktik asit bakterilerinin PBMC’lerin proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sadece probiyotiklerle muamele edilen PBMC’lerin proliferasyonunu anlamlı bulmamışlardır. Ancak 72 saat sonra PBMC’lerin 10 µg/mL PHA ve 1:1000 oranında probiyotiklerle uyarılması en proliferatif aktiviteyi göstermiştir. Her üç suş için sonuçlar benzerdir. Ayrıca ‘flow cytometer’ ile T ve B lenfositlerinin bakteriler ve PHA ile uyarılmasına karşı yanıtı incelenmiştir. CD4 ve CD8 proliferasyonu karşılaştırıldığında aralarında hiçbir fark bulunmamıştır (Mata-haro vd., 2014).

Pei-Shan Hsieh ve grubu çeşitli *Lactobacillus* suşlarının (*Lactobacillus salivarius sp*, *salicinius* AP-32, *L. gasseri* AI-88, *L. rhamnosus* CT-53, ve *L. acidophilus* F-1) ve monosit-tükenmiş PBMC’lerin (MD-PBMC’ler, CD14-) immünomodülatör etkisini araştırmıştır. Elde edilen sonuçta bazı suşların bir popülasyonda proliferasyonu başlatırken, diğer popülasyonlar üzerinde hiçbir etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir. Diğer bir suş AP-32’nin CD4+ hücrelerinin çoğalmasında önemli bir artışa neden olduğu bazı popülasyonlar üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. Bu etki hem CD14+ hem de MD-PBMC’lerde görülmüştür. AI-88’in, diğer popülasyonlar üzerinde önemli bir etkisi olmadan CD4+’nın çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür; F-1 CD+ ve MD-PBMC’lerin proliferasyonunu başlatmıştır. Tüm suşların CD14+ popülasyonu üzerindeki proliferatif etkisi PHA ile aynıdır (Hsieh vd., 2013).

Maria A. Johansson ve grubu lactobacilli türevi maddelerin PBMC'lerin çoğalması üzerindeki etkisini araştırmıştır. PBMC'lere CD4+ ve CD8+ hücrelerinin çoğalmasında ve CD8+ ve NK hücrelerinin sitotoksitesinde artışa neden olan *Staphylococcus aureus* + hücresiz süpernatant uygulanmıştır. *S. aureus* uygulanan PBMC'lere *Lactobacillus rhamnosus* GG-CFS veya *Lactobacillus reuteri*-CFS eklenmesi durumunda, lactobacilli-CFS'nin *S. aureus* tarafından indüklenen proliferasyonu ve sitotoksiteyi inhibe ettiği bulunmuştur (Johansson vd., 2016).

Thomas ve grubu *Saccharomyces boulardii*'nin (Sb) insan dendritik hücrelerinin ve T lenfositlerinin çoğalması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada PBMC'ler sağlıklı insanlardan alındıktan sonra saf T ve myeloid dendritik hücreleri izole edilmiştir. *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi (Sb) LPS ile uyarılan dendritik hücrelerin T hücreleriyle (mCD) beraber ve farklı derişimlerde (1:2, 1:8, 1:32) birlikte kültürlenmesiyle ölçülmüştür. Sonuçlar LPS'nin yalnız başına kullanıldığında anlamlı bir proliferatif etkisi olmadığını göstermektedir; mCD'lerle birlikte kültürlen T hücreleri *S. boulardii* yokluğunda güçlü bir proliferasyon göstermiştir. Sb ilavesiyle proliferasyon önemli ölçüde azalmıştır (Thomas vd., 2009).

Sonuçlar, LPS'nin tek başına önemli bir proliferatif etki yaratmadığını göstermektedir; mCD'lerle birlikte kültürlen T hücreleri, SbS yokluğunda güçlü bir proliferasyona neden oldu. SbS ilave proliferasyonu önemli ölçüde azaldı

Clara M. Ausiella ve grubu; *Candida albicans* ve bunun gluko-mannan kompleksi (GMP), sıcak alkali ile ekstrakte edilmiş mannan protein kompleksi (M-alk), alkali çözünmeyen hücre duvarı glukan (GG) ve düşük proteinli mannan bileşeni (M) gibi hücre duvarı fraksiyonunun sağlıklı bireylerden alınan PBMC'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuçlar *Candida albicans*'ın hücrelerin çoğalmasını indüklediğini göstermiştir. Optimal proliferatif etki ise PBMC kültürünün 9.gününde tespit edilmiştir. Hücrelerin çoğalması üzerinde en etkili fraksiyon GMP, ardından M fraksiyondur. GG ve M-alk fraksiyonları etkili bulunmamıştır. Ayrıca *Candida albicans*'ın hücre duvarı fraksiyonlarının, PBMC'ler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. M ve M-alk fraksiyonlarının PBMC-*Candida albicans* ortak kültürünün

neden olduğu proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca M ve M-alk fraksiyonları PHA kaynaklı proliferasyonu engellememiştir (Ausiell vd., 1986).

Eva Sonck ve grubu 7 farklı β -glukanın (*S. cerevisiae*'den alınan glukan, *Euglena gracilis*'den alınan glukan, Macrogard, Zymosan, laminrin, Scleroglukan) PBMC'lerin çoğalması üzerindeki etkini incelemiştir. Hücreler 800 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ ve 5 $\mu\text{g/mL}$ olmak üzere farklı konsantrasyonlarda glukanlar ile uyarılmıştır. 1 $\mu\text{g/mL}$ concanavalin A (ConA) ile uyarılan hücreler pozitif kontrol olarak kabul edilirken, besiyeri içeren hücreler negatif kontrol kabul edilmiştir. Sonuçta Zymosan ve Curdlan'ın 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 800 $\mu\text{g/mL}$ 'de en yüksek proliferatif yanıtı gösterdiği görülmüştür. Laminarin hiçbir konsantrasyonda hücrelerin çoğalmasını indüklememiştir. Scleroglukan 800 $\mu\text{g/mL}$ ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de zayıf bir proliferasyon göstermiş; ayrıca ConA ise PBMC'lerin çoğalmasını sağlamıştır (Sonck vd., 2010).

Reetta Holma ve grubu galaktooligosakkarit tüketiminin bazı probiyotiklerle *Lactobacillus rhamnosus* suşları; GG (ATCC 53103) ve LC705 (DSM7061) *Bifidobacterium breve* Bb99 (DSM 13692) ve *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii* JS (DSM7067) beraber sağlıklı bireylerden alınan PBMC'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Gönüllüler 2 hafta boyunca probiyotik bakterileri günde 65 mL olmak üzere meyve suyu ile almıştır. Daha sonra probiyotikler ve 3.8 g GOS (Galactooligosaccharides) ile hazırlanan meyve suyunu 2 hafta boyunca tüketmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, PHA ile uyarılan ve uyarılmayan PBMC'lerin probiyotik + GOS alımı ile çoğalmasında önemli bir artış görülmüştür (Holma vd., 2011).

Z. Li ve grubu sığır makrofajlarını kullanarak 4 *Saccharomyces cerevisiae* suşunun immünomodülatör etkisini incelemiştir. Bu 4 farklı suşlar ve 2 ölü maya suşundan alınan hücre bileşenleri ve sığır makrofajı hücre dizisi (BOMAC) birlikte kültürlenmiştir. Sonuçta BOMAC canlılığının 6 saat sonra bu suşlar tarafından azaldığı bulunmuştur (Z. Li vd., 2018).

Bu tez çalışmasında *Saccharomyces boulardii*'nin PBMC'lere etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, literatürdeki bazı çalışmalara benzer şekilde *S. Boulardii*'nin hücrelerin canlılığını azaltıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

4.6 Monosodyum Glutamatın Etkisinin Tartışılması

Tatlandırıcılar gıda üretiminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Endüstriyel olarak hazırlanan gıdalar karakteristik lezzetleri nedeniyle tüketiciler için çekicidir. Bu yüzden bu ürünlerle ilgilenen gıda endüstrisinin, umami tat ve lezzet artırıcı sistemleri taşıyan gıda ve gıda bileşenlerinin kullanımına ilgi göstermesi şaşırtıcı değildir. Geleneksel mutfaklarda ve endüstriyel olarak hazırlanan gıdalarda glutamatın önemini gösteren rakamlar verilmiştir. Glutamatın besin alım modelleri bir kültürden diğerine farklılık gösterebilmektedir. Dengeli gıda formülasyonlarının (karbonhidratlar, yağlar, proteinler ve mineraller) giderek artan önemi, uygun aroma dağıtım sistemlerinin geliştirilmesini gerektiren farklı bileşenlerin kullanımına özel zorluklar getirmektedir. Yine de lezzetin artırılması büyük önem taşımaktadır.

Jovic ve grubu MSG'nin B hücrelerinin canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkisini incelemiştir. B hücreleri manyetik hücre ayrışması yoluyla izole edilen PBMC'lerden saflaştırılmıştır. MSG test edilen tüm konsantrasyonlarda (1, 10, 100 mM) apoptozu başlatarak doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe etmiştir. En yüksek etkiyi iste 24 saat kültürden sonra 100 mM MSG'nin gösterdiği bulunmuştur (Jovic vd., 2009).

V. Pavlonic ve grubu MSG'nin farelerden alınan timositler üzerindeki etkisini incelemiştir. Tripan mavisi ile timositler farklı MSG konsantrasyonları ile 24 saat kültürlenmiştir. Hücre canlılığının azaldığı ve MSG'nin neden olduğu sitotoksitenin apoptoz içerip içermediği belirlenmiştir. Analiz 'flow cytometer' ile Annexin V-FITC/Propidium iyodür apoptoz saptama kiti kullanarak yapılmıştır. Sonuçta; kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücrelerde doza bağlı olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca kullanılan tüm konsantrasyonlarda MSG'nin timosit kültürlerinde Bcl-2 proteinin aşağı regülasyonunu indükleyebileceğini ve kültürdeki Bax proteini seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı sonucunu elde etmişlerdir (Pavlovi vd., 2007).

William R. Schelman ve grubu glutamatın nöronal hücre dizisinin ((N1E-115) metabolik aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Hücreler 0.001-10 mM glutamat

ile yaklaşık 20 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar hücre canlılığında doza bağlı bir azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca 1 mM ve 10 mM glutamatın N1E-115 morfolojisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu durumda hücreler büzülme ve artmış nörit retraksiyonu göstermiştir. Ayrıca hücreler şişenin yüzeyine yapışmışlardır. Bu da planlanmış hücre ölümünün bir özelliği olarak kabul edilir. Glutaminin apoptozu indükleyip indüklemeyeceğini belirlemek için Annexin V ile boyama yapılmıştır. Apoptotik hücrelerde doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Buna ek olarak, hücreler 1 mM ve 10 mM glutamat ile kültürlendiğinde Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonlarının seviyelerini incelemişlerdir; bu da Bcl-2 ekspresyonunda azalma, Bax ekspresyonunda ise yükselme ile sonuçlanmıştır. 12 saatlik inkübasyondan sonra tedavi edilen grupta hem Bcl-2 hem de Bax ekspresyon seviyelerinin serumsuz kontrolden farklı olmadığı görülmüştür (Schelman vd., 2004).

Rodrigo Pacheco ve grubu glutamin reseptörünün T hücresi aktivasyonu ve çoğalmasındaki etkisini incelemiştir. Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR) agonistleri olan dihidroksifenilglisikol (DHPG) ve 2-kloro-5-hidroksifenilglisininin (CHPG) etkisini incelemek için insan T hücre dizisi Jurkat J-32'yi kullanmışlardır. Ardından hücrenin antikor ile aktivasyonu ve 96 saatlik uygulaması ile proliferasyon timidin katılımıyla ölçülmüştür. Sonuç olarak; mGlu5R'nin CHPG ile aktivasyonunun hücre çoğalmasında önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. mGlu1R ekspresyonu nedeniyle hücreler seçici olmayan agonist DHPG ile muamele edildiğinde bu inhibitör etki baskılanmıştır. Bu yüzden Glutamat T hücre fonksiyonunda ikili rol oynayabilir; çünkü mGlu5R ile hücre çoğalmasında inhibe eder; ancak mGlu1R ifade edildiğinde bu inhibisyon geri döndürülür (Pacheco vd., 2004).

Voja Pavlovic ve grubu timüs hücrelerinde MSG'nin apoptoz üzerindeki etkisini incelemiştir. Farelere 6 gün boyunca 4 mg/g MSG enjekte edilmiş daha sonra timüs çıkarılıp bir ağ ile hücreler toplanmıştır. Son MSG dozundan sonra 3 farklı zaman noktasında (1, 7, 14) apoptoz ölçülmüştür. MSG uygulamasının zamana bağlı olarak timosit apoptozunda anlamlı şekilde artırdığı ve maksimum artışın 14.günde olduğu bulunmuştur (Voja Pavlovic vd., 2007). Bu sonuçlar farelere 6 gün 4 mg/g MSG enjekte edildiği ve 30, 45 gün MSG'ye maruz kaldıktan sonra timositleri topladıkları bir ağ kullanarak timüslerin çıkarıldığı farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerdir.

Hücreler 72 saat ConA ile uyarılmış, ardından çoğalan hücre nükleer antijeninin (PCNA) flow cytometer ile ölçümünü de içeren proliferasyon deneyi yapılmıştır. Sonuçlar MSG'nin hem 30 gün hem de 45 gün MSG'ye maruz kaldıktan sonra hücre çoğalmasında önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca MSG'nin timosit apoptozu üzerindeki etkisi Annexin-V-FITC/PI kullanarak değerlendirilmiş ve MSG'nin hem 30 gün hem de 45 günde apoptozu indüklediği bulunmuştur. Bu etki timosit apoptozu 45 günde arttığı için zamana bağlı olarak uygulanmıştır. Ayrıca, Bax ve Bcl-2 protein seviyeleri flow cytometer ile ölçüldükçe; sonuçlar Bcl-2 protein seviyesini uygulamadan 30 ve 45 gün sonra azaldığını, Bax protein seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir (V Pavlovic vd., 2006).

Grazia Lombardii glutamatın insan lenfositinin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. PHA gibi farklı mitojenler ve yalnızca anti-CD3 veya anti CD3 + anti-CD28 gibi bazı antikorlarla insan PBMC'leri aktive edilmiştir. Sonuçlarda glutamatın PHA ile uyarılan PBMC'lere uyguladığı inhibisyonun anlamlı olduğu, IC50'nin 2.14 mM olduğu bulunmuştur. Glutamatın uyarılmamış hücrelerin çoğalması üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır; ancak PBMC'lerin çoğalmasını yalnızca anti-CD3 veya anti CD3 + anti-CD28 ile muamele edildiğinde azalma olmuştur. İlginç bir şekilde; glutamat apoptoz veya nekroz yoluyla hücre canlılığını azaltarak antiproliferatif etki göstermemiştir. Glutamatın proliferasyonu inhibe edici etkisi uygulayıp uygulamadığını belirlemek için, glutamatın redoks ve enerji sistemi olan lenfosit proliferasyonu için iki önemli metabolik sistem üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Sonuçlar glutamatın, glutatyonun 2.02 mM glutamin tarafından tükendiği ATP seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermektedir (Lombardi vd., 2004).

Rodrigo Pacheco ve grubu glutamatın mGluR üzerinde etkili olan T hücresi proliferasyonunu modüle ettiğini kanıtlamıştır. Ayrı çalışmalarda farklı kültür koşullarında T lenfositlerle glutamat üretebilen dendritik hücreler birlikte kültürlenmiştir. mGluR'nin spesifik antagonist MPEP tarafından antagonize edildiğinde, proliferasyon artarken, mGlu1T-spesifik antagonist CPCCOEt varlığında T hücresinin proliferasyonunun bozulduğu görülmüştür. Ancak dendritik hücreler glutamin tüketen ajan içeren besiyerinde T lenfositleri ile birlikte kültürlendiğinde antiproliferatif etki görülmüştür. Buna ek olarak, T lenfositinin glutamin içermeyen

besiyerinde dendritik hücreler ile kültürlendiğinde, dendritik hücrelerden glutamat salınımını inhibe eden artan sistin/glutamat antiporter inhibitör AAA konsantrasyonlarını içerdiği ve T hücresi proliferasyonu üzerinde doz inhibe edici etki gözlenmiştir (Pacheco vd., 2020).

Bu tez çalışmasında MSG'nin LPS ile uyarılan PBMC'ler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmaların bazılarına benzer şekildedir. Çalışmamızda MSG'nin hücre canlılığını azalttığı; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

4.7 Koenzim Q10'ın Etkisinin Tartışılması

Ubiquinone geçen yüzyılda izole edilip yapısı aydınlatıldıktan sonra tüm hücrelerde bulunma sebebinden dolayı 'ubiquitous quinone' yani 'her yerde bulunan kinon' adını almıştır. Bu maddenin işlevi mitokondride elektron taşımaktır. Kimyasal olarak CoQ10 (2,3- dimetoksi-5-metil-6-dekapirenill-1,4-benzokinon) vücutta tirozin veya fenilalanin ve mevalonik asitten endojen olarak sentezlenir. İsoprenoid yan zincirine sahip bi benzokinon halkası içerir ve lipitte çözünen biyolojik aktif bir moleküldür.

CoQ10 terimi hem kinon molekül yapısını hem de bileşiğin üzerinde bulunan 10 isopreni ifade etmektedir. Tüm trans poliisoprenoid zinciri hücre zarlarının hidrofobik iç kısmı için afinite sağlarken, quinol'ü geri dönüşümlü indirgeyerek protonları ve elektronları taşıyan bir kinon halkasıdır. CoQ10 bir antioksidandır böylelikle hücrel redoks durumunu kontrol edebilir (Gutierrez-mariscal vd., 2018).

Sastry Gollapudi Koenzim Q'nun PBMC'ler üzerindeki etkisini incelemiştir. H₂O₂ veya rotenon ile uyarılan PBMC'lerde apoptozu engellediği sonucuna varmışlardır. Ayrıca rotenona bağlı apoptozun CD4+ ve CD8+T hücrelerinde ve CD19+ B hücrelerinde inhibe edildiği bulunmuştur. Ayrıca rotenon uygulamasından sonra reaktif oksijen türü (ROS) üretimi ölçülmüştür. Rotenonun ROS üretimini başlattığı; ancak hücrelerin CoQ10 ile ön işleminin ROS üretiminin azalmasına neden olduğu bulunmuştur (Gollapudi vd., 2016).

Haining Li ve grubu CoQ10'in HT22 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini incelemiştir. HT22 hücrelerine rotenon uygulanmasının hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur; hücrelerin CoQ10 ile ön uygulamasında hücre canlılığı önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca kontrol grubu ile kıyaslandığında rotenon ROS üretimini %100 arttırmıştır. Ancak 200 μ M CoQ10 ile ön uygulama, artan ROS seviyesini normal seviyeye düşürür. Rotenonun sitokrom C veya kaspaz-9 üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır; çünkü her iki protein seviyesi de; sitoplazmada kaspaz-9 seviyesinde bir artış olmadığından değişmemiştir. Mitokondride sitokrom C seviyesinde bir azalma olmamıştır (H. Li vd., 2014).

Jafar Naderi ve grubu suda çözünür CoQ10'in HEK293 ve NHF olmak üzere iki farklı insan hücre dizisindeki etkisini incelemiştir. 100 μ M H₂O₂'in her iki hücre dizisinde de apoptoza neden olabileceği, bu etkinin ön işleme tabi tutulmuş hücrelerde inhibe edildiği bulunmuştur. Çünkü CoQ10 Bax ekspresyonunun yukarı regülasyonunu engellemiştir bu da sitokrom C'nin mitokondriden yayılmasını engellemiştir. Bu mitokondride sitokrom C seviyesinin ölçümü ile kanıtlanmıştır. Ayrıca DNA komet testi ile DNA parçalanması incelenmiş ve elde edilen sonuçlar ön işlem uygulanmış hücrede DNA parçalanmasının önleildiği önceki sonuçlarla uyumludur. Ayrıca Annexin V bu sonuçları doğrulamaktadır. ROS seviyeleri CoQ10 ile ön işlem uygulandıktan sonra; ortama H₂O₂ eklendiğinde ölçülmüştür ve 24 saat sonra sonuçlar ROS üretiminin ön işlem görmemiş hücrelerden 6 kat daha az olduğu görülmüştür (Somayajulu-nitu vd., 2006).

Bu tez çalışmasında yüksek konsantrasyonlu CoQ10'nin LPS uygulanmış PBMC'ler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre CoQ10 hücre canlılığını 48 ve 72 saat kültürlenmeden sonra önemli ölçüde azaltmıştır. Konu hakkında literatürde fazla araştırma bulunmamaktadır ancak az sayıdaki mevcut çalışmalar bizim çalışmamızın sonuçlarının aksine CoQ10'nin hücre canlılığını arttığı yönündedir.

Bu çalışma sonucunda tannik asidin PBMC'ler üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği ve bunu CoQ10'nin takip ettiği; ancak D vitamini ve MSG'nin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur. Ayrıca probiyotikler hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. Aynı şekilde CoQ10 farklı bir zaman

noktasında yüksek toksisite göstermiştir. Bu alanda daha önce az çalışma yapılmış ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında D vitamini, tannik asit, MSG, probiyotikler ve CoQ10'in periferik kan mononükleer hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre tannik asit PBMC'ler üzerinde oldukça toksik etki göstermiştir; bu nedenle *Rosa canina* gibi yüksek miktarlarda tanen içeren bitkilerin dikkatli tüketilmesi gerekebilir.

Aynı şekilde probiyotikler de 48 saat sonra önemli ölçüde sitotoksikite göstermiştir. PBMC'ler üzerinde probiyotiklerin neden olduğu inhibitor etki mekanizmasını açıklamak için *Saccharomyces boulardii* dışında başka suş ve cinsler kullanılarak daha fazla çalışma yapılması sonuçlara anlam katacaktır.

Monosodyum glutamat, gıda imalat sanayi iddialarına karşılık gelen anlamlı bir sitotoksik etki göstermemiştir. Çin restoran sendromundan sorumlu olduğu için MSG tüketiminin kontrol edilmesi gereklidir. MSG'nin PBMC'ler üzerine etki mekanizması açıkça belirtilmemiştir, bu nedenle bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılması yararlı olacaktır.

Koenzim Q10 zamana bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Yapılan araştırmaların büyük bir kısmında hayvan modelleri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyon aralığına ulaşmak için daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

D vitamininin bu tez kapsamında kullanılan konsantrasyonlarda PBMC'ler üzerinde sitotoksik etkisi olmamıştır. D vitamininin bu konsantrasyonda hücrelerin çoğalmasını etkileyip etkilemediğini görebilmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Ayrıca bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda tannik asit, *Saccharomyces boulardii* ve koenzim Q10'in PBMC'ler üzerindeki etkisi göz önüne alınarak, immun sistem hücrelerinin inhibe edilmesinin istendiği bazı hastalık durumlarındaki etkilerinin daha ayrıntılı araştırılması tedavide bir seçenek olarak değerlendirilebilmesi açısından önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alcázar-fabra, M., Navas, P., Brea-calvo, G., 2016, Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure, *Biochim Biophys Acta*, 1857, 8, 1073-1078.
- Alexander, C., Rietschel, E. T., 2001, *Invited review Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity*.
- American Academy of Pediatrics Committee on Drugs., 2001, Transfer of Drugs and Other Chemicals Into Human Milk, *Pediatrics*, 108 , 3,776-789.
- Amersfoort, E. S. Van, Berkel, T. J. C. Van, Kuiper, J, 2003, Receptors , Mediators , and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock, 16, 3, 379-414.
- Arnson, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y., 2007, Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations, *Ann, Rheum, Dis*, 66, 9, 1137-1142.
- Ausiell, C. M., Spagnoll, G. C., Boccanera, M., Casalnuovo, I., Malavasi, F., vd., 1986, Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells induced by *Candida albicans* and its cell wall fractions, *J Med Microbiol*, 22, 3, 195-202.
- Awad, A. M., Bradley, M. C., Nag, A., Tsui, H. S., Clarke, C. F., 2018, Coenzyme Q 10 deficiencies : pathways in yeast and humans, *Essays Biochem*, 361-376.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., Wilson, J., M., 1998, The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 16, 9541-9546.
- Barbieri, N., Herrera, M., Scientific, N., Villena, J., Scientific, N., vd., 2018, *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice, *Benef Microbes*, 8, 3, 393-405.
- Bentinger, M., Tekle, M., Dallner, G., 2010, Coenzyme Q – Biosynthesis and functions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 1, 74-79.
- Bischoff-Ferrari, H. A., Can, U., Staehelin, H. B., Platz, A., Henschkowski, J., vd., 2008, Severe vitamin D deficiency in Swiss hip fracture patients, *Bone*, 42, 3, 597-602.
- Bischoff-Ferrari, H. A., Willett, W. C., Wong, J. B., Giovannucci, E., Dietrich, T., vd., 2005, Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials, *JAMA*, 293,18, 2257-2264.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blatt, T., Littarru, G. P., 2011, Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ 10 at skin level, *Biofactors*, 37, 5, 381-385.
- Bode, A.M., Dong, Z., 2009, Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail, *Cancer Prev Res (Phila)*, 2, 6, 514-517.
- Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Victoria, L., Savelkoul, H. F. J., vd., 2014, 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4 + T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells, *J Immunol*, 167, 9, 4974-4980.
- Brot, C., Vestergaard, P., Kolthoff, N., Gram, J., Hermann, A. P., vd., 2001, Vitamin D status and its adequacy in healthy Danish perimenopausal women: relationships to dietary intake, sun exposure and serum parathyroid hormone, *Br J Nutr*, 1, S97-S103
- Cannell, J. J., Vieth, R., Willett, W., Zasloff, M., Hathcock, J. N., vd., 2008, Cod Liver Oil , Vitamin A Toxicity , Frequent Respiratory Infections , and the Vitamin D Deficiency Epidemic, 117, 11, 864-870.
- Canning, M. O., Grotenhuis, K., Wit, H. De, Ruwhof, C., Drexhage, H. A., 2001, 1- α , 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes, *Eur J Endocrinol*, 145, 3, 351-357.
- Castrogiovanni, D., Gaillard, R., C., Giovambattista, A., Spinedi, E., 2008, Neuroendocrine, Metabolic, and Immune Functions during the Acute Phase Response of Inflammatory Stress in Monosodium *L*-Glutamate-Damaged, Hyperadipose Male Rat. *Neuroendocrinology* 88, 227-234.
- Chem. Eng. News., 1978, OSHA issues tentative carcinogen list *Chemical & Engineering News*, 56, 31, 20-22.
- Chlebowski, R. T., Johnson, K. C., Kooperberg, C., Pettinger, M., Wactawski-Wende, J., vd., 2008, Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 22, 1581-1591.
- Clemens, T. L., Adams, J. S., Henderson, S. L., Holick, M. F., 1977, Increased Skin Pigment Reduces the Capacity of Skin to Synthesis Vitamin D3, *Lancet*, 1, 8263, 74-76.
- Conney, A. H., Wang, Z. Y., Ho, C., Yang, C. S., 1992, Inhibitory Effect of Green Tea on Tumorigenesis and Tumor Growth in Mouse Skin, *Cancer Res*, 52, 23, 6657-6665.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Correale, J., Ysraelit, M. C., Gaitán M. I., 2009, Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis, *Brain*, 132 Pt 5, 1146-1160.
- Coran, A. G., Drongowski, R. A., Harmon, C. M., Mattar, A. F., Teirelbaum, D. H., vd., 2002, Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model, *Pediatr Surg Int*, 18(7), 586-590.
- Daliri, EB-M, Kim, S-H, Park, B-J, Kim, H-S, Kim, J-M, vd., 2019, Effects of different processing methods on the antioxidant and immune stimulating abilities of garlic, *Food Sci Nutr*, 7, 1222- 1229.
- Deluca, H. F., Cantorna, M. T., 2001, Vitamin D : its role and uses in immunology , *FASEB J*. 15(14):2579-2585.
- Deshpande, S. S., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K., 1984, Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety, 177, ISBN, 978-1-4684-4792-7.
- Ding, S., Jiang, H., Fang, J. ,2018, Regulation of Immune Function by Polyphenols, *J Immunol Res*, 2018:1264074.
- Dusso, A. S., Brown, A. J., Slatopolsky, E., Adriana, S., Brown, A. J., vd., 2005, Vitamin D, *J Physiol Renal Physiol*, 289(1), 8-28.
- Ehmcke, G., 2014, Das Holz der Eiche – Eigenschaften und Verwendung, 53-64.
- Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., Balakrishnan, A., 2016, Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent, *Phytother Res*, 30(7), 1035-1045.
- Etten, E. Van, Stoffels, K., Gysemans, C., Mathieu, C., Overbergh, L. ,2008, Regulation of vitamin D homeostasis : implications for the immune system, *Nutr Rev*, 66(10 Suppl 2), 125-134.
- Ettinger, G., Macdonald, K., Reid, G., Burton, J. P., 2014, The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health, *Immunol Rev*, 5, 6, 719-28.
- Evrard, B., Coudeyras, S., Dosgilbert, A., Charbonnel, N., Alame, J., vd., 2011, Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, *PLoS One*, 6(4), 1-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Falalyeyeva, T. M., Leschenko, I. V., Beregova, T. V., Lazarenko, L. M., Savchuk, O. M., 2017, Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity, *Fiziol Zh*, 63, 1, 17-25.
- Fan, L., Feng, Y., Chen, G., Qin, L., Fu, C., vd., 2017, Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory markers : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Pharmacological Research*, 119, 128-136.
- Folkers, K., Osterborg, A., Nylander, M., Morita, M., Mellstedt, H., 1997, Activities of Vitamin Q 10 in Animal Models and a Serious Deficiency in Patients with Cancer, *Biochem Biophys Res Commun*, 234, 2, 296-299.
- Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., vd., 1997, Identification of CRAMP , a Cathelin-related Antimicrobial Peptide Expressed in the Embryonic and Adult Mouse, *J Biol Chem*, 272, 20, 13088-13093.
- Galdeano, C. M., Perdigo, G., 2004, Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation, *J Appl Microbiol*, 97, 4, 673-681.
- Gauzzi, M. C., Purificato, C., Donato, K., Jin, Y., Wang, L., vd., 2015, Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis, *J Immunol*, 174, 1, 270-276.
- George, R., Kumar, J., Gouda, S., Park, Y., Shin, H., vd., 2018, Direct Benefaction of probiotics for human health : A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 3, 927-939.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., 2014, Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *nutrients*, 6, 1, 391-415.
- Gollapudi, S., Gupta, S., 2016, Reversal of oxidative stress-induced apoptosis in T and B lymphocytes by Coenzyme Q10 (CoQ10), 5, 2, 41-47.
- Goodier, M. R., Londei, M., 2000, Lipopolysaccharide Stimulates the Proliferation of Human CD56 + CD3 – NK Cells: A Regulatory Role of Monocytes and IL-10, *The Journal of Immunology*, 165, 1, 139-147.
- Gourbeyre, P., Denery, S., Bodinier, M., 2011, impact on the gut immune system and allergic reactions, *J Leukoc Biol*, 89, 5, 685-695.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halpern, B. P., 2018, Glutamate and the flavor of foods, *J Nutr*, 130, 4S Suppl, 910-914.
- Halteren, A. G. S. V., Tysma, O. M., Etten, E. V., Mathieu, C., Roep, B. O., 2004, 1 a , 25-Dihydroxyvitamin D 3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis, *J Autoimmun*, 23, 3, 233-239.
- Hansen, K. E., Jones, A. N., Lindstrom, M. J., Davis, L. A., Engelke, J. A., vd., 2008, Vitamin D insufficiency: Disease or no disease?, *Journal of Bone and Mineral Research*, 23, 7, 1052-1060.
- Hao, Q., Lu, Z., Br, D., Cq, H., Wu, T., 2011, Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections *Cochrane Database Syst Rev*, 7, 9, CD006895.
- He, K., Du, S., Xun, P., Sharma, S., Wang, H., vd., 2011, Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults : China Health and Nutrition Survey (CHNS) *Am J Clin Nutr*, 93, 6, 1328-1336
- Heaney, R. P., 2004, Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 6 Suppl, 1706-1709.
- Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A., Bendich, A., 2003, Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin d, *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 2, 142-146.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., vd., 2015, The International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 8, 506-514.
- Holma, R., Kekkonen, R. A., Hatakka, K., Poussa, T., Vaarala, O., vd., 2011, Consumption of Galactooligosaccharides together with Probiotics Stimulates the In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and IFN γ Production in Healthy Men, *ISRN Immunology*, Article ID 584682.
- Holick, M. F., 2006, High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health, *Mayo Clinic Proceedings*, 81, 3, 353-373.
- Holick, M. F., 2007, Vitamin D Deficiency, *N Engl J Med*, 357, 3, 266-281.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holick, M. F., Siris, E. S., Binkley, N., Beard, M. K., Khan, A., Katz, D., 2014, Prevalence of Vitamin D Inadequacy among Postmenopausal North American Women Receiving Osteoporosis Therapy, *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 6, 3215-3224.
- Hougee, S., Sanders, A., Faber, J., Graus, Y. M. F., Berg, W. B. Van Den, vd., 2005, Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin , luteolin or chrysin , due to selective elimination of monocytes / macrophages, *Biochem Pharmacol*, 69, 2, 241-248.
- Hulse, J. H. (1979). *Polyphenols in cereals and legumes : proceedings of a symposium held during the 36th annual meeting of the Institute of Food Technologists*.
- Husarova, V., Ostatnikova, D., 2013, Monosodium Glutamate Toxic Effects and Their Implications for Human Intake : A Review, Article ID 608765.
- Haslam E., Cai Y., 1994, Plant Polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid Metabolism, *Nat Prod Rep*, 11, 1, 41-66.
- Hsieh, P., An, Y., Tsai, Y., Chen, Y., Chuang, C., vd., 2013, Potential of probiotic strains to modulate the inflammatory responses of epithelial and immune cells in vitro, *New Microbiol*, 36, 2, 167-179.
- Hungin, A. P. S., Mulligan, C., Pot, B., Whorwell, P., Agr, L., 2013, Alimentary Pharmacology and Therapeutics Systematic review : probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice – an evidence- based international guide, *Aliment Pharmacol Ther*, 38, 8, 864-886.
- Iglesias, J., Pazos, M., Torres, J. L., Medina I., 2012, Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol, *Food chemistry*, 134, 4, 1767-1774.
- Jaldetti, M. D., Alman, H. S., 2010, Coenzyme Q10 Decreases TNF- α and IL-2 Secretion by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *J Nutr Sci Vitaminol*, 56, 1, 77-81.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001, *Immunobiology* 5th Edition: Section 33.2 The Immunoglobulin Fold Consists of a Beta-Sandwich Framework with Hypervariable Loops, 91, 884.
- Jäpelt, R. B., Jakobsen, J., 2013, Vitamin D in plants: A review of occurrence, analysis, and biosynthesis, *Frontiers in Plant Science*, 4, 136.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., vd., 2014, Antifungal Activity of Citrus Essential Oils, *J Agric Food Chem*, 62, 14, 3011-3033.
- Jovic, Z. K., Veselinovic, M., Milovanovic, M., Krankenhaus, M., Sarac, M., 2009, Monosodium glutamate induces apoptosis in naive and memory human B cells, *Physiol Res*, 56, 5, 619-626.
- Johansson, M., A., Björkanderö S., Mata, F., M., Qazi K., R., Celades, M., S., vd., 2016, Probiotic Lactobacilli modulate *Staphylococcus aureus*-Induced Activation of Conventional and Unconventional T cells and NK cells, *Front Immunol*, 7,273.
- Jovic, Z. K., Veselinovic, M., Milovanovic, M., Krankenhaus, M., Sarac, M., 2009, Monosodium glutamate induces apoptosis in naive and memory human B cells, *bratisl lek listy* 110, 10, 636-640.
- Juranic, Z., Zizak, Z., Stanojkovic, T. P., Radulovic, S., 2001, Ellagic acid inhibits the proliferation of some human neoplastic cell lines, but does not affect the viability of peripheral blood mononuclear cells, *journal of BUON*, 401-405.
- Kenneth, H., Perini, F., 1988, Role of Competition for Nutrients in Suppression of *Clostridium difficile* by the Colonic Microflora, 56, 10, 2610-2614.
- Khan, N., Andre, C., 2009, Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells, *British Journal of Nutrition* British Journal of Nutrition, 102, 2, 201-206.
- Kingma, S. D. K., Li, N., Sun, F., Valladares, R. B., Neu, J., vd., 2011, *Lactobacillus johnsonii* N6 . 2 Stimulates the Innate Immune Response through Toll-Like Receptor 9 in Caco-2 Cells and Increases Intestinal Crypt Paneth Cell Number in BioBreeding Diabetes-Prone Rats, *J Nutr*, 141, 6, 1023-1028.
- Kirby, K. S., 1960, INDUCTION OF TUMOURS BY TANNIN EXTRACTS, *Br J Cancer*, 14, 1, 147-150.
- Kwon, H., Lee, C., So, J., Chae, C., Hwang, J., vd., 2009, Generation of regulatory dendritic cells and CD4 + Foxp3 + T cells by probiotics administration suppresses immune disorders, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5, 2159-2164.
- Lappe, J. M., Travers-Gustafson, D., Davies, K. M., Recker, R. R., Heaney, R. P., 2008, Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial (*American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 6, 1586-1591.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leblanc, A. D. M. De, Dogi, C. A., Galdeano, C. M., Carmuega, E., Weill, R., vd., 2008, Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity, *BMC Immunol*, 9, 27.
- Lenaz, G, Fato, R., Castelluccio, C., Genova, M. L., Bovina, C., vd., 1993, The function of coenzyme Q in mitochondria, *Clin Investig*, 71, 8 Suppl, 66-S70.
- Lenaz, G., Fato, R., Bernardo, S. Di, Jarreta, D., Costa, vd., 1999, Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes, *Biofactors*, 2-4, 87-93.
- Li, H., Chen, G., Ma, W., Li, P. A., 2014, Water-Soluble Coenzyme Q10 Inhibits Nuclear Translocation of Apoptosis Inducing Factor and Cell Death Caused by Mitochondrial Complex I Inhibition, *Int J Mol Sci*, 15, 8, 13388–13400.
- Li, J., Ying, C., Sung, J., Lee, N., Ni, Y., vd., 2016, Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 9, E1306-E1315.
- Lin, W., Wang, W., Wang, D., Ling, W., 2017, Quercetin protects against atherosclerosis by inhibiting dendritic cell activation, *Mol Nutr Food Res*, 61, 9.
- Li, Z., Kang, H., You, Q., Ossa, F., Quinton, vd., 2018, In vitro bioassessment of the immunomodulatory activity of *Saccharomyces cerevisiae* components using bovine macrophages and *Mycobacterium avium* ssp, *paratuberculosis*, *J. Dairy Sci*, 101, 7, 6271-6286.
- Lombardi, G., Miglio, G., Dianzani, C., Chiocchetti, A., 2004, Glutamate modulation of human lymphocyte growth: In vitro studies, *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 2, 496-502.
- Lin, W., Wang, W., Wang, D., Ling, W., 2017, Quercetin protects against atherosclerosis by inhibiting dendritic cell activation, *Molecular nutrition & food research*, 61, 9.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Wu, K., vd., 2006, Toll-Like Receptor Triggering of vitamin D-mediated human antimicrobial response, *Science*, 311, 5768, 1770-1773.
- Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., Mckinley, A. J., Puddey, I. B., vd., 2008, Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men , *Am J Clin Nutr*, 88, 4, 1018-1025.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Loliger J., 2000, The Use and Utility of Glutamates as Flavoring Agents in Foods Function and Importance of Glutamate for Savory Foods , J Nutr, 130, 4S Suppl, 915S-20S.
- Lugli, E., Ferraresi, R., Roat, E., Troiano, L., Pinti, M., vd., 2009, Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells, Leukemia Research, 33, 1, 140-150.
- Macpherson, G., Austyn, J., 2013, Exploring Immunology: Concepts and Evidence, 5-47.
- Marieb, E., N., Hoehn, K., 2014, Human Anatomy & Physiology, 753-755
- Maeda, S. S., Kunii, I. S., Hayashi, L., Lazaretti-Castro, M., 2007, The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40, 12, 1653-1659.
- Magrone, T., Jirillo, E., Spagnoletta, A., Magrone, M., Russo, M. A., vd., 2017, Immune Profile of Obese People and in Vitro Effects of Red Grape Polyphenols on Peripheral Blood Mononuclear Cells, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 9210862.
- Malabanan, A., Veronikis, I. E., Holick, M. F., 1998, Redefining vitamin D insufficiency, Lancet, 351, 9105, 805-806.
- Martinesi, M., Treves, C., d'Albasio, G., Bagnoli, S., Bonanomi, A. B., vd., 2008, Vitamin D Derivatives Induce Apoptosis and Downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients, Inflamm Bowel Dis, 14, 5, 597-604.
- Maragakis, N. J., Rothstein, J. D., 2015, Glutamate Transporters in Neurologic Disease, Arch Neurol, 58, 3, 365-370.
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F., 2015, Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism : Antimicrobial Properties, Biomed Res Int, 2015:905215.
- Matsuoka, L. Y., Ide, L., Wortsman, J., Maclaughlin, J. A., Holick, M. F., 1987, Sunscreens Suppress Cutaneous Vitamin D3 Synthesis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 64, 6, 1165-1168.
- Mattner, F., Smirolto, S., Galbiati, F., Muller, M., Di, P., vd., 2000, Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1 , 25-dihydroxyvitamin D 3, Eur J Immunol, 302, 498-508.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mcfarland, L. V., 2010, Probiotics and Diarrhea, *Ann Nutr Metab* 57, suppl 1, 10-11.
- Medici, D., Razzaque, M. S., Deluca, S., Rector, T. L., Hou, B., vd., 2008, FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis, *J Cell Biol*, 182, 3, 459-465.
- A., Cecilia, M., Terraf, L., Silvina, M., Tomás, J., vd., 2017, In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*, *Arch Microbiol*, 199, 5, 767-774.
- Mata-haro, V., Reséndiz-sandoval, M., Hernández, J., 2014, In vitro differential modulation of immune response by probiotics in porcine peripheral blood mononuclear cells, *Food and Agricultural Immunology*, 25, 2, 209-219.
- Mateen, S., Rehman, M. T., Shahzad, S., Naeem, S. S., Faizy, A. F., vd., 2019, Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients, *European Journal of Pharmacology*, 852, 14-24.
- Michałkiewicz, J., Krotkiewski, M., Gackowska, L., Dzierżanowska, D., Madaliński, K., vd., 2009, Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria on human peripheral blood mononuclear cells, *Microbial Ecology in Health and Disease* 15, 4, 185-192.
- Nair, R., Maseeh, A., 2012, Vitamin D: The “ sunshine ” vitamin, *J Pharmacol Pharmacother*, 3, 2, 118-126.
- Nakadate, K., Motojima, K., Hirakawa, T., Tanaka-nakadate, S., 2016, Progressive Depletion of Rough Endoplasmic Reticulum in Epithelial Cells of the Small Intestine in Monosodium Glutamate Mice Model of Obesity, *Biomed Res Int*, 2016, 5251738.
- Norman, A. W., 2014, Minireview : Vitamin D Receptor : New Assignments for an Already Busy Receptor, *Endocrinology*, 147, 12, 5542-5548.
- Olivieri, F., Lazzarini, R., Babini, L., Praticchizzo, F., Rita, M., vd., 2013, Free Radical Biology and Medicine Anti-inflammatory effect of ubiquinol-10 on young and senescent endothelial cells via miR-146a modulation, *Free Radic Biol Med*, 63, 410-420.
- Overbergh, L., Decallonne, B., Waer, M., Rutgeerts, O., Valckx, D., vd., 2000, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543), *Diabetes*, 49, 8, 1301-1307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pacheco, R., Oliva, H., Martinez-navío, J. M., Climent, N., Ciruela, F., vd., 2006, Glutamate released by Dendritic cells as a novel modulator of T Cell Activation, *J Immunol* 2006, 177, 10, 6695-6704.
- Papers, J. B. C., Doi, M., Pacheco, R., Ciruela, F., Casado, V., vd., 2004, Group I Metabotropic Glutamate Receptors Mediate a Dual Role of Glutamate in T Cell Activation, *J Biol Chem*, 279, 32, 33352-33358.
- Pavlovi, V. Č., Ceki, S. Č., Koci, G. Č., Sokolovi, D. Č., Živkovi, V. Č., 2007, Effect of Monosodium Glutamate on Apoptosis and Bcl-2 / Bax Protein Level in Rat Thymocyte Culture, *Physiol Res*, 56, 5, 619-626.
- Pavlovic, V., Cekic, S., Sokolovic, D., Djindjic, B., 2006, Modulatory effect of monosodium glutamate on rat thymocyte proliferation and apoptosis, *Bratisl Lek Listy*, 107, 5, 185-191.
- Pavlovic, Voja, Sokolovic, D., Jevtovic-stoimenov, T., 2007, Effect of monosodium glutamate on oxidative stress and apoptosis in rat thymus Effect of monosodium glutamate on oxidative stress and apoptosis in rat thymus, *Mol Cell Biochem*, 303(1-2), 161-166.
- Pelaez, B., Blazquez, J. L., Pastor, F. E., Sanchez, A., Amat, P., 1999, Lectin histochemistry and ultrastructure of microglial response to monosodium glutamate-mediated neurotoxicity in the arcuate nucleus, *Histol Histopathol*, 14, 1, 165-174.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Leone, B. E., Cin, E. D., vd., 2014, Vitamin D 3 Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells, *J Immunol*, 164, 9, 4443-4451.
- Polti, M. A., Perdigón, G., Galdeano, C. M., 2017, Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality, *Benef Microbes*, 9, 1, 153-164.
- Poujol, F., Monneret, G., Pachot, A., Textoris, J., Venet, F., 2015, Altered T lymphocyte proliferation upon lipopolysaccharide challenge ex vivo. *PLoS ONE*, 10, 12, 1–17.
- Quiles, J. L., Farquharson, A. J., Ram, M. C., 2003, Coenzyme Q differentially modulates phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression and free radicals production in malignant and non-malignant prostate cells, *Biofactors*, 18, 1-4, 265-270.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., Blecha, F., 2002, Cathelicidins : microbicidal activity , mechanisms of action , and roles in innate immunity, *Microbes Infect*, 4, 3, 361-372.
- Rostand, S. G., 1997, Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences, *Hypertension*, 30, 2 Pt 1, 150-156.
- Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., Rodella, L. F., 2014, Thymus and aging : morphological , radiological , and functional overview, *Age (Dordr)*, 36, 1, 313-351.
- Rodri, J. C., Santos-oacan, C., Lo, G., 2010, Is coenzyme Q a key factor in aging ?, *Mech Ageing Dev*, 131, 4, 225-235.
- Rusciani, L., Proietti, I., Paradisi, A., Rusciani, A., Guerriero, G., vd., 2007, Recombinant interferon alpha-2b and coenzyme Q10 as a postsurgical adjuvant therapy for melanoma: a 3-year trial with recombinant interferon-alpha and 5-year follow-up, *Melanoma Res*, 17, 3, 177-183.
- Salunkhe, D. K., Jadhav, S. J., Kadam, S. S., Chavan, J. K., Luh, B. S., 2009, Chemical , biochemical , and biological significance of polyphenols in cereals and legumes, *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 17, 3, 277-305.
- Saleh, F., Raghupathy, R., Asfar, S., Oteifa, M., Al-Saleh, N., 2014, Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1, 1-7.
- Saracligil, B., Ozturk, B., Unlu, A., Abusoglu, S., Tekin, G., 2017, The effect of vitamin D on MCF-7 breast cancer cell metabolism, *Bratisl Med J* 2017, 118 , 2, 101-106.
- Schabussova, I., Hufnagl, K., Wild, C., Nutten, S., Zuercher, A. W., vd., 2011, Distinctive anti-allergy properties of two probiotic bacterial strains in a mouse model of allergic poly-sensitization, *Vaccine*, 29, 10, 1981-1990.
- Schelman, W. R., Andres, R. D., Sipe, K. J., Kang, E., Weyhenmeyer, J. A., 2004, Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line, *Brain research. Molecular Brain Research*, 128, 2, 160-169.
- Shah, N. J., Swami, O. C., 2017, ROLE OF PROBIOTICS IN DIABETES: A REVIEW OF THEIR RATIONALE AND EFFICACY, *EMJ Diabet*, 5, 1, 104-110.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shi, Z., Luscombe-marsh, N. D., Wittert, G. A., Yuan, B., Dai, Y., vd., 2010, Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years : findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults British Journal of Nutrition, Br J Nutr, 2010, 104, 3, 457-463.
- Schiavi, E., Barletta, B., Butteroni, C., Corinti, S., Boirivant, M., vd., 2011, Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy, Allergy, 66, 4, 499-508.
- Schildberger A, Rossmanith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V., 2013, Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide, Mediators Inflamm, 2013:697972.
- Sieniawska, E., 2015, Natural Product Communications, Nat Prod Commun, 10(11):1877-1884.
- Singleton, V. L., 1969, Toxicity and Related Physiological Activity of Phenolic Substances of Plant Origin, J. Agric. Food Chem, 17, 3, 497-512.
- Somayajulu-nitu, J. N. M., Mukerji, A., Sharda, P., Sikorska, M., Antonsson, H. B. B., 2006, Water-soluble formulation of Coenzyme Q 10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells, Apoptosis, 11, 8, 1359-1369.
- Sonck, E., Stuyven, E., Goddeeris, B., Cox, E., 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology The effect of β -glucans on porcine leukocytes, Vet Immunol Immunopathol, 135, 3-4, 199-207.
- Sprangers, S., Vries, T. J. De, Everts, V., 2016, Monocyte Heterogeneity : Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells, J Immunol Res, 2016, 1475435.
- Staeva-vieira, T. P., Freedman, L. P., Staeva-vieira, T. P., Freedman, L. P., 2015, 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 Inhibits IFN- γ and IL-4 Levels During In Vitro Polarization of Primary Murine CD4 + T Cells, J Immunol, 168, 3, 1181-1189.
- Sternberg, Z., Chadha, K., Lieberman, A., Drake, A., Hojnacki, D., vd., 2009, Immunomodulatory responses of peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients upon in vitro incubation with the flavonoid luteolin: Additive effects of IFN- β , Journal of Neuroinflammation, 6, 28.
- Stern, R. S., 2005, Vitamin D Induces the Antimicrobial Protein hCAP18 in Human Skin, J Invest Dermatol, 124, 5, 1080-1082.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stio, M., Bonanomi, A. G., ve Treves, C., 2001, Suppressive effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues EB 1089 and KH 1060 on T lymphocyte proliferation in active ulcerative colitis, *Biochemical Pharmacology*, 61, 3, 365-371.
- Stio, M., Martinesi, M., Bruni, S., Treves, C., Bagnoli, S., vd., 2006, Interaction among vitamin D₃ analogue KH 1060, TNF- α , and vitamin D receptor protein in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients, *Int Immunopharmacol*, 6, 7, 1083-1092.
- Stio, M., Treves, C., Martinesi, M., D'Albasio, G., Bagnoli, S., vd., 2004, Effect of anti-TNF therapy and vitamin D derivatives on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells in Crohn's disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 49, 2, 328-335.
- Stolzenberg-Solomon, R. Z., Hayes, R. B., Horst, R. L., Anderson, K. E., Hollis, B. W., vd., 2009, Serum vitamin D and risk of pancreatic cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial, *Cancer Res*, 69, 4, 1439-1447.
- Stolzenberg-Solomon, R. Z., Vieth, R., Azad, A., Pietinen, P., Taylor, P. R., vd., 2006, A prospective nested case-control study of vitamin D status and pancreatic cancer risk in male smokers, *Cancer Res*, 66, 20, 10213-10219.
- Svajger, U., Obermajer, N., Jeras, M., 2009, Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation, *Immunology*, 129, 4, 525-535.
- Tachibana, H., 2011, Green tea polyphenol sensing, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87, 3, 66-80.
- Taub, D. D., Longo, D. L., 2005, Insights into thymic aging and regeneration, *Immunol Rev*, 205, 72-93.
- Thomas, M., K., Lloyd-Jones, D., M., Thadhani, R., I., Shaw, A., C., Dweaskas D., J., vd., 1998, NUMB ER 12 HYPOVITAMINOSIS D IN MEDICAL INPATIENTS, *N Engl J Med*, 338(12), 777-783.
- Thomas, S., Przesdzing, I., Metzke, D., Schmitz, J., Radbruch, A., 2009, *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation, *Clin Exp Immunol*, 156, 1, 78-87.
- Torres, J. S., 2004, NMDA and AMPA Receptor Expression and Cortical Neuronal Death Are Associated With p38 in Glutamate-Induced Excitotoxicity In Vivo, *J Neurosci Res*, 76, 5, 678-687.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Torres, S., Fabersani, E., Marquez, A., Gauffin, P., 2018, Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome, The proactive role of probiotics. *Eur J Nutr*, 58, 1, 27-43.
- Wang, T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., vd., 2014, Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression, *J Immunol*, 173, 5, 2909-2912.
- Vanderpool, C., Yan, F., Polk, D. B., 2008, Mechanisms of Probiotic Action : Implications for Therapeutic Applications in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 11, 1585-1596.
- Veldman, C. M., Cantorna, M. T., Deluca, H. F., 2000, Expression of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptor in the Immune System, *Arch Biochem Biophys*, 374, 2, 334-338.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., vd., 2015, The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models, *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, Cham, CH, Springer, 1-327.
- Yalamanchili, S. K., Hagan, D. O., Kay, C. D., Connell, M. A. O. ,2015, Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- α secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes, *Mol Nutr Food Res*, 59, 6, 1143-1154.
- Yan, F., Polk D. B., 2014, Probiotics and immune health, *Curr Opin Gastroenterol*, 27, 6, 496-501.
- Yan F., Polk D. B., 2010, Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases, *Curr Opin Gastroenterol*, 26, 2, 95-101.
- Yamaguchi, S., 1991, Basic Properties of Umami and Effects on Humans, *Physiol Behav*, 49, 5, 833-841.
- Yang, C. S., Wang, X., 2010, Green Tea and Cancer Prevention, *Nutr Cancer*, 62, 7, 931-937.
- Yousefi, S., Vu, D., Carandang, G., Yamamoto, R., Granger, G., vd., 1989, The Effect of Vitamin D₃ on the Production of Cytotoxic Factors by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Cancer Res*, 49, 18, 5083-5086.
- Zhu, D., Ma, Y., Ding, S., Jiang, H., Fang, J., 2018, Effects of Melatonin on Intestinal Microbiota and Oxidative Stress in Colitis Mice, *Biomed Res Int*, 2018, 2607679.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama – A : Etik Kurul Kararı

20.05.2019 tarih ve 80558721-050.99-E.59984 sayılı Kararına ile araştırmaya etik kurul onayı alınmıştır.



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : 80558721-050.99-E.59984
Konu : 2019 - 33 Karar

20/05/2019

Sayın Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tarafınızdan yürütülmekte olan **“Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması”** başlıklı proje hakkında alınan karar ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.

Doç. Dr. Ertuğrul ÇOLAK
Kurul Başkan Yardımcısı

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır. Evrak doğrulama adresi:
<https://ebysnetm.ogu.edu.tr/Home/Dogrulama/2be1440a-dd52-4526-bcc3-6deedbae5827>

Adres	: Meselik Kampüsü PK:26480 Odunpazarı	Ayrıntılı Bilgi	: Aysun SERTTAŞ - Bilgisayar İşletmeni
Telefon	: 0222 2392979-4690	Faks	: 222 239 37 72
E-Posta	: aserttas@ogu.edu.tr	Elektronik Ağ	: http://klinikarastirmalaretikkurul.ogu.edu.tr/
		KEP Adresi	: esk.osmangaziunirek@hs01.kep.tr



ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

GÖRÜŞ FORMU

Prof.Dr.Nihal DOĞAN
(Başkan)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr.Ertuğrul ÇOLAK
(Başkan Yardımcısı)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyostatistik Anabilim Dalı

Dr.Öğr.Üy.Nilüfer DEMİRİSOY
(Bilgilendirmeden Sorumlu Üye)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Prof.Dr.Hamdi ÇAKLI

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

Prof.Dr.Fezan MUTLU

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyostatistik Anabilim Dalı

Doç.Dr.Coşkun YARAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Anabilim Dalı

Doç.Dr.Nurdan ACAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Acil Tıp Anabilim Dalı

Doç.Dr.Orhan Tansel KORKMAZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr.Semra YİĞİTASLAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Dr.Ecz.Gökçen YAZ GÜZEY

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Sağlık, Uyg. ve Arş Hst. Eczanesi

Doç.Dr.Emre MUMCU

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

**Dr.Öğr.Üy. Nazmiye ÖZENBAŞ
BOYDAĞ**

Anadolu Üniversitesi
Hukuk Fakültesi

Ahmet AKÇAY

Fizik Mühendisi

Ayşe FERT DÖKMECİ

Avukat

Etik Kurul Sekreterliği

Aysun SERTTAŞ
Tel: 0 222 239 29 79 / 4690

13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan İlaç ve Biyoteknik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmeliğin "MADDE 26 - (1) (Değişik:RG-25/6/2014-29041) Etik kurullar gönüllülerin hakları, güvenliği ve esenliğinin korunması amacıyla araştırma ile ilgili diğer konuların yanı sıra gönüllülerin bilgilendirilmesinde kullanılacak yöntem ve belgeler ile bu kişilerden alınacak olurlar hakkında *bilimsel ve etik yönden* değerlendirme yapmak amacıyla, üyelerinin çoğunluğu doktora veya tıpta uzmanlık seviyesinde eğitilmiş sağlık meslek mensubu olan, iyi klinik uygulamaları ve klinik araştırmalar hakkında temel eğitim almış en az yedi ve en çok on beş üyeden oluşurur." ve "MADDE 26 - (4) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, biyoyararlanım-biyoeşdeğerlik çalışmaları dışındaki araştırmaları *bilimsel ve etik yönden* değerlendirmek için kurulur." maddeleri gereği Etik Kurul, çalışmalarını "*bilimsel ve etik yönden*" inceler.

"Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje ile ilgili etik kurulumuzun görüşü aşağıdadır.

Danışman: -

Araştırma Projesinin Yürütücüsü: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı - Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN

Diğer Çalışmacılar: -

11 Nisan 2019 tarihli Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Görüş ve Önerileri:

1. Çalışmanın hipotezi ile bağlantılı olarak sonlanım noktası tekrar yazılmalıdır.
2. Aydınlatılmış Onam Formu anlaşılır, teknik terimleri içermeyecek biçimde tekrar düzenlenmelidir. Onam Formunda alınacak kanla ilgili yapılacaklar ve sonuçlarının nasıl yarar sağlayacağı ifade edilmelidir.
3. Araştırma bütçesi içinde kullanılacak laboratuvar malzemelerinin açıklanması gerekmektedir.
4. Çalışmanın başlığında yer alan "çeşitli doğal bileşenler" ifadesinin netleştirilmesi önerilmektedir.

Çalışmanın uyarılara göre düzenlendikten sonra, başvuru formlarında gerekli görülen düzeltmeler yapıp yeniden başvurulması gerekmektedir.

Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN'ın 06.05.2019 tarihli yazısı

Sorumlu araştırmacı olduğum "Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli projenin Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmesi sonucu istenen düzenlemeler form içerisindeki uygun yerlerde tamamlanmıştır.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

Gerçekleştirilen düzenlemeler:

1. Araştırmanın sonlanım noktası yeniden yazıldı.
2. Aydınlatılmış onam formu tekrar gözden geçirildi.
3. Laboratuvar malzemeleri eklendi.
4. Araştırmanın başlığındaki çeşitli bileşenler netleştirildi.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU**

Karar Tarihi: 09 Mayıs 2019

Karar Sayısı: 10

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN sorumluluğunda yürütülen *“Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması”* başlıklı çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Çalışmanızda başarılar dileriz.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması”
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Eskişehir
	TELEFON	0 222 239 29 79 – Dahili: 4690
	FAKS	0 222 239 37 72
	E-POSTA	etikkurul@ogu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Biyolojik Ürünlerle Yapılan Klinik Araştırma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Nihal DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☒	1. İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi ve Pediatrik Popülasyonda Yürütülen Klinik Araştırmalarda Etik Yaklaşımlara İlişkin Kılavuzdaki tüm hususlara uyulacağına dair Taahhütname 2. Araştırma sırasında gönüllüye veya SGK'ya ek yük getirecek hiçbir işlem uygulanmayacağına dair Taahhütname 3. Araştırmanın daha önce başka bir Etik Kurulda değerlendirilmeye sunulup sunulmadığı ve Etik Kurul onayı almadan çalışmaya başlanmayacağı ile ilgili Taahhütname 4. Literatürler 5. Araştırmaya dahil edilen araştırma merkezleri ve araştırma ekibinde yer alacak araştırmacılar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı - Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN 6. Özgeçmiş Formları		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 10	Tarih: 09.05.2019	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Nihal DOĞAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Nihal DOĞAN	Mikrobiyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Ertuğrul ÇOLAK	Biyoistatistik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Nihal DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Çeşitli Doğal Bileşenlerin Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC) Üzerine Etkisinin Araştırılması"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

Dr.Öğr.Üy.Nilüfer DEMİRİSOY	Tıp Tarihi ve Etik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr. Hamdi ÇAKLI	Kulak Burun Boğaz	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Fezan MUTLU	Biyoistatistik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Coşkun YARAR	Çocuk Sağ. ve Hast.	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Nurdan ACAR	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Orhan Tansel KORKMAZ	Fizyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Semra YİĞİTASLAN	Farmakoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Ecz.Gökçen YAZ GÜZEY	Eczacı	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Sağlık, Uyg. ve Arş Hst. Eczanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Emre MUMCU	Diş Hekimliği	Eskişehir Osmangazi Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Ted. Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üy.Nazmiye ÖZENBAŞ BOYDAĞ	Hukuk	Anadolu Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Ahmet AKÇAY	Fizik Mühendisi	-Atabey Beton Ve Zemin Laboratuvarı Ltd. Şti. -Akçay Ltd. Şti.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Ayşe FERT DÖKMECİ	Avukat	Serbest Avukat	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Nihal DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.