

**ÇEŞİTLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
Caco-2 HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

Sevda ER
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz, 2011

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1102F031



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevda Er'in "Çeşitli Laktik Asit Bakterilerinin Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 29.07.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye (İkinci Danışman)	: Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL
Üye	:Yard.Doç.Dr. BUKET KUNDUHOĞLU
Üye	: Yard. Doç. Dr. EMEL ERGENE
Üye	: Yard. Doç. Dr. MERAL YILMAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**ÇEŞİTLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN Caco-2 HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

Sevda ER
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Doç.Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
2011, 80 sayfa

Son yıllarda yoğun araştırmaların odağında, işlevsel gıdanın bir örneği olan probiyotikler bulunmaktadır. Probiyotikler, bağırsak mikrobiyal dengesinin düzenlenmesiyle konakçıyı yararlı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal besin tamamlayıcılarıdır. Probiyotik mikroorganizmaların büyük çoğunluğu *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. ve *Enterococcus* sp. gibi Laktik Asit Bakterileri (LAB) 'ne aittir. Probiyotik bakterilerin yararları kapsamlı olup, bunlardan bir tanesi de antikanser etkilerinin var olabileceğidir. Göğüs ve mesane kanseriyle ilgili bazı çalışmalar olmasına rağmen, antikanser etkileri üzerindeki çalışmaların büyük çoğunluğu kolorektal kanser ile ilgilidir. Kolon kanseri, batılı ülkelerde kanser morbiditesi ve mortalitesinin en önemli nedenlerinden biridir; ancak probiyotiklerin kolon kanserini nasıl inhibe edebileceğinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda 3 laktik asit bakterisinin (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa*) hücresiz taze filtratlarının ve bu filtratların liyofilize formlarının insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi (tetrazolyum testi) uygulanarak araştırılmıştır. Bu sitotoksik aktiviteyi belirlerken Caco-2 hücreleri üzerine, farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde, hem hücresiz taze filtratı hem de bu filtratların liyofilize formları uygulanmıştır. Yapılan çalışmada uygulanan 3 bakterinin hücresiz taze filtratı ve liyofilize filtratların doza ve zamana bağlı olarak, hücre sayısında farklı etki gösterdiği saptanmıştır. İstatistiksel sonuçlardan elde edilen veriler, *Lactobacillus plantarum* hücresiz taze filtratının en yüksek dozunun (500 µL/mL) 24 saatte, hücre sayısının azaltılmasında en etkili olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Probiyotikler, Laktik asit bakterileri, hücresiz taze filtrat, hücresiz liyofilize filtrat, Caco-2 hücreleri, MTT testi.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CYTOTOXIC EFFECTS OF DIFFERENT LACTIC ACID BACTERIA ON Caco-2 CELL

Sevda ER
Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Associate Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
2011, 80 pages

An example of a functional food, which has been the focus of intense research activity in recent years, is probiotics — ‘live microbial feed supplements which beneficially affect the host animal by improving its intestinal microbial balance’. Most probiotic microorganisms belong to Lactic Acid Bacteria (LAB), such as *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp and *Enterococcus* sp. The list of healthful effects attributed to probiotic bacteria is extensive; one of the these effects is their anticancer effects. The vast majority of studies on the anticancer effects deal with colorectal cancer (CRC), although there are some studies on breast and bladder cancer. Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer morbidity and mortality in western countries. The precise mechanisms by which LAB may inhibit colon cancer are presently unknown.

In this thesis, cytotoxic effects of cell-free filtrate and cell-free lyophilized filtrate of three lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa*) were studied on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) by MTT Assay (tetrazolium assay). To determine this cytotoxic effect, both cell-free filtrate and cell-free lyophilized filtrate were applied on Caco-2 cells at different concentrations and incubation times

In this study, we determined that cell-free filtrate and cell-free lyophilized filtrate of three bacteria exerted different effects on Caco-2 cell viability depending on time and dose-dependent. Data from obtained statistical results revealed that maximum dose of cell-free filtrate of *Lactobacillus plantarum* (500µL/mL) were the most efficient bacteria on Caco-2 cell viability at 24h incubation.

Keywords: Probiotics, Lactic acid bacteria, cell-free filtrate, cell-free lyophilized filtrate, Caco-2 cells, MTT assay.

TEŞEKKÜR

Tezım süresince her an yanımda olan ve de Mikrobiyoloji alanında kendime örnek aldığım, hayranlıkla dinlediğim sayın danışman hocam Prof.Dr. Merih KIVANÇ'a, yine tüm iyi niyeti ve olumlu yaklaşımlarıyla bana destek olan sayın danışman hocam Doç.Dr. A.Tansu KOPARAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar hep değerli fikirleriyle bana yol gösteren Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. A.Yavuz KILIÇ hocama, yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı Sayın Yard.Doç.Dr. Recep Sulhi ÖZKÜTÜK hocama çok teşekkür ediyorum. Ayrıca her zaman beni anlayışla karşılayan ve de bana destek olan İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanım Sayın Prof.Dr. Şeref DEMİRAYAK hocama, yine bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım İstanbul Medipol Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK ve Prof.Dr. Ahmet Zeki ŞENGİL hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Deneyslerimin yapılması aşamalarında göstermiş oldukları yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım Kenan IŞIK, Beklem BOSTANCIOĞLU, Murat KAYA, Emine DİNÇER ve Handan EMİŞOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Tezım süresince bana destek olan sevgili oda arkadaşlarım Nilüfer ULAŞ, İlyas ÖZÇİÇEK ve Neşe AYŞİT'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar bana hep inanan, ne olursa olsun yılmamam gerektiğini her defasında bana hatırlatan ve daima arkamda olan canım annem ve babama, bıkmadan usanmadan beni hep dinleyen ve de alanı olmamasına rağmen, yardım için hep bir çaba gösteren canım ablama ve de canım kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Sevda ER
Temmuz, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Probiyotik Bakteriler ve Önemi	4
1.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	5
1.3 Probiyotik Bakteriler.....	7
1.3.1. Probiyotiklerde aranan özellikler	10
1.3.2. Probiyotiklerin kullanım alanları	12
1.3.3. Probiyotiklerin yararlı etkileri.....	13
1.3.4. Probiyotiklerin terapötik etkileri	15
1.3.5. Probiyotiklerin etki mekanizmaları.....	18
1.3.6. Probiyotiklerin konağın fizyolojisi üzerine etkileri.....	19
1.3.7. LAB karsinojenler üzerine etkisi	20
1.3.8. LAB konağın bağırsak enzimleri üzerine etkisi.....	20
1.3.9. LAB antimutajenik etkileri	21
1.3.10. LAB antitümöral etkileri	21
1.4. Kanser	23

1.4.1. Kolon kanseri	24
1.4.2. Kanser ve diyet.....	26
1.5. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Özellikleri.....	28
1.5.1. Caco-2 hücreleri	28
1.6. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	28
1.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	29
1.7.1. Hücre kültürü yöntemi	29
1.7.2. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi.....	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Kullanılan Mikroorganizma Örnekleri.....	32
2.1.1. Bakteriyel kültürlerin hazırlanması.....	32
2.1.2. Hücesiz taze filtratların hazırlanması.....	32
2.1.3. Hücesiz liyofilize filtratların hazırlanması	33
2.2. Kullanılan Hücreler	33
2.2.1. Caco-2 hücre kültürü.....	33
2.2.2. Caco-2 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması.....	33
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler	35
2.5. Kullanılan Aletler	35
2.6. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	36
2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	36
2.7.1. Hücesiz taze filtratın dozlarının hazırlanması	36
2.7.2. Hücesiz liyofilize filtratın dozlarının hazırlanması.....	36

2.8. Yöntem.....	37
2.8.1. Hücre kültürü	37
2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması	37
2.8.3. MTT ölçümü	38
2.8.4. Mikroskopi	38
2.8.5. Fotoğrafi.....	38
2.8.6. İstatistiki değerlendirme.....	38

3. BULGULAR **39**

3.1 MTT Sonuçları	39
3.2. <i>Pediococcus pentosaceus</i> 'un Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	40
3.2.1 <i>Pediococcus pentosaceus</i> 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	40
3.2.2 <i>Pediococcus pentosaceus</i> 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	42
3.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri.....	43
3.3.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	43
3.3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	44
3.4 <i>Weissella confusa</i> 'nın Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri.....	45
3.4.1 <i>Weissella confusa</i> 'nın hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	45
3.4.2 <i>Weissella confusa</i> 'nın hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	47
3.5 Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi.....	48

3.6 Tezde Kullanılan Bakterilerin Hüresiz Taze Filtratları ve Liyofilize Filtratlarının Karşılaştırılması	53
---	----

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	55
---------------------------------------	-----------

KAYNAKLAR	61
------------------	-----------

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.2.1. <i>Pediococcus pentosaceus</i> 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi.....	38
3.2.2. <i>Pediococcus pentosaceus</i> 'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi....	39
3.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi.....	40
3.3.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi.....	41
3.4.1. <i>Weissella confusa</i> 'nın hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkileri	42
3.4.2. <i>Weissella confusa</i> 'nın hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkileri	43
3.5. P-39 (pasaj 39) Caco-2 hücrelerinin normal morfolojileri.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler.....	9
---	---

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Hams F-12
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1.GİRİŞ

Kullanılan ilaç ve antibiyotikler, canlının sindirim sisteminin mikroflorasındaki dengeyi bozmakta ve sonuçta uzun sürede onarılamayacak birçok rahatsızlığa sebep olmaktadır. Potansiyel patojenler ortamda baskın duruma geldiğinde bağırsak, vajina, böbrek gibi önemli organlarda enfeksiyonların oluşumu hızlanmaktadır. Antibiyotiklere duyarlı olan laktik asit bakterilerinin sayısı tedavi sırasında azalacağından bağırsak reaksiyonu değişir ve sonuçta patojen mikroorganizmalar hâkim duruma geçmektedir. Oysa gerek gelişme faktörü olarak, gerekse hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla antibiyotiklerin yerine organizmadaki metabolik faaliyetleri olumlu yönde etkileyen, destekleyen doğal ürünler olan probiyotikler, bir alternatif olarak kullanılabilir. Böylece intestinal mikroflora stabilitesi sağlanırken, uygun şekilde yönlendirilen olumsuzluk ve sakıncaları teşvik etmeden antibiyotiklerin zararlı etkileri de engellenmiş olur (Kılıç, 2001).

Probiyotikler ağız yoluyla alınan “yaşayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Ljungh ve Wadström, 2006). Birçok probiyotik suşları tanımlanmış, çalışılmış ve ticarileştirilmiştir (Sanders, 1999). Bir probiyotik organizma nonpatojenik ve non-toksik olmalı, ayrıca gastrointestinal bölgede canlılığının sürdürülebilmesi için düşük pH 'ya, safra tuzlarına dirençli olmalıdır (Burns ve Rowland, 2000). Probiyotik bakterilerin yararlı etkilerine laktoz intolerans semptomlarının azaltılması; serum kolesterol redüksiyonu; antikanser aktivite; kabızlığın giderilmesi ve vajina iltihabının hafifletilmesini örnek olarak verebiliriz (Rafter, 2002).

Birçok probiyotik mikroorganizmalar *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. ve *Enterococcus* sp. gibi Laktik Asit Bakterileri (LAB) 'ne aittir (Ljungh ve Wadström, 2006). LAB, hem insan hem de hayvanlarda probiyotik etkileri olan yararlı mikroorganizmalardır (Choi ve ark., 2005). LAB suşları yaygın bir şekilde homolog suşlarına karşı antimikrobiyal maddeler ürettikler. Ayrıca LAB gastrik, bağırsak patojen ve diğer mikroorganizmalarına karşı mikrobisidal maddeler

üretirlerler, ya da hücre yüzeyi ve musin bağlayıcı bölgelere bağlanmak için rekabet ederler (Ljungh ve Wadström, 2006).

Son zamanlarda LAB 'nin belli antikanser özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Probiyotik bakterilerin gösterdiği antikanserojenik veya antimutajenik aktivite, organizmaların gelişmeleri sırasında ürettiği bileşiklerden kaynaklandığı gibi aynı zamanda bu organizmaların prokansinojenleri kanserojenlere çeviren organizmalara karşı gösterdikleri antagonistik etkiyle de açıklanmaktadır. Gıdaları işlemede kullanılan nitritlerin bağırsak sisteminde kanserojen nitrozaminlere dönüştüğü, bazı probiyotik bakterilerin ise bu bileşiklerin sentezini enzimatik yolla yavaşlattığı belirtilmiştir. Metabolizmada bulunan fekal enzimler (azoredüktaz, β -galaktosidaz ve nitroredüktaz) prokanserojenlerin kanserojen maddelere dönüşmesini sağlamakta ve bu yüzden bu enzimler mukoza kanserinin teşhisinde kullanılmaktadır. Probiyotik bakteriler ise fekal enzimlerin aktivitelerini önleyerek kanserojen maddelerin oluşumunu geciktirmektedir (Kılıç, 2001).

İnsan midesi düşük pH 'sı nedeniyle dimetilaminin nitrozasyonu ve dimetilnitrozamin ile birlikte diğer nitrozaminlerin meydana gelmesine uygun bir ortam oluşturmaktadır. Ancak Bifidobakteri 'ler ve Laktobasil 'ler oluşan sekonder amin ve nitritlerin miktarlarını azaltmada da etkili olmaktadır (Özbaş, 1993).

L.acidophilus 'un bağırsak florasının dağılımında ve fekal enzimlerin metabolik aktivitesi üzerinde yararlı etkileri olduğu, böylece intestinal putrifikasyon düzeyini indirgeyerek kolon kanser olasılığını azalttığına işaret edilmektedir. Bifidobakteri 'lerde antitümör aktivitesinin hücre duvarındaki muramilpeptinaz gibi bileşiklerle ilgili olduğu düşünülürken, *L.acidophilus* 'da bu etki iki başlık altında açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan ilki bağırsak sistemindeki kanserojenik bileşiklerin oluşumlarının engellenmesi, diğeri ise kanser oluşumunun baskılanması ya da konakçının bağışıklık özelliklerinin artırılmasıdır (Özbaş, 1993).

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* 'u içeren çeşitli LAB suşlarının hücre duvarının peptidoglukan komponentlerinin antikanser aktiviteleri de değerlendirilmiştir (Choi ve ark., 2005). Bunun yanında *Lactobacillus* kültürlerinin süpernatantlarından elde edilen glikoproteinlerin de antikanser etkiye sahip olduğu bulunmuştur. *L.casei*, *B.longum*, *B.infantis*, *B.adolescentis* ve *B.breve* 'yi içeren pekçok suş, deneysel kolon kanser insidansını baskılamıştır. Ayrıca bir probiyotik bakterinin canlı hücreleri, ısıyla inaktive edilmiş (heat-killed) hücreleri ve hücresiz taze filtratı kolon kanseri tedavisinde kullanıldığında en güçlü inhibisyon, hücresiz taze filtratlarıyla gözlenmiştir (Kim ve ark., 2008).

Göğüs ve mesane kanseriyle ilgili bazı çalışmalar olmasına rağmen, antikanser etkileri üzerindeki çalışmaların büyük çoğunluğu kolorektal kanser ile ilgilidir. Kolon kanseri, batılı ülkelerde kanser morbiditesi ve mortalitesinin en önemli nedenlerinden biridir. LAB'nin kolon kanserini nasıl inhibe edebileceğinin mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir. Ancak içerebileceği bazı mekanizmalar tahmin edilmektedir. Bu mekanizmalar, bağırsak mikroflorasındaki metabolik aktivite değişikliği; kolonda fiziko-kimyasal değişiklik; potansiyel karsinojenlerin bağlanması ve indirgenmesi; bağırsak mikroflorası, varsayılan kanserojen(ler) ve düzenleyicilerin (örn.; safra asidini metabolize edici bakteriler) üretimindeki kalitatif ve/ya da kantitatif değişiklik; antitümorejenik ve antimutajenik bileşiklerin üretimi; konak immün cevabının artması ve konak fizyolojisindeki değişiklikleri içermektedir (Rafter, 2002).

LAB 'nin antikanser etkileri ile ilgili literatürdeki raporlar, *in vitro* çalışmalar, hayvan çalışmaları, epidemiyolojik çalışmalar ve insan diyetleri ile ilgili çalışmalarda yer almaktadır (Rafter, 2003). Çok sayıda rapor LAB 'nin antikanser etkilerinin var olduğunu göstermektedir (Biffi ve ark., 1997; Hirayama ve Rafter, 2000; Rafter, 2002, 2004; Saikali ve ark., 2004; Choi ve ark., 2005).

Laktik asit bakterilerinin ağız yoluyla alınımı ile, sıçanlarda gastrik ve kolonik mukozada kimyasal karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarının etkili bir şekilde azaltıldığı gösterilmiştir. Laktik asit bakterilerinin belli suşlarının, karsinojenler ile preneoplastik lezyonlar ya da tümör indükleyicilerden koruduğu da bulunmuştur (Hirayama ve Rafter, 2000). Mekanistik çalışmalar,

probiyotik bakterilerin ya da bu bakterilerin biyoürünlerinin kolondaki epitelyal hücre kinetiğini etkileyerek kanser hücre proliferasyonunu azalttığını desteklemektedir (Sanders, 1999). Buna ek olarak epidemiyolojik çalışmalar, diyetin kolon kanserlerinin etiolojisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Birçok çalışma kolon kanserinin başlangıç evresinde endojen mikroflorayla olan olumlu ilişkisini onaylamıştır. Bu durumda bağırsak mikroflora değişiminin tümör gelişimini etkileyebileceğini düşünmemiz mantıklıdır. Böylece dikkat, kolon kanserinden korunmak için bağırsak mikroflorasını etkileyebilen diyet tamamlayıcılarına toplanmıştır (Rafter, 2002).

Hücre (doku) kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besi ortamlarında bir süre yaşatılmalarıdır (Özban, 1988). Günümüzde kanser araştırmalarında hücre kültürü önemli bir yer tutmaktadır. Hücre kültürü kullanılarak, kanserli ve normal hücrelerde bazı maddeler denenerek, kanserde bir umut ışığı aranmaktadır (Çevik, 2006). Son yıllarda, kanserde yeni bir umut olabilir düşüncesi ile yoğun araştırmaların odağında probiyotikler bulunmaktadır.

Araştırmada probiyotiklerin işlevsel besin ya da kemoterapide kombine ilaç tedavisinde etken maddesi olarak kullanılabilirdiğinden hareketle, çeşitli laktik asit bakterilerinin hücresiz taze filtratlarının ve bu filtratların liyofilize formlarının Caco-2 hücreleri (insan kolon adenokarsinoma hücreleri) üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

1.1. Probiyotik Bakteriler ve Önemi

Doğumda gastrointestinal bölge steril bir ortamdır. Doğumdan sonra birkaç ay içerisinde nispeten kalıcı bir mikrobiyal populasyon kurulmaktadır. (Fanaro ve ark., 2003; Eckburg ve ark., 2005). Bu kompleks ve dinamik bağırsak florası normal koşullarda, mukozanın ökaryot hücreleri ile simbiyotik bir ilişki halindedir (Eckburg ve ark., 2005; Mahowald ve ark., 2009).

Bağırsak mikroflorası bakteri, mantar ve protozoayı içeren çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bu mikroflora, besinlerin absorpsiyonu, biyoaktif bileşiklerin sentezi, bağırsak bariyer fonksiyonunun arttırılması, hareketlilik, patojenlere direnç ya da immün sistemin modülasyonu gibi metabolik aktiviteleri ve fizyolojik regülasyonu boyunca konağın sağlığının korunmasında anahtar bir rol oynamaktadır (Possemiers ve ark., 2009). Ancak yaş, diyet, temizlik alışkanlığı, enfeksiyon ve antibiyotik tedavisi gibi birçok faktör mikroflora kompozisyonunu değiştirebilmektedir (Iacono ve ark., 2011). Mikrofloranın değişikliği enfekte edici hastalıklar ve kronik inflamasyon (Packey ve Sartor, 2009; Spiller ve Garsed, 2009), metabolik hastalıklar (Cani ve Delzenne, 2009) ya da atopik hastalıklar (Penders ve ark., 2007) gibi bazı direkt ya da indirekt sindirim patolojilerine neden olabilir (Grimoud ve ark., 2010).

Bağırsaklarda bulunan bakterilerden bir grubu da son yıllarda büyük önem kazanan ve probiyotik bakterilerin büyük bir kısmını da içeren laktik asit bakterileridir. LAB geleneksel olarak patojen mikroorganizmalara karşı antagonizm, laktoz intolerans semptomlarının azaltılması, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi ya da immünomodülasyon gibi insan ve hayvan konağı üzerine çeşitli probiyotik etkilerle ilişkilendirilmiştir (Fuller, 1991).

1.2. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Laktik asit bakterileri gram pozitif, endospor oluşturmeyen, karbonhidratı fermende edebilen, asidi tolere edebilen, katalaz negatif, tipik bir şekilde hareketsiz, anaerobik, kok ya da çubuk şeklindeki bakterilerdir (Park ve Rhee, 2001; Iacono ve ark., 2011). LAB, hücre morfolojileri ve glikozun fermantasyonunda kullandığı yola göre sınıflandırılmaktadır (Rivera-Espinoza ve Gallardo-Navarro, 2010).

Bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer

almaktadır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişebilmektedir. Birçok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, oksijen varlığında da gelişebilirler. Bu nedenle aerotolerant anaerob mikroorganizmalar olarak adlandırılırlar (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Matrinko, 2011).

Çoğu, mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5 °C 'nin altında, termofilik türleri ise optimum 45 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4-4,5 pH 'da gelişebilmelerine rağmen 3,2 gibi düşük, 9,6 gibi yüksek pH'larda da gelişebilmektedir. Bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptir.

Fermantasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakterilerde enerji eldesi substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleşmektedir. Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılırlar. Homofermentatif türler glikozdan tamamen laktik asit oluştururken heterofermentatif türler buna ek olarak karbondioksit ve bazı organik asitlerden üretirler. Fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan değerlendirmede *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılır (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madigan ve Matrinko, 2011).

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu nedenle de farklı türlerden gıdaların besin değerinin arttırılmasında ve raf ömrünün uzatılmasında, medikal alanda da intestinal enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolünde, kullanımı son yıllarda giderek önem kazanmıştır (Lewus ve ark., 1991; Gilliland, 1990).

Birçok probiyotik mikroorganizma, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. ve *Enterococcus* sp. gibi LAB 'ne aittir. LAB 'nin en önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium* 'dur (Klein ve ark., 1998).

Birçok probiyotik özelliğe sahip LAB suşu 2 ana ekolojik nişten izole edilmiştir: insan ya da hayvan mukoz membranları (ya da onların feçesleri), günlük ürünler ve günlük olmayan fermente ürünler (Hugas, 1998; Schrezenmeir ve de Vrese, 2001). Ancak, sebze ya da et ürünleri gibi diğer gıda ürünleri de LAB 'nin normal taşıyıcılarıdır (Hugas, 1998).

1.3. Probiyotik Bakteriler

Probiyotik terimi ilk kez Lilley ve Stilwell (1965) tarafından kullanılmış, Metchnikoff'un (1908) çalışmalarından ortaya çıkmıştır. Metchnikoff, Balkan köylülerinin belirgin bir şekilde uzun ömürlü olmasının nedeninin, *Lactobacillus delbrueckii* alt türü *bulgaricus* ile mayalanmış süt tüketmeleri olduğunu ortaya koymuştur (İnal, 1990; Arda ve ark., 1992; Yaman, 2000).

Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez 1974 yılında Parker tarafından kullanılmıştır. Dr. R.Fuller ve Dr. C.B. Cole tarafından "Bağırsaklarda mikrobiyal dengeyi olumlu yönde artırıcı etkileri olan canlı besin kaynağı" olarak tanımlanmıştır (Toklu, 1999). Fuller, probiyotikleri yeniden "konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden canlı mikrobiyal katkı maddeleri" olarak tanımlamıştır. Bu tanımda güçlü bir probiyotik etki için canlı hücre varlığının önemi özellikle vurgulanmaktadır. Huisin't Veld ve Havenaer, bu tanımları genişletmişler ve probiyotik ürünlerin canlı mikroorganizma içermesi gerektiğini ve tüketilmeleri sonucunda ağızda, gastroüregenital kanallarda, üst solunum kanallarında ya da üregenital kanallarda yararlı etkiler yapmak yoluyla konakçının sağlığında iyileşmeye neden olduklarını ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar probiyotikleri insan ya da hayvan tarafından alınan canlı tek ya da karışım mikroorganizma kültürleri olarak tanımlamaktadırlar (Özer, ve Akalın 2000).

Probiyotikler tek başına ya da karışık kültürlerde yeterli miktarlarda alındığında, bağırsağın mikrobiyal dengesini koruyarak ve düzenleyerek konağı yararlı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal gıda tamamlayıcılarıdır (Fuller, 1991; Rafter, 1995; Guarner ve Schaafsma, 1998; Salminen ve ark., 1998b;

Saarela ve ark., 2000; Bengmark, 2001; Anonim, 2001; Isolauri, 2001; Zabala ve ark., 2001a,b; Ouwehand ve ark., 2002; Brown ve Valiere, 2004; Bergonzelli ve ark., 2005; Hoesl ve Altwein, 2005; Lee ve ark., 2008; Orlando ve ark., 2009). Probiyotik olarak en sıklıkla kullanılan bakteriler *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* strainlarıdır (Çizelge.1.). Ancak bu türlerin tüm strainleri, probiyotik olarak kullanmak için uygun değildir. Probiyotik etkiler türe değil suşa özgüdür. Bir probiyotik bakterinin sağlık üzerine yararlı etkisi sadece o suşa aittir (Salminen ve ark., 1998c; Lee ve ark., 2007).

Probiyotiklerin bağırsakta canlı kalabilme özellikleri ve biyolojik aktiviteleri tanımlanmış olup, fermente süt ürünleri ile ya da bir tamamlayıcı olarak alınabilmektedirler (Salminen ve ark., 1998c).

Çizelge.1. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	

Çizelge.1. (Devam) Probiyotik olarak kullanılan bakteriler

<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus pumilis</i>
	<i>Bacillus lentus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Pediococcus pentoseceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus cremoris</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Streptococcus intermedius</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i>
	<i>Bacteriodes juis</i>
	<i>Bacteriodes ruminicola</i>
	<i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i>
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>

1.3.1. Probiyotiklerde aranan özellikler

Probiyotikler fermente gıdalara eklenirken, tüketicinin gastrointestinal bölgesine ulaştığında ürünün uzun süre etkin kalmasını ve aktivitesini etkileyebilen bazı faktörlerin göz önünde bulundurulması önemlidir. Bu faktörler; (1) eklenen probiyotik organizmanın fizyolojik gelişim safhası, (2) tüketim zamanındaki konsantrasyonu (Dave and Shah, 1997; Schillinger, 1999); (3) ürünün saklanması sırasındaki fiziksel koşullar, (4) pH, su aktivitesi; karbon, azot, mineral ve oksijen içeriği, (5) başlangıç kültürleri ile probiyotiklerin etkileşimleri (Trachoo ve ark., 2006).

Probiyotik mikroorganizmaların seçim işleminde koruma, fonksiyonel ve teknolojik özelliklerini içeren birçok durum, göz önünde bulundurulmak zorundadır (Saarela ve ark., 2000).

Seçilen probiyotik suşların önemli özellikleri:

Koruyucu özellikleri:

- İnsanlar için kullanılacak suşların, insan orijinli olması tercih edilmeli,
- Sağlıklı insan gastrointestinal (GI) bölgesinden izole edilmeli (Saarela ve ark., 2000),
- Güvenilir ve noninvazif olmalı (Kaur ve ark., 2002),
- Patojen, karsinojen ve toksik olmamalı (Rafter, 1995; Burns ve Rowland, 2000; Saarela ve ark., 2000; Kaur ve ark., 2002).
- Enfektif endokardit ya da gastrointestinal (GI) hastalıklar gibi hastalıklarla ilişkili bir geçmişe sahip olmamalı,
- Safra tuzlarını dekonjuge etmemeli,
- Aktarılabılır antibiyotik dirençlilik genlerini taşımamalıdır (Saarela ve ark., 2000).

Fonksiyonel özellikleri:

- Düşük pH'ya (Burns ve Rowland, 2000; Saarela ve ark., 2000) ve aside toleranslı olmalı (Burns ve Rowland, 2000; Saarela ve ark., 2000; Cebeci ve Gürakan, 2003; Hoesl ve Altwein, 2005),
- Safraya toleransı olmalı (Salminen ve ark., 1998a; Saarela ve ark., 2000; Chou ve Weimer, 1999),
- İnsan gastrointestinal (GI) bölgesinde epitelyal yüzeylere tutunmalı ve bu bölgede kalıcılık sağlamalı (Valraedas ve ark., 1996; Salminen ve ark., 1998a; Ouwehand ve ark., 1999; Saarela ve ark., 2000; Kaur ve ark., 2002; Hoesl ve Altwein, 2005; Lee ve ark., 2007),
- İmmünostimülasyon olmalı; ancak proinflamatuar etkisi olmamalı (Saarela ve ark., 2000),
- *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile* gibi patojenlere karşı antagonistik etkisi olmalı (Saarela ve ark., 2000; Kaur ve ark., 2002),
- Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip olmalı (Saarela ve ark., 2000),
- Gastrointestinal (GI) bölgede hayatta kalabilmeli (Rafter, 1995; Hoesl ve Altwein, 2005; Lee ve ark., 2007),
- Patojenlere karşı antimikrobiyal maddeler üretmeli (Salminen ve ark., 1998a; Hoesl ve Altwein, 2005; Orlando ve ark., 2009),
- Bağırsakta metabolik olarak aktif kalmalı,
- Patojen gelişimine karşı antagonistik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinleri üretmeli,
- Bulunduğu gıda ürünüde proteoliz, şeker metabolizması ve organik asitler gibi hiçbir biyokimyasal dönüşüm üretmemelidir (Kaur ve ark., 2002).

Teknolojik özellikleri:

- İyi duyuşal özelliğe sahip olmalı,
- Faj dirençlilięi olmalı,
- İşlem süresince canlılığını sürdürebilmeli (Saarela ve ark., 2000),
- Üründe ve stoklama süresince kararlılığını gösterebilmelidir (Saarela ve ark., 2000; Hoesl ve Altwein, 2005),

Bu bakteriler mide ve bağırsak boyunca geçerek canlı kalabilirler ve doğal çevreleri olduğu düşünölen kolonda bakteriyal ekoloji ve metabolizmayı etkilerler (Orlando ve ark., 2009). Ancak, GI bölgenin farklı kısımlarında farklı probiyotik suşlarının canlılığını sürdürmeleri değişkenlik göstermektedir: Bazı suşlar mideden geçişte hızla ölürlen, diğerleri yüksek sayılarda tüm bağırsak boyunca geçiş yapabilirler (Saarela ve ark., 2000).

1.3.2. Probiyotiklerin kullanım alanları

Pekçok gıda ürününde işlevsel besin olarak probiyotiklerin kullanılabilirliği kabul edilmiştir ve insan sağlığı için önemi her yıl giderek artmaktadır. İşlevsel bir gıda olarak en çok kullanılan probiyotik bakteriler, laktik asit bakterileridir (Saikali ve ark., 2004; Moreno ve ark., 2007).

Probiyotiklere genellikle koruyucu olarak bakılmaktadır (Iacono ve ark., 2011). Probiyotikler, yoğun bir şekilde terapötik preparasyonlarda kullanılmakta (Pereira ve Gibson, 2002) ve geleneksel olarak yoğurt ve diğer günlük fermente ürünlere eklenmektedir (Rivera-Espinoza ve Gallardo-Navarro, 2010).

Günümüzde günlük olmayan probiyotik ürünler için tüketicinin isteği artmaktadır ve bunun sonucu olarak bu organizmalar içeceklerle katılmaktadır, aynı zamanda tablet, kapsül ve dondurulup kurutulan preparasyonlarda (örneğin; Multibionta, Enterogermina, Reuterina, UltraLevure, Florastor) tamamlayıcı

olarak pazarlanmaktadır (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001; Rivera-Espinoza ve Gallardo-Navarro, 2007; Rodgers, 2008).

Bu bakterilerin belli suşlarının seçimi ve kontrollü koşullar altında kullanımları, belli gıda ürünlerinin kalite ve stabilitesini geliştirmiştir öyle ki; bu bakteriler peynir, yoğurt, yakult (*Lactobacillus casei* Shirota tarafından üretilen fermente süt benzeri probiyotik bir ürün), tereyağı, krema, lahana turşusu, sosis, silaj ve turşu gibi pekçok fermente gıdaların üretiminde kullanılmaktadır (Park ve Rhee, 2001).

Bu çok yönlülükteki artış ile gıda kurumları probiyotiklerin sunulmasında yoğurt üreticileri ile yarışabilir (Rodgers, 2008). Ayrıca probiyotiklerin gıda enzimleri ve antibiyotikleriyle kombinasyonlarında kullanılacak olması da diğer bir yaklaşımdır (Kaur ve ark., 2002).

1.3.3. Probiyotiklerin yararlı etkileri

Bilimsel bulgular sağlıklı bağırsak florasının, gastrointestinal enfeksiyonlar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve hatta kanseri içeren gastrointestinal hastalıklara karşı koruyabildiğini desteklemektedir (Salminen ve ark., 1998a; Saarela ve ark., 2000). Probiyotik bakteriyal kültürlerin kullanımı, mikroorganizmaların gelişimini stimüle eder, potansiyel olarak zararlı mikroorganizmaları ortadan kaldırır ve vücudun doğal savunma mekanizmalarını güçlendirir (Salminen ve ark., 1998a).

Probiyotik bakteriler bağırsak homeostazisinin kontrolü (Salminen, 1998a; Nemeth ve ark., 2007; Orlando ve ark., 2009), laktoz intolerans semptomlarının hafifletilmesi (Fuller, 1991; Rafter, 1995; Sanders ve Veld, 1999; Lin ve Chang, 2000; Park ve Rhee, 2001; Hoesl ve Altwein, 2005; Iyer ve ark., 2008), immün cevabın düzenlenmesi (Perdigon ve ark., 1988; Fuller, 1991; Rafter, 1995; Salminen ve ark., 1998a; Naidu ve ark., 1999; O'Neil ve ark., 1999; Sanders ve Veld, 1999; Lin ve Chang, 2000; Pereira ve Gibson, 2002; Iyer ve ark., 2008; Lee ve ark., 2008; Liu ve Pan, 2010), serum kolesterol seviyesinin azaltılması (Hepner

ve ark., 1979; Fuller, 1991; Rafter, 1995; Lin ve Chang, 2000; Pereira ve Gibson, 2002; Hoesl ve Altwein, 2005; Iyer ve ark., 2008; Liu ve Pan, 2010), bağırsak hareketliliğinin düzenlenmesi (Rafter, 1995), bağırsak ve gıda kaynaklı patojenleri baskılayabilen antagonistik ortamın oluşturulması (Fuller, 1991; Rafter, 1995; Sanders ve Veld, 1999; Liu ve Pan, 2010), patojenlerle yarışarak yapışma/adezyon bölgelerinin bloklanması (Rafter, 1995; Salminen, 1998a; Nemeth ve ark., 2007), enterotoksinlerin inaktivasyonu (Rafter, 1995), allerji (Sanders ve Veld, 1999), konstipasyon oluşumunun ve vajinit iltihabının rahatlatılması (Rafter, 1995), diyare insidansı ve birçok diğer gastrointestinal hastalıkların riskinin azaltılması (Salminen, 1998a; Lin ve Chang, 2000; Pereira ve Gibson, 2002; Nemeth ve ark., 2007) gibi yararlı etkiler sergilemektedir. LAB hâтта bakteriyoterapi olarak isimlendirilen dental bakımın kontrolünde de kullanılmaktadır (Rodgers, 2008). Ayrıca bu bakterilerin anti-mutajenik (Park ve Rhee, 2001; Liu ve Pan, 2010), antioksidatif (Lin ve Chang, 2000) ve anti-karsinojenik aktiviteye (Rafter, 1995; Sanders ve Veld, 1999; Lin ve Chang, 2000; Park ve Rhee, 2001; Pereira ve Gibson, 2002; Lee ve ark., 2008; Orlando ve ark., 2009; Liu ve Pan, 2010), sahip olduğu desteklenmiş olup, insan bağırsağında bazı hastalıklara neden olan patojenleri inhibe eden bakterisidler gibi antimikrobiyal maddeler ürettiği de bilinmektedir (Rafter, 1995; Parente ve Ricciardi, 1999; Hoesl ve Altwein, 2005; Nemeth ve ark., 2007; Lee ve ark., 2008). Ayrıca bağırsakta laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitler (özellikle laktik ve asetik asitler) nedeniyle pH'nın düşmesi ile bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahiptirler (Rafter, 1995; Shah, 2007).

Probiyotik mikroorganizmaların sağladığı yararlar suşa spesifiktir (Naidu ve ark., 1999; Penner ve ark., 2005; Shah, 2007). Bu nedenle, belli anti-tümör etkilere sahip ve bu etkilere aracılık eden mekanizmalardan sorumlu belli suş ve suş karakterlerinin tanımlanmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Rafter, 2004).

1.3.4. Probiyotiklerin terapötik etkileri

Birçok çalışmada probiyotik bakterilerin bağırsak lümenindeki terapötik etkileri gösterilmiştir. Bu bakteriler birçok gastrointestinal hastalığın önlenmesi ve tedavisinde yararlı etkiler göstererek, kanser riskinin azaltılmasında da umut vaat ederek, hem hayvan hem de insan çalışmalarında geniş ölçüde test edilmiştir (Orlando ve ark., 2009).

Probiyotikler, antibiyotikler ve anti-inflamatuar ilaçlara alternatif olarak gittikçe artan bir ilgi kazanmaktadır. Ancak etki biçimleri henüz yeterince anlaşılammamıştır.

Probiyotiklerin etkileri 3 biçimde sınıflandırılabilir.

- (i) Doğal aynı zamanda sonradan kazanılan immün sistemi içeren konağın savunmasını düzenleyebilir.
- (ii) Komensal ve /ya da patojen mikroorganizmalar üzerine direkt bir etkiye sahip olabilirler.
- (iii) Probiyotik etkiler, toksinler gibi mikrobiyal ürünleri, safra tuzları gibi konağa ait ürünleri ve gıda içeriğini etkileyen olaylara dayanabilir (Oelschlaeger, 2010).

Probiyotiklerin etkileri, etkileme biçimleri farklılık gösterebilir. En çok kanıtlanmış etkileri, vücuda alım sonrası bağırsak florasındaki canlı mikroorganizma sayısındaki değişimleri içermektedir. Bağırsaktaki bakteriyal enzim aktivitesi değişikliği, pH değişimi ya da kolesterol seviyeleri üzerine etkilerinin yanında (Rafter, 1995), ayrıca küçük gruplu pilot çalışmalarda kan basıncının kontrolü (Hata ve ark., 1996) ve solunumla ilgili enfeksiyonların sürecinin kısaltılması üzerine olan etkileri de (Hoesl ve Altwein, 2005) değerlendirilmiştir.

Bir probiyotik mikroorganizmanın günlük minimum tedavi edici dozu yaklaşık olarak 10^8 - 10^9 cfu/mL olarak tavsiye edilmektedir. Etkili olabilmesi için probiyotik ürünün son kullanma tarihine kadar bu kriteri koruması gerekmektedir (Hoesl ve Altwein, 2005). Buna bir örnek olarak *L.acidophilus* 'un belli sayılarda alındığında (10^7 - 10^9 cfu/gün), doğal beslenmenin ötesinde sağlığa yarar sağlayan

probiyotik ya da canlı/yaşayan organizma olarak kullanılabilirdiği ortaya konmuştur (Sanders, 1999).

Probiyotik bakterilerin (örn.; *Bifidobacterium animalis* ve *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota) rotavirüs diyaresinin korunması ve tedavisinde yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Yine, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* (ısıyla inaktive edilmiş *Lactobacillus casei* Shirota 'dan hazırlanan toz) preparasyonlarından, radyasyon enteropatisinin korunmasında yararlanılmıştır. *Lactobacillus acidophilus* ve bazı diğer *Lactobacillus* suşlarının, çocuklardaki akut diyare sürecinin kısaltılması üzerine etkisinin olduğu, ayrıca *Lactobacillus reuteri* 'nin immün sistemin kuvvetlendirilmesinde yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. *Lactobacillus johnsonii* L1 ve *Lactobacillus* GG 'nin ağız yoluyla alımı, bağırsak inflamasyonunun hafifletilmesi ve artan bağırsak geçirgenliğinin ve bağırsak mikroflorasının normal hale dönmesi ile ilişkilendirilmiştir (Salminen ve ark., 1998a).

Son zamanlardaki buluşlarla, *L.rhamnosus* GG ya da *L.reuteri* SD2222 'nin yüksek dozları ile tedavi edilen çocuklardaki akut diyarenin sürecinin belirgin bir şekilde azaldığı (Hoesl ve Altwein, 2005), canlı *L. acidophilus* ve canlı *B. infantis* uygulandığında yenidoğanlarda/ bebeklerde enterokolit riskinin azaldığı (Hoyos, 1999), *S. boulardii* ve *L. rhamnosus* GG sayesinde antibiyotik-ilişkili diyarenin insidans oranının düştüğü (Hoesl ve Altwein, 2005) ve probiyotik kombine ürün ile tedavi aracılığıyla kronik kese oluşumu tekrarında azalmanın olduğu (Gionchetti ve ark., 2000) ortaya konmuştur. Antibiyotik ilaç tedavisi eşliğinde *L. acidophilus* ve *L. johnsonii* gibi probiyotik suşlar, *H. pylori* enfeksiyonunun baskılanmasını, tekrarlama riskinin düşüşünü ya da semptomlarının hafifletilmesini sağlamıştır (Michetti ve ark., 1999; Canducci ve ark., 2000).

Çeşitli *in vitro* ve hayvan çalışmalarından *L.rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14 ve *L. crispatus* CTV-05 olan 3 *Lactobacillus* suşunun ürogenital bölgedeki enfeksiyonlara karşı probiyotik terapötikler olarak kullanılabilmesi için optimal özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Reid, 1999; Osset ve ark., 2001; Reid ve Bruce, 2001; Gardiner ve ark., 2002). *L. rhamnosus* GR-1 ve *L. fermentum* RC-14 'ün etkinliği ve güvenliği birkaç klinik

pilot çalışmada değerlendirilmiştir. 1995'te rastgele seçilen, çift körlü klinik deneyler *L. rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* B-54 (hemen hemen *L. fermentum* RC-14 'e benzer bir suş) 'ün vajinal yolla haftada bir kez uygulandığında üriner sistem enfeksiyon oranlarını belirgin bir şekilde azalttığını (6/yr'den 1.9/yr'ye) göstermiştir (Hoesl ve Altwein, 2005).

Bazı LAB 'nin, sağlığın korunmasında, insan ve hayvanların bağırsaklarında immüno-modulatör olarak bir rol oynayabileceği yapılan bir araştırma ile desteklenmiştir (Naidu, 1999).

Yine yapılan birçok çalışmada probiyotiklerin immün cevabı aktive ettiği gösterilmiştir (Cheon ve ark., 2011). *Lactobacillus* 'un bazı spesifik suşlarının, interlökin IL-1, IL-6 ve IL-12, aynı zamanda antiinflammatuvar sitokin IL-10 gibi proinflammatuvar sitokinleri indükleyebildiği ortaya çıkarılmıştır (Weid ve ark., 2001). Yine *L. plantarum* L-137 'nin ısıyla inaktive edilmiş hücrelerinin farelerde *in vivo* aynı zamanda *in vitro* ortamda tümör gelişimini inhibe etmek için interlökin-12 (IL-12) 'yi indükleyebildiği rapor edilmiştir (Murosaki ve ark., 2000; Liu ve Pan, 2010).

Hayvan modellerinin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda belli probiyotiklerin immün sistemi modüle ettiği gösterilmiştir (Matsuzaki ve Chin, 2000). *B.lactis* (Hoesl ve Altwein, 2005) ve *L. rhamnosus* HN001 (Sheih ve ark., 2001) 'in diyetle alımının doğal immün cevabı arttırdığı ve *L.rhamnosus* GG and *B.lactis* BB- 12 'nin uygulanmasının risk grubundaki yenidoğan çocuklardaki allerjinin insidans oranını azalttığı bulunmuştur (Majamaa ve Isolauri, 1996). Yine *L.acidophilus* SNUL, *L.casei* YIT9092 ve *B.longum* HY8001 'in sitoplazmik fraksiyonunun uygulanmasının bir sonucu olarak *in vitro* tümör hücre proliferasyonunun redüksiyonu ve tümör hücreleri enjekte edilen farelerin hayatta kalma oranının, hücrel immün yanıtın artmasına dayandırılmıştır (Lee ve ark., 2004).

Canlı ya da ısıyla öldürülen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin, aynı zamanda bunların belli hücre komponentlerinin, makrofaj hücre hatlarında hidrojen peroksit, nitrik oksit ve interlökin (IL)-6 gibi sitokinlerin ve tümör nekroz faktör (TNF)- α 'nın üretimini stimüle etme yeteneğinde olduğu ortaya konmuştur (Miettinen ve ark., 1996; Han ve ark., 2005). Yine LAB sitoplazmik

fraksiyonunun Peyer plakları ve lenf düğümü lenfositleri ya da makrofajları stimüle ederek, konak immün sistemi kuvvetlendirdiği rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2002a).

1.3.5. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

LAB 'nin kolon kanserini nasıl inhibe ettiğinin mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir (Shahani ve Ayebo, 1980; Singh ve ark., 1997; Choi ve ark., 2005; Kim ve ark., 2008); ancak olası birkaç mekanizma öne sürülmüştür (Kim ve ark., 2008). Her bir suş, farklı bir etki mekanizmasına sahip olabilmektedir (Rafter, 2003; Paolillo ve ark., 2009). Mekanizmaların tümü farklı şekillerde desteklenmiştir; başlıca *in vitro* ve hayvan deneylerinden orijin almıştır ve hâтта bazıları insan klinik çalışmalarıyla desteklenmiştir. Böylece belli anti-tümör etki ve bu etkilerle aracılı mekanizmalardan sorumlu belli suş ve suş karakterlerinin tanımlanmasında daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (Rafter, 2003).

Probiyotiklerin belli faydalarının arkasındaki mekanizmalar, (a) bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitesindeki değişiklik (Salminen ve ark., 1998a.; Thirabunyanon ve ark., 2009); (b) bağırsak mikroflorasındaki kalitatif ve kantitatif değişiklik (Thirabunyanon ve ark., 2009); (c) kolonda anti-tümörijenik ya da antitümörjenik bileşiklerin üretimi (Singh ve ark., 1997; Thirabunyanon ve ark., 2009); (d) potansiyel karsinojenlere bağlanma ve bunların indirgenmesi (Thirabunyanon ve ark., 2009); (e) konağın immün cevabının artırılması (Singh ve ark., 1997; Rafter, 2003; Saikali ve ark., 2004; Commane ve ark., 2005; Ewaschuk ve ark., 2006; Kim ve ark., 2008); (f) kolondaki fizikokimyasal durumların değişikliği; ve (g) konağın fizyolojisindeki değişikliklerdir (Rafter, 2003; Saikali ve ark., 2004; Commane ve ark., 2005; Ewaschuk ve ark., 2006).

Fermente gıdalarda ve bağırsak mikroflorasının bir bölümünde bulunan LAB 'nin kolon kanserine karşı insanları koruyabileceği defalarca iddia edilmiştir (Wollowski ve ark., 2001; Rafter, 2003, 2004). Bu bakterilerin koruyucu özellikleri, genotoksik karsinojenlere bağlanma (Haskard ve ark., 2001; Knasmüller ve ark., 2001), DNA 'ya zarar veren fekal suya karşı koruma (Burns

ve Rowland, 2004; Klinder ve ark., 2004; Oberreuther-Moschner ve ark., 2004), kolon hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmaları üzerine etkileri (Koller ve ark., 2008), sekonder safra asitlerinin oluşumunun azaltılması (De Boever ve ark., 2000) ve immün sistemle etkileşim (Miettinen ve ark., 1996; Matsuzaki, 1998; Meydani ve Ha, 2000; Rafter, 2002; Schultz ve ark., 2003; Bengmark ve Martindale, 2005) gibi farklı mekanizmalara dayandırılmıştır.

Diğer önemli bir mekanizmanın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonu olabileceği öne sürülmüştür. LAB suşlarının antioksidan özelliklere sahip olduğu ve bağlanmış NADH oksidaz/peroksidaz sistemi, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi birtakım enzimatik mekanizmalar aracılığıyla ROS 'u inaktive ettiği *in vitro* çalışmalardan bilinmektedir (Johnston ve Delwiche, 1965; Chang ve Hassan, 1997; Hertel ve ark., 1998; De Angelis ve Gobbetti, 1999; Lin ve Yen, 1999; Amanatidou ve ark., 2001; Kullisaar ve ark., 2002, 2003; Bruno-Barcena ve ark., 2004); buna ek olarak Mn^{++} aracılığıyla temizleme (scavenging) gibi enzimatik olmayan mekanizmalar da tanımlanmıştır (Archibald ve Fridovich, 1981a, b; Lin ve Yen, 1999).

1.3.6. Probiyotiklerin konağın fizyolojisi üzerine etkisi

Probiyotiklerden *Lactobacillus* ince bağırsakta yer alan baskın türlerden biridir ve bu mikroorganizmalar büyük olasılıkla gastrointestinal bölgenin bu kısmında gerçekleşen metabolik reaksiyonları etkilemektedir (Hirayama ve Rafter, 2000).

Laktik asit bakterilerinin kolonik NADPH-sitokrom P-450 redüktaz aktivitesini ve glutatyon S-transferaz seviyelerini arttırdığı ve hepatik üridin difosfoglukuronil transferaz aktivitesini, sıçanlarda karsinojen metabolizmasına karışan enzimleri azalttığı gösterilmiştir (Hirayama ve Rafter, 2000; Rafter, 2002).

1.3.7. LAB 'nin karsinojenler üzerine etkisi

LAB 'nin prokarsinojen / karsinojenlere bağlanarak bunları baskıladığı ortaya konmuştur (Zabala ve ark., 2001b). Pişirilmiş et karsinojenik heterosiklik aminleri içerir ve insanlarda üriner mutajenite riskini arttırabilir (Naidu ve ark., 1999). Terahara ve arkadaşları heterosiklik amin, LAB etkileşimini araştırdıklarında *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 2038 ve *S.termophilus* 1131 'in hem 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-1) hem de 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(MeIQx)'e bağlandığını ortaya koymuşlardır. (Terahara ve ark., 1998).

1.3.8. LAB 'nin konağın bağırsak enzimleri üzerine etkisi

İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen deneysel kanıtlar, belli LAB suşları ile beslenmenin, karsinojen oluşumu ile ilişkili olan fekal enzimlerin (β -glukuronidaz, azo-redüktaz ve nitroredüktaz) aktivitelerinde değişikliğe neden olabileceğini içermektedir (Biffi ve ark., 1997; Naidu ve ark., 1999; Zabala ve ark., 2001b; Rafter, 2002). Fermente süt ve diğer ürünlerdeki LAB 'nin alımı, kolonda prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştürme yeteneğine sahip olan β -glukuronidase, β -glukosidaz ve nitroredüktaz, 7-alpha-dehidroksilaz ve 7-alpha-dehidrogenaz gibi bağırsak flora enzimlerini etkilediği ortaya konmuştur (Naidu ve ark., 1999; Saarela, 2000; Wollowski ve ark., 2001; Zabala ve ark., 2001b; Rafter, 2003; Ewaschuk ve ark., 2006).

Bakteriyal beta-glukuronidase, nitroredüktaz, azoredüktaz ve steroid 7-alfa-dehidroksilaz aktiviteleri hayvan ve insanlarda yüksek kırmızı et tüketimi ile artmaktadır (Naidu ve ark., 1999; Zabala ve ark., 2001b). Birçok araştırmacı LAB 'nin bu enzimlerin aktivitesini azaltabilme yeteneğini araştırmıştır. Bu enzim aktivitelerinin *L.acidophilus*'un tahıl diyetine eklenmesiyle azaltılabildiği gösterilmiştir (Naidu ve ark., 1999). Yine ilginç bir şekilde kemirgenlerin diyetine LAB tamamlayıcılarının eklenmesinin bazı fekal enzim aktivitesini önemli bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Rafter, 2002).

1.3.9. LAB 'nin antimutajenik etkileri

Kolonik mukoza, bağırsak lümeninden mutajenik bileşikler absorblama yeteneğine sahiptir ve buradan değiştirilmemiş ya da metabolit olan bileşikler kan dolaşımına geçer (Fang ve Strobel, 1978). LAB 'nin bağırsakta mutajenlere basit bir şekilde bağlanarak, mutajen salınımını etkilemesi muhtemeldir (Rafter, 1995, 2002; Naidu ve ark., 1999; Ljungh ve Wadstrom, 2006). Diyetle alınan LAB 'nin nitrozaminleri indirgeyebildiği de gösterilmiştir (Naidu ve ark., 1999; Rafter, 2002).

Yine yapılan *in vitro* çalışmalar LAB 'nin pişirilmiş gıda mutajenlerini absorblama yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda insanlarda yapılan çalışmalar da *L.acidophilus* alınımının, kızartılmış et tüketimi sonrası mutajen salınımını önemli derecede azalttığını göstermiştir (Naidu ve ark., 1999). *L.casei* YIT9018'in, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[2,3-b]indolün mutajenik aktivitesini inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır (Rafter, 1995).

Ayrıca canlı probiyotik bakterileri daha yüksek bir antimutajenik aktivite göstermiştir ve mutajenlerin inhibisyonundaki etkinliği öldürülen bakteriyal hücrelerden daha iyi olmuştur (Naidu ve ark., 1999; Kaur ve ark., 2002). Canlı bakteriyal hücreler mutajenlere kalıcı bir şekilde bağlanmakta ya da inhibe etmektedir; oysaki öldürülen bakteriler dimetil sülfoksit ile ekstraksiyonu sonrası mutajenleri salmaktadır (Naidu ve ark., 1999).

1.3.10. LAB 'nin antitümöral etkileri

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* 'u içeren çeşitli LAB suşlarının peptidoglukanlarının ya da hücre duvarı, membran komponentlerinin antikanser aktiviteleri değerlendirilmiştir. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan elde edilen veriler belli LAB suşlarının alınımının, belli kanser tiplerinin riskini azaltabileceğini ve tümör gelişimini inhibe edebileceğini ortaya koymuştur (Choi ve ark., 2005).

Laboratuvar çalışmalarından elde edilen veriler, *Bifidobacterium longum* kültürlerinin alınımının önemli derecede azoksimetanla (AOM) -indükleniş premalign lezyonları (Singh ve ark., 1997), ornitin dekarboksilaz aktivitesi ve ras-p21 onkoproteininin ekspresyonunu önemli bir şekilde inhibe ettiğini (Rafter, 2004) ve bir gıda mutajeni olan 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinolon (IQ) ile kolon ve karaciğer tümörlerinin indüksiyonunu bloke ettiğini (Reddy ve Rivenson, 1993) göstermiştir.

Laktik asit bakterilerinin oral uygulanmasının, sıçanlarda gastrik ve kolonik mukozada kimyasal karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarlarını etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Arimochi ve ark., 1997; Hirayama ve Rafter, 2000). Laktik asit bakterilerinin belli suşlarının karsinojenler tarafından indüklenen, varsayılan preneoplastik lezyon ya da tümörlerin önlenmesinde de etkili olduğu bulunmuştur (Hirayama ve Rafter, 2000).

Sheil ve arkadaşları *Lactobacillus salivarius* 'un subkutan uygulanmasının bir fare modelinde koliti ve pro-inflamatuvar sitokin üretimini hafiflettiğini göstermiştir. Bu, gelecekte canlı olmayan ve purifiye edilmiş probiyotik bakteriyal bileşenlerin insan hastalıklarının tedavisi için kullanılabileceğini desteklemektedir (Sheil ve ark., 2004).

L. casei, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* ve *B. longum* gibi belli kanser önleyici LAB suşlarının tümünün kemirgenlerde tümör gelişimini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Liu ve Pan, 2010). Yine insan feçesinden izole edilen 2 laktik asit bakteri suşunun da bir tümör hücre hattı üzerine antiproliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Zabala ve ark., 2001a).

Lactobacillus casei, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, ve *Bifidobacterium longum* gibi LAB kemirgenlerde hem implante edilen hem de kimyasal olarak indüklenen tümörlerin gelişimini inhibe etmiştir (Kim ve ark., 2002b).

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* spp. 'nin çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri gösterilmiştir (Biffi ve ark., 1997). Araştırmalar probiyotik suşların, hayvan modellerinde karaciğer, rahim ve meme tümörlerini inhibe ettiğini de göstermiştir (Reddy ve Rivenson, 1993; Lim ve ark., 2002). *Lactobacillus casei* Shirota preparasyonları ile beslenen hastaların

çift kör çalışmalarında Aso ve arkadaşları (1995) rahim tümör yinelenmesinin baskılandığını rapor etmiştir (Iyer ve ark., 2008).

Pool-Zobel ve arkadaşları *L.acidophilus* 'un farklı hücre fraksiyonlarının (sitoplazma, hücre duvarı iskeleti, hücre duvarı) antijenotoksik aktiviteden yoksun olduğunu, oysaki peptidoglukan fraksiyonu ve tüm dondurulmuş-kurutulmuş (liyofilize) hücrelerin antijenotoksik olduğunu ortaya çıkarmıştır (Naidu ve ark., 1999).

Antikanser etkiler üzerine yapılan çalışmalar göğüs ve mesane kanseriyle ilgili olmasına rağmen, büyük çoğunluğu kolorektal kanser ile ilgilidir (Rafter, 2003). Kolorektal kanser Amerika 'yı da içeren batı ülkelerinde, kanser morbidite ve mortalitesinin başlıca sebeplerinden biridir (Parker ve ark., 1996; Liu ve ark., 2011). Kolorektal kanser, dünyada kanser aracılı ölüm oranlarının 4. en sık nedenidir. Yaklaşık olarak 944.000 yeni durum 2000 'de global bir şekilde teşhis edilmiştir/tanımlanmıştır ve tüm yeni kanser durumlarının % 9.2 'sinin nedeni olmuştur. Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya gibi batılı ülkelerde, akciğer ve göğüsten sonra ikinci en yaygın kanserdir. 2000 'de Avrupa'da yaklaşık 363.000 yeni vaka rapor edilmiştir (Alsopp ve Rowland, 2009).

1.4. Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Sağlıklı bir hücrenin bölünmesi kontrol edilebilir. Ancak kanser hücrelerinde durum böyle değildir, bu hücreler kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Bu şekilde hızla çoğalan hücreler tümör adı verilen kitlenin oluşumuna neden olurlar (Bars, 2010).

Kanserin oluşum süreci belirli basamaklarda gelişen, ancak tam olarak anlaşılammış olaylar dizisi olarak ifade edilmektedir. Bu basamakların ilki başlangıç basamağı olup, kanserojen madde hücre DNA dizisinde değişime neden olur. Bu basamak muhtemelen, kanserojeni üreten belirli bir prekürsörün metabolik aktivasyonundan sonra gelişmektedir (Brady ve ark., 2000).

Hücrelerin kaynağına, tipine ve oluştuğu organa göre kanserin çok çeşitli tipleri bulunmaktadır (Barutça, 2006). Kanserler temel yapılarına göre karsinom

(karsinoma) ve sarkom (sarkoma) olarak ikiye ayrılabilir. Karsinomlar vücudu kaplayan deri ile meme, solunum ve sindirim yolları, iç salgı bezleri, üreme organları ve boşaltım sisteminin iç yüzünü döşeyen epitelyum dokudan; sarkomlar ise bağ doku, yağ dokusu, kan damarları, kemik ve kıkırdak gibi dokulardan türemektedir (Raven ve Johnson, 1992).

1.4.1. Kolon Kanseri

İnsan kolonu LAB 'nin de yer aldığı farklı bakteri türlerinden oluşan ve 1×10^{11} canlı bakteri/g 'den daha fazla bakteri içeren kompleks bir mikrobiyal ekosistem olarak tanımlanabilir (Singh ve ark., 1997; Lin ve Chang, 2000; Wollowski ve ark., 2001).

Kolon kanseri gelişmiş ülkelerin büyük çoğunluğunda ciddi bir sağlık problemi olup, kanser mortalitesinin ana nedenlerinden biridir (Ewaschuk ve ark., 2006; Kim ve ark.,2008; Lee ve ark., 2008). Kolonik kriptlerde epitelyal hücrelerin anormal yayılımına yol açan artan hücresel çoğalma, kolon kanseri için yüksek risk taşıdığı bilinen hastalarda bulunmuştur (Singh ve ark., 1997; Brady ve ark., 2000). Preneoplastik yapılar olduğu düşünülen anormal kriptler normal kriptlerle karşılaştırıldığında kıvrımlı bir gelişim modeline sahip olup, normal kriptlerin uzunluğu ve genişliği artmış şekilleridir. Anormal kriptler tek tek ya da gruplar halinde ortaya çıkabilir. Bu anormal kriptler poliplere ve daha sonra bu polipler de tümörlere dönüşmektedir (Brady ve ark., 2000; Çenesiz ve ark., 2004).

Kolon kanseri gelişimi için risk faktörleri hem kalıtsal hem de çevresel faktörleri içermektedir. Kalıtsal faktörler ailesel polipozis, kalıtsal nonpolipozis kolon kanseri, lynch sendromu I ve II ve ülseratif koliti içermektedir. Sanayi bölgesinde yaşam, fiziksel inaktivite, belli kimyasallara maruz kalma, yüksek yağ ve düşük lif tüketimi gibi çevresel faktörler ise, daha büyük öneme sahiptir (Brady ve ark., 2000).

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar kolon kanseri insidansının çevresel faktörlerle, özellikle diyetle, etkilendiğini desteklemektedir (Rafter, 2002; Allsopp ve Rowland, 2009). 2007 Dünya Kanser Araştırma Fonu 'nun yapmış olduğu epidemiyolojik bir çalışmada, aşırı kilo/obezite, işlenmiş et, alkol ile artan kolon

kanseri riski arasında bir ilişki olabileceğini rapor etmiştir. Ayrıca lif, sarımsak, süt ve kalsiyum da azalan risk ile ilişkilendirilmektedir (Allsopp ve Rowland, 2009).

Kolon kanseri ile batılılaştırılmış yaşam biçimiyle özellikle batılı-tarzı diyet arasında bağlantı kurulmuştur (Rafter, 2002; Lee ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar diyetle yüksek miktarda yağ ve protein- düşük miktarda karbonhidrat ve lif alımının kolon kanseri riskini arttırdığını desteklemiştir (Rafter, 2002; Fuller, 1989; Reddy, 1995; Commane ve ark., 2005). Dikkat, diyetle lif alımı ve probiyotiklerin tüketiminin artırılmasıyla, kolon kanser riskinin azalacağı üzerine odaklanmıştır (Lee ve ark., 2007).

Yağlı beslenmenin kolon kanseri için bir risk faktörü olduğu düşünülmüştür ve bu etkinin kolonda safra asitlerinin (primer safra asitleri üzerinde bakteriyel 7 α -dehidroksilaz 'ın etkisi ile üretilen başlıca sekonder safra asitleri) artan seviyeleri ile ilgisi olduğu desteklenmiştir (Rafter, 2002).

In vivo ve moleküler çalışmalardan ortaya çıkan olumlu sonuçlar sayesinde kolon kanserini engellemede probiyotik kullanımı, büyük ilgi kazanmıştır (Liong, 2008). LAB kolonda metabolik, immünolojik ve koruyucu olarak görev alarak kolon karsinogenezisinin geciktirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hayvanlarda LAB alımı, karsinogen-indükleyici preneoplastik lezyon ve tümörlerin korunmasında ortaya konmuştur (Wollowski ve ark., 2001). Birçok kolon kanser hücre hattının proliferasyonu üzerine probiyotiklerin inhibitör etkileri kanıtlanmıştır (Saikali ve ark., 2004; Choi ve ark., 2005; Ewaschuk ve ark., 2006).

LAB 'nin kültürdeki insan kolon kanser hücre hattının (HT-29) gelişimini ve canlılığını belirgin bir şekilde azalttığı ve bu bakterilere yanıtta dipeptidil peptidaz IV ve fırçamsı kenar (brush border) enzimlerinin belirgin bir şekilde arttırıldığı rapor edilmiştir (Hirayama ve Rafter, 2000; Rafter, 2002; Lim ve ark., 2008). Ayrıca *L.acidophilus*'un gecelik kültürleri ve *Bifidobacterium longum*'un özellikle hayvan deneylerinde, deazoksimetan (AOM) tarafından indüklenen, kolon kanserinin öncülü olabileceği düşünülen anormal kriptom oluşum insidansını azalttığı gösterilmiştir (Arimochi ve ark., 1997; McIntosh ve ark., 1999).

L. rhamnosus GG, *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis* ve *B. breve* 'yi içeren pekçok suş, deneysel kolon tümör insidansını baskılamaktadır (Kim ve ark., 2008; Lee ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. longum* ve *Streptococcus thermophilus* 'un HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin canlılığını azalttığı ve apoptozisi indüklediği ortaya konulmuştur (Ewaschuk ve ark., 2006).

1.4.2. Kanser ve Diyet

Daha önceden yapılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, bazı laktik asit bakterileri ya da LAB-içeren fermente gıdaların, tümör hücre gelişimini inhibe edebileceğini göstermiştir (Naidu ve ark., 1999; Verschuere ve ark., 2000; Zabala ve ark., 2001b; Abd El-Gawad ve ark., 2004; Liu ve Pan, 2010). Bu etkiler mutajenik aktivitenin inhibisyonuna, karsinojenlerin, mutajenlerin ya da tümör teşvik edici ajanların oluşumunu olumsuz yönde etkileyen birçok enzimin azalmasına, tümörlerin baskılanmasına, diyetin kanserle ilişkili epidemiyolojisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Naudi ve ark., 1999).

Fermente süt eldesinde kullanılan belli LAB suşları, antimutajenik ve antikarsinojenik etki için gelecek vaatetmektedir (Naudi ve ark., 1999). Fermente günlük ya da günlük olmayan ürünlerden izole edilen laktik asit bakteri suşları (*Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. plantarum* gibi *Lactobacillus* türleri, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* gibi *Lactococcus* türleri, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Pediococcus* türleri, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp.) *in vitro* antimutajenik ve antikarsinojenik özellikler sergilemiştir (Rafter, 1995; Saarela ve ark., 2000; Park ve Rhee,2001).

20.yy.'ın başlangıcında Rus Nobel ödülü sahibi Élie Metchnikoff yüksek miktarlarda fermente süt ürünlerini tüketen Bulgar insanlarında yüksek bir yaşam kalitesi gözlemiştir (Wollowski ve ark., 2001). Ayrıca yapılan diğer araştırmalar

laktik asit bakterileri içeren fermente sütün günlük alımının, konağın bağırsak mikroekolojisini değiştirdiğini göstermiştir. *Lactobacillus acidophilus* içeren fermente süt tüketiminin, fekal pütreaktif bakteri sayısını belirgin bir şekilde azalttığı ve bağırsaktaki laktobasil seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Rafter, 1995, 2002). Yine bir gıda tamamlayıcısı olan *L.acidophilus* 'un, tümör promotörleri ve varsayılan prekarsinojenlerin üretimine karışması muhtemel olan putreaktif organizmaları durdurarak bağırsak mikroekolojisi üzerine yararlı bir etkiye sahip olduğu desteklenmektedir (Rafter, 1995).

Kültüre edilmiş günlük ürünlerle yapılan diyetin, kolon kanserinin de yer aldığı pek çok kanser tipinin gelişimini inhibe edebileceği hakkında mevcut kanıtlar bulunmaktadır (Biffi ve ark., 1997). Laktik asit bakterileri içeren fermente süt ya da kültürlerle beslenmenin, fareye enjekte edilen tümör hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hirayama ve Rafter, 2000). *L.acidophilus* ve *L.bulgaricus* ve / ya da *L.casei* içeren kültür ya da fermente sütle beslenmenin, farelerde Ehrlich asit tümör hücre gelişimini inhibe ettiği ya da sarcoma 180 gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (Rafter, 1995).

Birçok epidemiyolojik çalışma fermente günlük ürünlerle kolon kanseri arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Hirayama ve Rafter, 2000). *Lactobacillus* ya da *Bifidobacterium* içeren yoğurt ve fermente süt ürünlerinin yüksek miktarlarda tüketimi, kolon kanserinin düşük insidansıyla ilişkilendirilebilmektedir (Hirayama ve Rafter, 2000; Rafter, 2004). Finlandiya 'da yapılan epidemiyolojik bir çalışmada yüksek yağ alımına rağmen, süt, yoğurt ve diğer günlük ürünlerinin yüksek tüketimi nedeniyle, kolon kanser insidansının diğer ülkelerden daha düşük olduğu gösterilmiştir (Biffi ve ark., 1997; Rafter, 2002; Rafter, 2004).

Fermente sütle beslenme, kimyasal olarak kolon kanserine indüklenen sıçanların hayatta kalma oranını arttırmaktadır (Hirayama ve Rafter, 2000). *B.longum* 'un liyofilize kültürüyle diyet uygulaması, kolon tümör insidansında ve tümör çeşitliliğinde belirgin bir baskılanmaya ve AOM'la indüklenen sıçanlarda tümör hacminde de azalmaya neden olmuştur (Singh ve ark., 1997).

Ayrıca kadınlardaki göğüs kanseri ile yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinin tüketimi arasında yoğun bir ilişki olduğundan da bahsedilmektedir (Van't Veer ve ark., 1989). Bazı epidemiyolojik çalışmalar fermente süt ürünlerini tüketen kadınlarda göğüs kanseri riskinin azaldığını da göstermiştir (Van't Veer ve ark., 1989; Naidu ve ark., 1999). *B.infantis*, *B.bifidum*, *B.animalis*, *Lactobacillus acidophilus* ve *L.paracasei* içeren fermente süt, MCF7 göğüs kanser hücre hattının gelişimini inhibe etmiştir. (Biffi ve ark., 1997; Liu ve Pan, 2010).

1.5. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Özellikleri

1.5.1. Caco-2 hücreleri

Caco-2 hücreleri 72 yaşında Kafkas ırkına mensup bir erkek bağırsağından izole edilmiştir. Bu hücreler kolon adenokarsinoma epitel hücreleri olup, kültürde hem yapısal hem de fonksiyonel olarak, olgun enterositlere benzer hücrelere kendiliğinden farklılaşmaktadırlar. Hücrelerin grup oluşturup farklılaşabilmesi için 21 günlük bir sürece ihtiyaç olduğu (Briske-Anderson ve ark., 1997; Mariadason ve ark., 2000); kültür koşulları ve pasaj numarasının bu sürecin uzunluğunu etkileyebildiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Kam ve ark., 1990).

1.6. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Daha evvel, et ürünlerinde yapılan bir çalışmada izole edilen ve tanımlanan *Pediococcus pentosaceus* 48.P3.3, *Lactobacillus plantarum* 154.P7.2 ve *Weissella confusa* 163.P5.8 bakterileri bu çalışmada kullanılmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan stok kültürler MRS (*Lactobacillus* besiyeri acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE) sıvı besiyerinde 35 °C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda geliştirilerek çalışmada kullanılmıştır.

1.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

1.7.1. Hücre kültürü yöntemi

Hücre (doku) kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların, gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besi ortamlarında bir süre yaşatılmalarıdır (Özban, 1988). Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi, yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamakta ve kökeni 1885 yılına kadar dayanmaktadır (Langdon, 2004). İlk olarak 1885'te Roux, embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir (Saltan, 2009). 1910–1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde büyük adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve gerçek anlamda ilk doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1926 yılında çalışmalar hücre üretme vasatları üzerine yoğunlaşmış ve analitik yöntemlerle hücre kültür vasatları hazırlanmıştır. 1952 'de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü vasatları hazırlanmıştır.

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri üç grupta toplanmaktadır (Özdemir, 2007):

1. Primer kültür (öncül kültür): Bir organizmadan cerrahi yöntemlerle ayrılmış olan organ, doku ve hücreler uygun bir kültür ortamına konulduklarında, burada yüzeye bağlanmakta ve bölünerek çoğalmaktadırlar. Bu “primer kültür” olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler canlı doku parçalarından gelen ve kültür kabının yüzeyine ilk yapışan hücrelerdir (Jakoby ve Pastan, 1979).

2. Sekonder kültür (ikincil kültür): Öncül kültür sonucu elde edilen hücrelerin enzimatik yollarla başka bir ortama aktarılması ile elde edilen hücrelerin oluşturduğu kültürdür (Özban, 1988).

3. Sürekli kültür hücresi: *In vitro* şartlarda sürekli büyüyen kültür hücre tipidir. Sürekli kültür hücrelerine, cell line (hücre hattı) veya cell strain adı verilmektedir (Freshney, 1994).

Hücre kültürü, yaşam bilimlerinin pek çok alanı için vazgeçilmez bir teknoloji haline gelmiştir. Kökleri gelişimsel biyoloji ve patolojiye dayanmasına rağmen, hücre kültürü günümüzde moleküler genetikçiler, immunologlar, cerrahlar, biyomühendisler ve ilaç üreticileri için önemli bir araç haline gelmiştir (Bars, 2010).

Hücre kültürü yöntemiyle etkiler doğrudan doğruya olduğundan, sonuç kısa sürede alınabilmekte, istatistik olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılmayacak kadar fazla hücre kullanılabilen ve çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesi önlenmektedir (Barutça, 2006).

1.7.2. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi

Sitotoksosite deneyleri *in vitro* olarak toksikoloji çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Bars, 2010). *In vitro* sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre poliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Barutça, 2006).

Sitotoksitenin *in vitro* olarak belirlenebilmesi için bir takım deneyler geliştirilmiştir (Bars, 2010). Bu yöntemlere örnek olarak neutral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücre metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testi (hücre lizisini belirlemek için)'ni verebiliriz (Barutça, 2006).

MTT testi, ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve genellikle hücre poliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılan bir yöntemdir. MTT (3-

[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue), sarı renkli olup hücelere aktif olarak absorbe olur ve kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücelerin kantitasyonunu sağlar (Griffiths ve Doyle, 1998; Freshney, 2005). Tetrazolium halkasının mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT suda çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile suda çözünebilir hâle getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir. Tetrazolium tuzunun, sadece metabolik aktivitesi olan hüceler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hüceleri saptar (Freshney, 2005; Oktar, 2009).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Mikroorganizma Örnekleri

Et ürünlerinde yapılan bir çalışmada izole edilen ve tanımlanan *Pediococcus pentosaceus* 48.P3.3, *Lactobacillus plantarum* 154.P7.2 ve *Weissella confusa* 163.P5.8 bakterileri bu çalışmada kullanılmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan stok kültürler MRS (*Lactobacillus* besiyeri acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE) sıvı besiyerinde 35 °C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda geliştirilerek aktive edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

2.1.1. Bakteriyal kültürlerin hazırlanması

Bakteriler 24-48 saat süre ile 10 mL MRS broth ortamında 35 °C de anaerobik koşullarda geliştirilmiştir.

2.1.2. Hüresiz taze filtratların hazırlanması

Gelişen kültürler 100 mL MRS broth ortamına % 2 'lik ekim ile transfer edilmiştir. 24-48 saat inkübasyondan sonra gelişen kültürler 11.000 g 'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant steril bir erlene aktarılmış ve 1M NaOH, 1M HCl kullanılarak pH 7.0 ayarlanmıştır. pH ayarlaması yapılan örnekler 0.22 µm çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Filtreden geçirme esnasında örnekler 50 mL steril falkonlar içerisine alınmıştır. Kalan 50 mL ise liyofilize edilmek üzere 100 mL steril duran şişelerine aktarılmıştır.

2.1.3.Hücesiz liyofilize filtratların hazırlanması

Steril duran şişelerine aktarılan 50 mL hücesiz taze filtrat liyofilize edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. Bakterilerin liyofilize örnekleri kullanılıncaya kadar +4 °C 'de saklanmıştır.

2.2. Kullanılan Hücreler

2.2.1. Caco-2 hücre kültürü

Hücre stoklarımızda bulunan Şap Enstitüsü 'nden (Ankara) temin edilmiş insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) bu çalışmada kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri inaktif hale getirilmiş % 10 'luk Fetal Bovine Serum DMEM-F12, %1 (v/v) Penisilin – Streptomisin ve %7,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm² 'lik flasklarda % 95 hava ve % 5 CO₂ 'li gaz ortamında, 37 °C 'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

2.2.2. Caco-2 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması

2.2.2.1. Stoktan hücre çıkarılması

Azot tankından (-196 °C) çıkarılan Caco-2 hücrelerini içeren vialler, hızla eritildikten sonra, içinde 7 mL soğuk besiyeri bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1200 rpm 'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım dikkatlice çekildikten sonra tüpün dibine birkaç kez elle

vurarak peletin dağıtılması sağlanmıştır. Daha sonra pelet üzerine 6 mL besiyeri eklenmiştir. Elde edilen besiyeri-hücre karışımı otomatik pipet yardımıyla, santrifüj tüpünden alınarak, 25 cm² 'lik hücre kültür kaplarına (flasklara) aktarılmış ve 37 °C 'de, % 5 CO₂ içeren etüvde, inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.2.2. Caco-2 hücre dizilerinin pasajlanması

Hücre kültür kabında en az % 70 oranında hücre çoğalması meydana geldiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Bunun için flask içindeki kullanılmış hücre besiyeri cam pastör pipeti yardımıyla atılmış ve kültür kabına yapışmış olan hücreler öncelikle PBS (1L distile su için: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄) yardımıyla, sonra PBS-EDTA (1L distile su için: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, 0.372 g EDTA) ile yıkanmıştır. Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 25 cm² 'lik hücre kültür kabı için 180-220 µL, 25 cm² 'lik hücre kültür kabı için 500-600 µL 1x tripsin PBS-EDTA konmuş, bir iki dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Daha sonra invert mikroskopta hücreler kontrol edilerek ayrılma gözlenince, elle flask kenarına birkaç kez vurularak hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine, hücre kültür kabının büyüklüğüne göre 25 cm² 'lik için 6 mL besiyeri, 75 cm² 'lik için ise 22-25 mL besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla hücre kültür kaplarına paylaştırılmıştır.

2.2.2.3. Hücrelerin stoklanması

Hücreler, PBS ve PBS-EDTA ile yıkandıktan sonra, 1x tripsin PBS-EDTA yardımıyla kaldırılarak, santrifüj tüpü içerisine aktarılmış, 1200 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pelet üzerine her bir kriyotüp (vial) için 900 µL hücre besiyeri ve 100 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) çözeltisi konularak,

homojen bir karışım elde edene dek pipetleme yapılmıştır. Hücre, besiyeri ve DMSO çözeltisi karışımından her bir vial 1 mL aktarılmış ve vialler -80 °C 'ye kaldırılmıştır. 3-4 saat sonrasında vialler sıvı azot tankına (-196 °C) yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlanmıştır.

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12, Sigma), Penicillin-Streptomycin (Biological Industries), Tripsin-EDTA solüsyonu (Biological Industries), (Riedel de Haen), MRS Broth besiyeri, Sodyum bikarbonat (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Carlo Erba), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), Sıvı azot.

2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm² 'lik flasklar (TPP), 75 cm² 'lik flasklar (TPP), 96 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, erlenler, cam petripler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, 1 L 'lik steril filtre aparatı, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mL 'lik vidalı kapaklı şişeler, steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı. 10, 100 ve 1000 mikromolarlık tipler.

2.5. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (Bio-Tek,

ELx808-IU), Inverted mikroskop (Olympus IX71), 12 kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.6. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C 'de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

2.7.1. Hücresiz taze filtratın dozlarının hazırlanması

Hücresiz taze filtrat örnekleri 500, 50, 5, 0.5, 0.05 ve 0.005 µL/ mL dilüsyonlar halinde DMEM-F12 besiyeri içerisinde 6 doz şeklinde hazırlanmıştır.

2.7.2. Hücresiz liyofilize filtratın dozlarının hazırlanması

Liyofilize örnekleri de 10.000, 1.000, 100, 10, 1 ve 0.1 µg/mL 'lik dilüsyonlar halinde DMEM-F12 besiyeri içerisinde yine 6 doz şeklinde hazırlanmıştır.

2.8. Yöntem

2.8.1. Hücre kültürü

Caco-2 hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm² 'lik flasklarda yetiştirilmiş ve % 95 hava ve %5 CO₂ 'li gaz ortamında ve 37 °C 'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini % 70 oranında kapladıkları zaman 1xtripsin PBS-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (15 000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 mL hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37 °C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 8 ve 24 saat 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Hücresiz taze filtrat ve liyofilize filtratların belirlenen dozları hazırlanmıştır. DMEM-F12 besiyeri içerisinde hücresiz taze filtrat için 500, 50, 5, 0.5, 0.05 ve 0.005 µL/ mL, liyofilize form için ise; 10.000, 1.000, 100, 10, 1 ve 0.1 µg/mL 'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır.

2.8.3. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 8 ve 24 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/mL MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 mL DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 8 paralel 3 kez tekrar edilmiştir.

2.8.4. Mikroskopi

Hücreler Olympus IX71 inverted mikroskobu altında incelenmiştir.

2.8.5. Fotoğrafi

Hücreler Olympus DP70 kamera kullanılarak fotoğraflanmışlardır.

2.9. İstatistiki Değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 13.0 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MTT Sonuçları

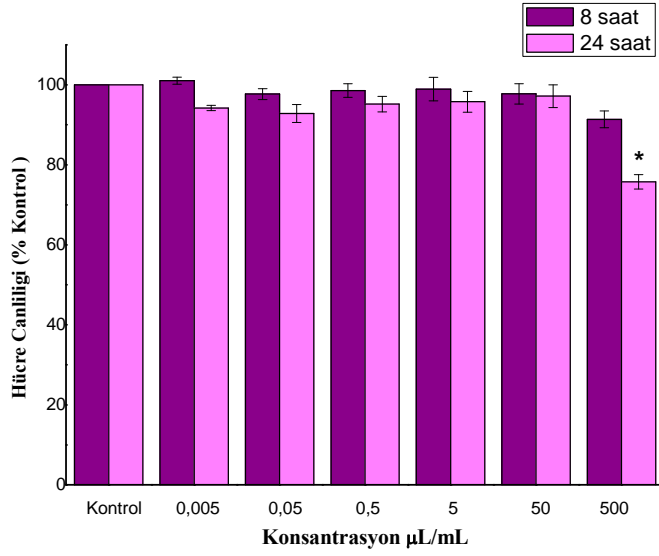
3 laktik asit bakterisinin (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Weissella confusa*) hücresiz taze filtratı ve bu filtratların liyofilize formlarının uygulandığı hücrelerle yapılan MTT testi sonucunda, Caco-2 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak en düşük dozdan itibaren ilk 5 dozda (hücresiz taze filtratı için 0,005 µL/mL, 0,05 µL/mL, 0,5 µL/mL, 5 µL/mL, 50 µL/mL; hücresiz liyofilize filtrat için 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL) genellikle hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Ancak en yüksek dozda (hücresiz taze filtratı için 500 µL/mL, hücresiz liyofilize filtrat için 10.000 µg/mL) bu bakterilerin hem hücresiz taze filtrat hem de liyofilize filtratlarının uygulandığı Caco-2 hücrelerinde her iki inkübasyon süresinde de, özellikle 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Tez çalışmasında hücre sayısı olarak 15.000 Caco-2 hücresi/kuyucuk (96 kuyucuklu plaka) sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. 5.000 ve 10.000 Caco-2 hücresi/kuyucuk denenmiştir; ancak tekrarlanabilir sonuçlar alınmadığı için değerlendirmeye alınmamıştır.

3.2. *Pediococcus pentosaceus* 'un Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

3.2.1. *Pediococcus pentosaceus* 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Pediococcus pentosaceus 'un hücresiz taze filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,005 µL/mL 'lik dozun, 8 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte % 6 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır (Şekil.1.). 0,05 µL/mL 'lik dozda, 8 saatte % 3, 24 saatte % 8 oranında hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. 0,5 µL/mL 'lik dozda, 8 saatte % 2, 24 saatte % 5 oranında hücre sayısında azalma meydana gelmiştir. 5 µL/mL 'lik dozun, 8 saatte % 2, 24 saatte % 5 oranında hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. 50 µL/mL 'lik dozun, 8 saatte % 3, 24 saatte yine % 3 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır. En yüksek doz olan 500 µL/mL 'lik dozda ise; 8 saatte % 9, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olup, % 25 oranında hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir.

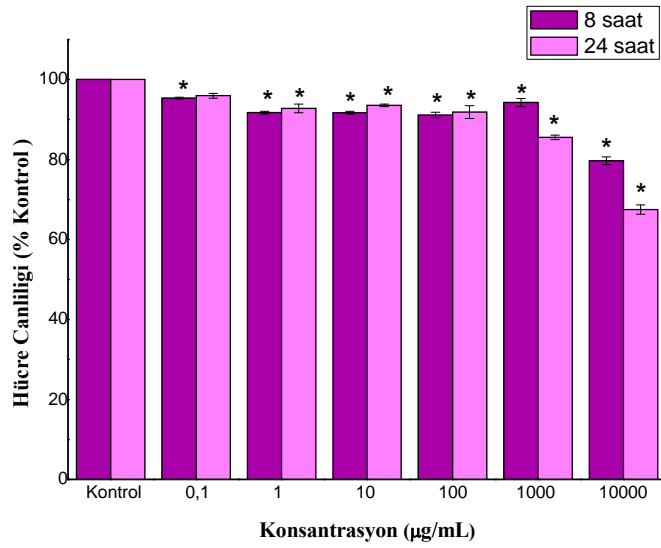


Şekil.1. *Pediococcus pentosaceus* 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

3.2.2. *Pediococcus pentosaceus* 'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Pediococcus pentosaceus 'un hücresiz liyofilize filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,1 µg/mL 'lik doz 8 saatte hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 5, 24 saatte ise % 5 oranında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur (Şekil.2.). 1 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 9, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 8 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır. 10 µg/mL 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 9, 24 saatte de kontrol grubuna göre anlamlı olup % 7 oranında hücre canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir. 100 µg/mL 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 9, 24 saatte de yine kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 9 oranında hücre sayısında azalma gözlenmiştir. 1000 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte

kontrol grubuna göre anlamlı olup % 6, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olup % 15 oranında hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır. En yüksek doz olan 10.000 µg/mL 'lik dozun ise; 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 21, 24 saatte de yine kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 33 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

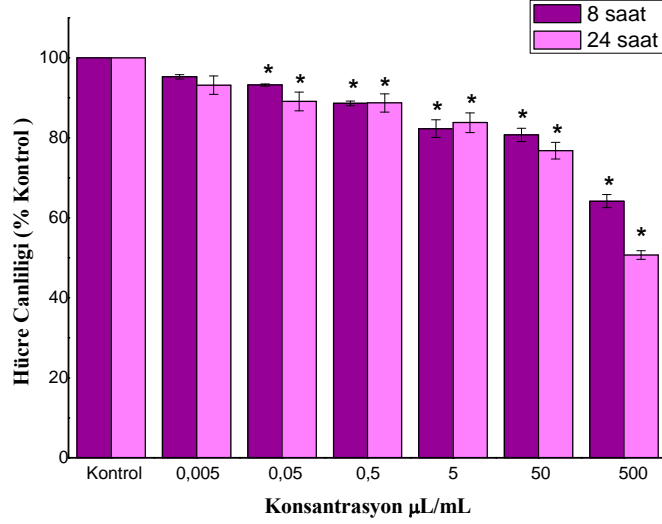


Şekil.2. *Pediococcus pentosaceus* 'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.3. *Lactobacillus plantarum* 'un Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

3.3.1. *Lactobacillus plantarum* 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Lactobacillus plantarum 'un hücresiz taze filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,005 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun, 8 saatte % 5, 24 saatte % 7 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır (Şekil.3.). 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 7, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 11 oranında hücre sayısında azalma gözlenmiştir. 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 12, 24 saatte yine kontrol grubuna göre anlamlı olup % 12 oranında hücre canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir. 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 18, 24 saatte yine kontrol grubuna göre anlamlı olup % 17 oranında hücre sayısında azalma saptanmıştır. 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 20, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olup % 24 oranında hücre sayısında azalma gözlenmiştir. En yüksek doz olan 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda ise; 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 36, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 50 oranında hücre canlılığında azalma saptanmıştır.

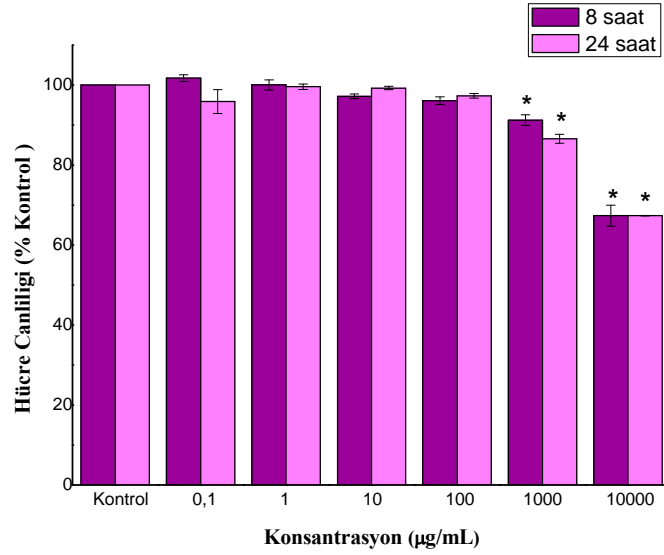


Şekil.3. *Lactobacillus plantarum* 'un hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.3.2. *Lactobacillus plantarum*'un hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Lactobacillus plantarum'un hücresiz liyofilize filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,1 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte % 5 oranında hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır (Şekil.4.). 1 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte yine hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte % 1 oranında hücre sayısını azalttığı gözlenmiştir. 10 µg/mL 'lik dozda, 8 saatte % 3, 24 saatte % 1 oranında hücre sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. 100 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte % 4, 24 saatte % 3 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır. 1000 µg/mL 'lik dozun 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 9, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 14 oranında hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. En yüksek doz olan 10.000 µg/mL 'lik dozda

ise; 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 33, 24 saatte yine kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 33 oranında, hücre sayısında azalma olduğu belirlenmiştir.



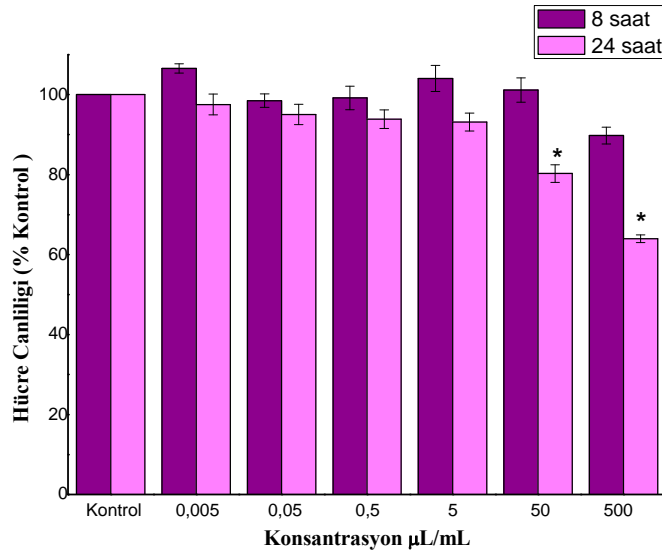
Şekil.4. *Lactobacillus plantarum* 'un hüresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.4. *Weissella confusa* 'nın Caco-2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

3.4.1. *Weissella confusa* 'nın hüresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Weissella confusa 'nın hüresiz taze filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,005

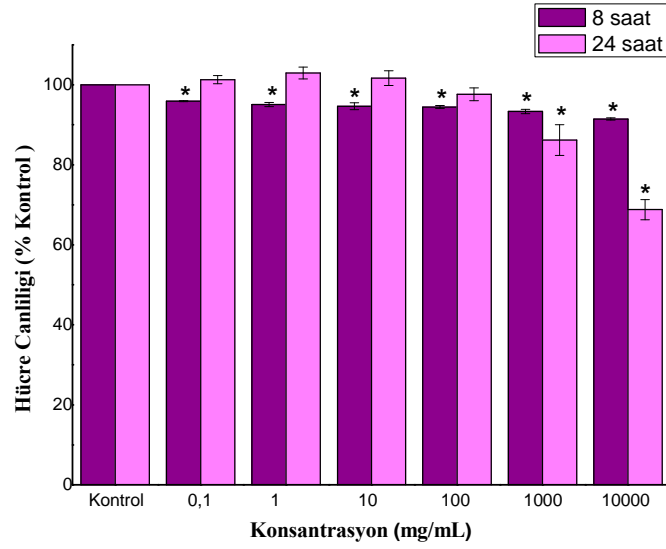
$\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun, 8 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte % 3 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır (Şekil.5.). 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun, 8 saatte % 2, 24 saatte % 5 oranında hücre sayısını azalttığı belirlenmiştir. 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozda, 8 saatte % 1, 24 saatte % 7 oranında hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun, 8 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte % 7 oranında azalttığı saptanmıştır. 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun, 8 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı, 24 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 20 oranında hücre sayısını azalttığı gözlenmiştir. En yüksek doz olan 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozun ise; 8 saatte % 11, 24 saatte yine kontrol grubuna göre anlamlı olup % 37 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır.



Şekil.5. *Weissella confusa* 'nın hücresiz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.4.2. *Weissella confusa* 'nın hücresiz liyofilize filtratının Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

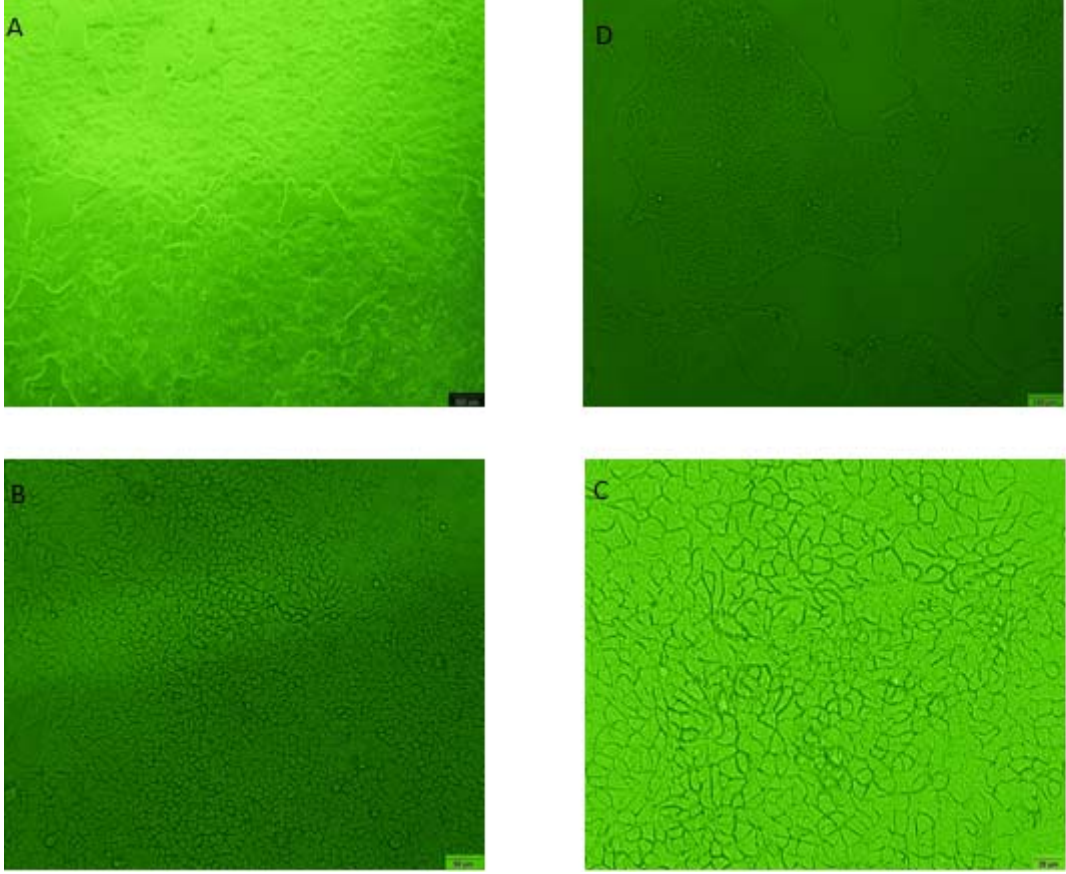
Weissella confusa 'nın hücresiz liyofilize filtratının uygulandığı Caco-2 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en düşük dozu olan 0,1 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 5 oranında hücre sayısını azalttığı, 24 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır (Şekil.6.). 1 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 5 oranında hücre sayısını azalttığı, 24 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir. 10 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 6 oranında hücre sayısını azalttığı, 24 saatte hücre sayısında bir değişiklik yapmadığı belirlenmiştir. 100 µg/mL 'lik dozda, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 6, 24 saatte % 3 oranında hücre canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir. 1000 µg/mL 'lik dozun, 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 7, 24 saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak % 14 oranında hücre sayısını azalttığı saptanmıştır. En yüksek doz olan 10.000 µg/mL 'lik dozda ise; 8 saatte kontrol grubuna göre anlamlı olup % 9, 24 saatte yine kontrol grubuna göre anlamlı olup % 32 oranında hücre canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil.6.).



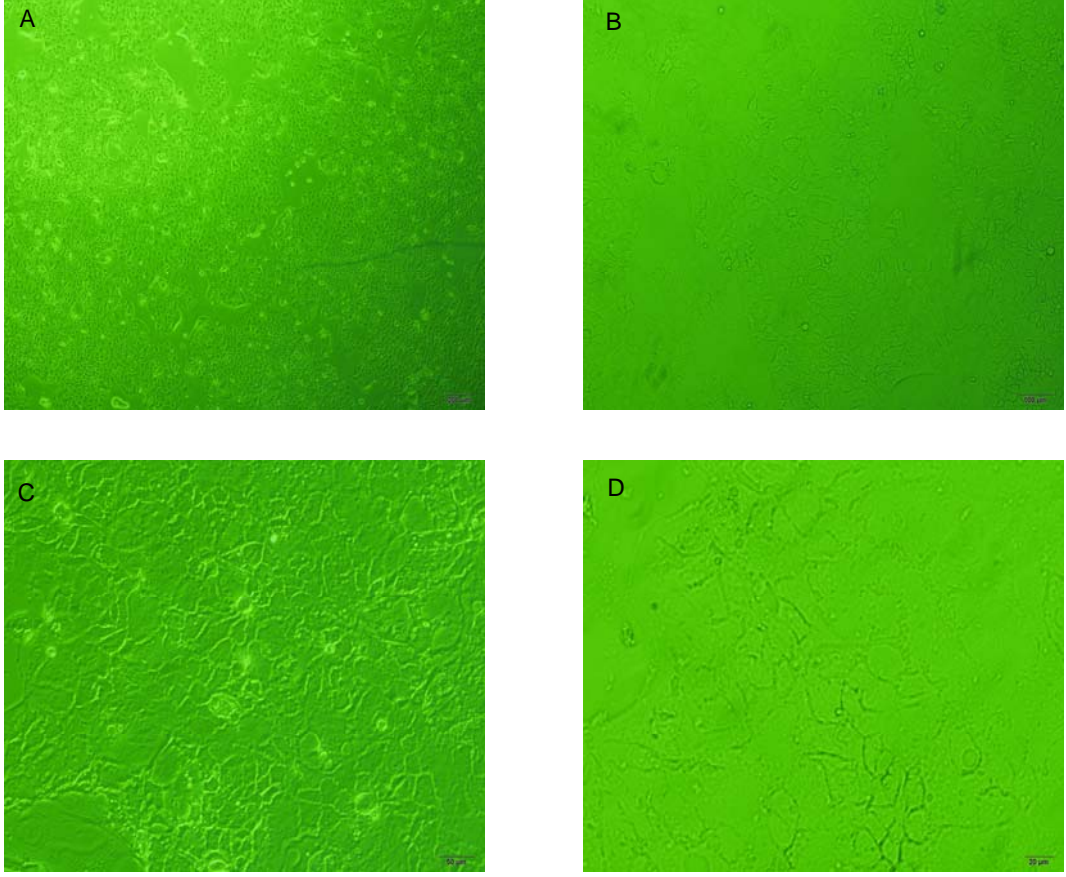
Şekil.6. *Weissella confusa* 'nın hücre-siz taze filtratının Caco-2 hücreleri üzerine 8 ve 24 saat inkübasyon süresinde sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.5. Hücre morfolojilerinin incelenmesi

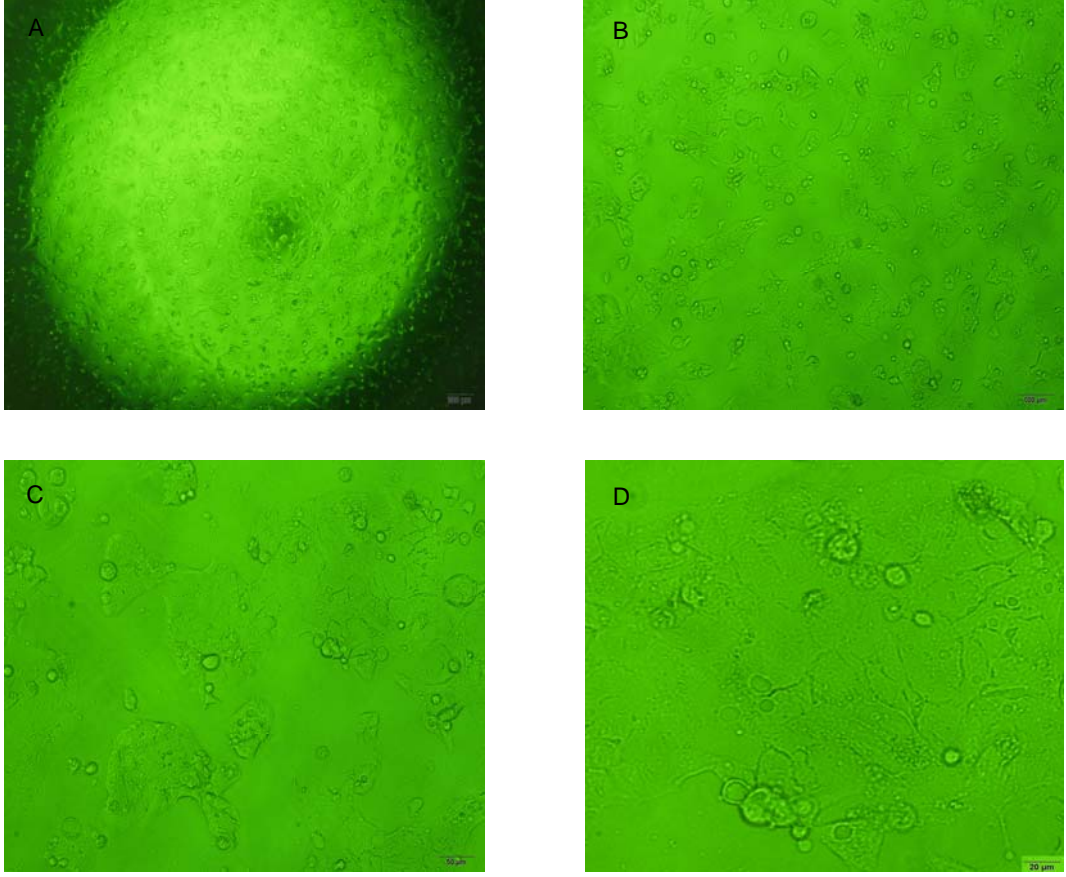
Olympus IX71 inverted mikroskobunda hücrelerin gelişim morfolojileri, madde öncesi morfolojileri, madde sonrası morfolojileri incelenip, Olympus DP70 kamera yardımı ile fotoğrafları çekilmiştir. (Şekil. 7-11).



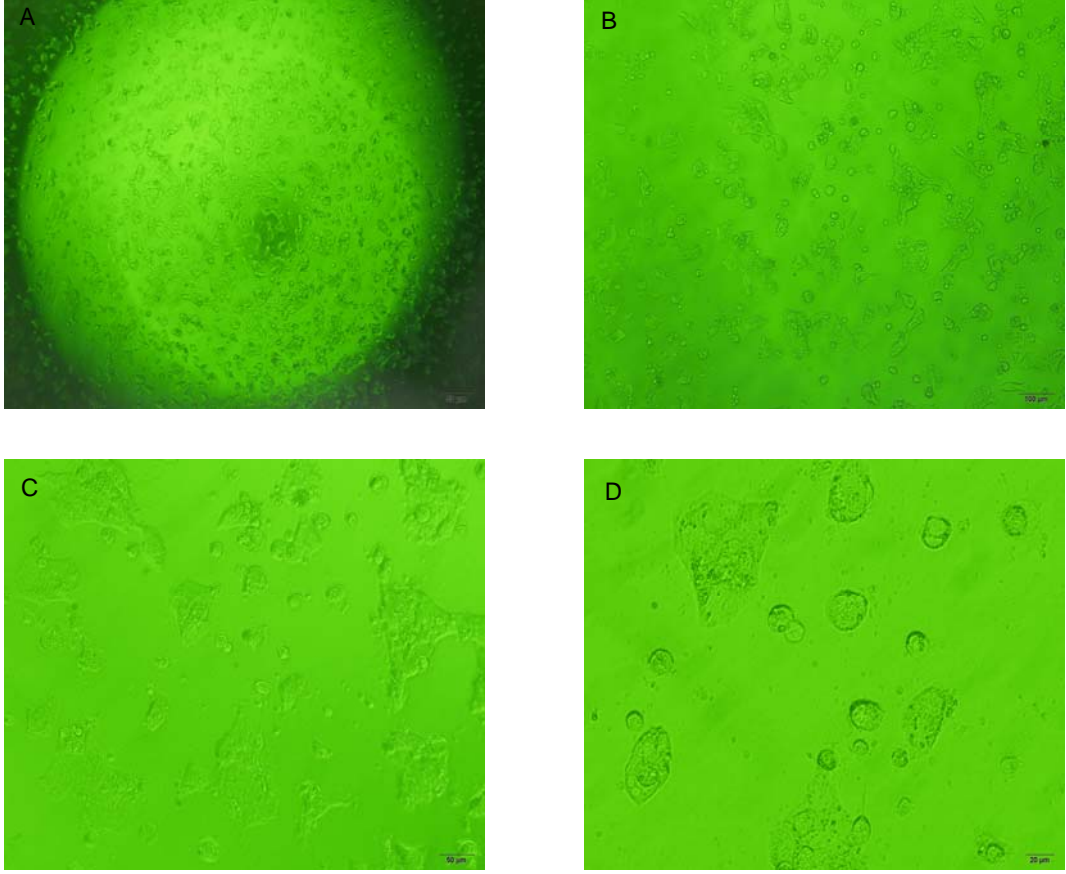
Şekil.7. P-39 (pasaj 39) Caco-2 hücrelerinin normal morfolojileri, A) X40 (ölçü birimi 200µm), B) X100 (ölçü birimi 100µm), C) X200 (ölçü birimi 50µm), D) X400 (ölçü birimi 20µm)



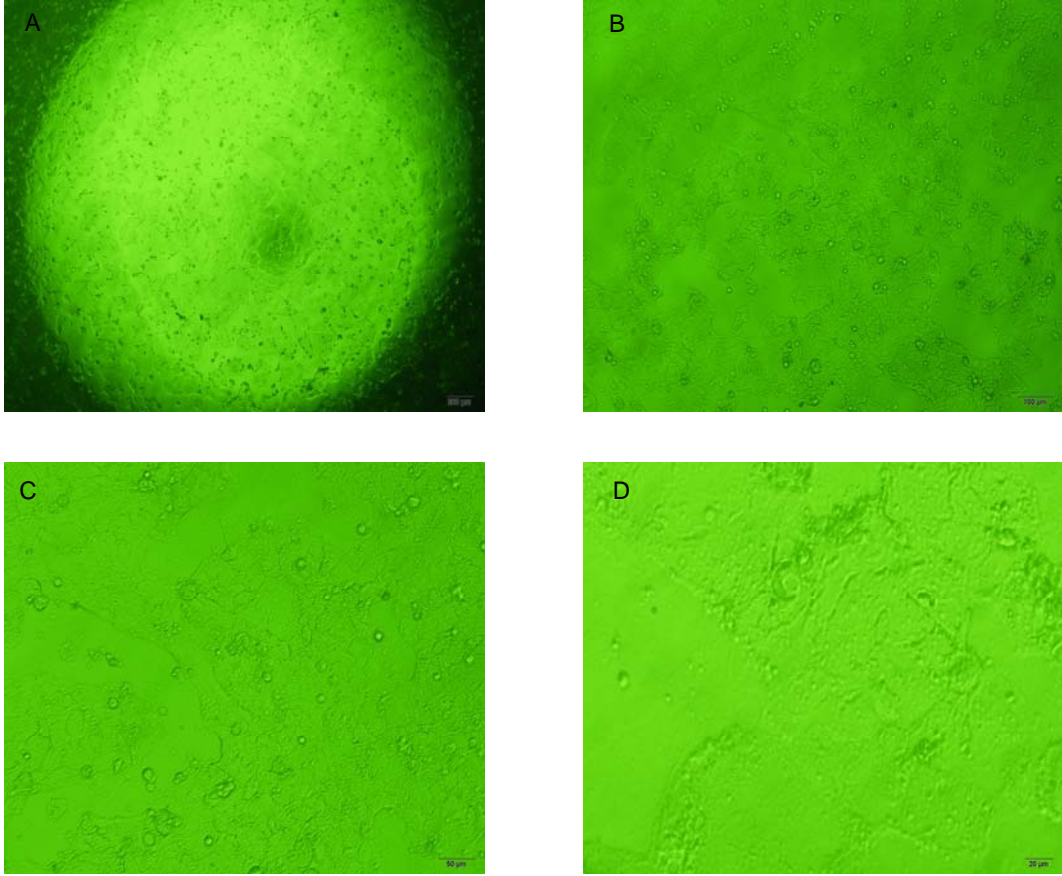
Şekil.8. P-36 (pasaj 36) Caco-2 hücrelerinin normal morfolojileri, A) X40 (ölçü birimi 200µm), B) X100 (ölçü birimi 100µm), C) X200 (ölçü birimi 50µm), D) X400 (ölçü birimi 20µm)



Şekil.9. Caco-2 hücrelerinin madde verilmeden önceki morfolojik görünümü (15000 hücre / 100 μ l), A) X40 (ölçü birimi 200 μ m), B) X100 (ölçü birimi 100 μ m), C) X200 (ölçü birimi 50 μ m), D) X400 (ölçü birimi 20 μ m)



Şekil.10. *P.pentosaceus* 'un hüresiz taze filtratının 24 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü, A) X40 (ölçü birimi 200µm), B) X100 (ölçü birimi 100µm), C) X200 (ölçü birimi 50µm), D) X400 (ölçü birimi 20µm)



Şekil.11. *P.pentosaceus* 'un hücresiz liyofilize filtratının 24 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü, A) X40 (ölçü birimi 200µm), B) X100 (ölçü birimi 100µm), C) X200 (ölçü birimi 50µm), D) X400 (ölçü birimi 20µm)

3.6. Tezde Kullanılan Bakterilerin Hücresiz Taze Filtratları ve Liyofilize Filtratlarının Karşılaştırılması

Pediococcus pentosaceus 'un en yüksek dozdaki hücresiz liyofilize filtratının, hücresiz taze filtrat formundan 8 saatte hücre canlılığı üzerine daha etkili olduğu gözlenmiştir. 24 saatte ise her iki formun da hücre sayısının azaltılmasında yaklaşık olarak benzer etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil.1-2.). *Lactobacillus plantarum* 'un en yüksek dozdaki hücresiz taze filtrat ve liyofilize filtratının 8 saatte hücre canlılığı üzerine yaklaşık olarak benzer etkiye

sahip olduğu, 24 saatte ise bakterinin hücresiz taze filtratının, liyofilize filtrattan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil.3-4.). *Weissella confusa* 'nın en yüksek dozdaki hücresiz taze filtrat ve liyofilize filtratının ise; 8 ve 24 saatte hücre canlılığı üzerine yaklaşık olarak benzer etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil.5-6.).

İstatistiksel sonuçlardan elde edilen veriler, *Lactobacillus plantarum* 'un hücresiz taze filtratının en yüksek dozunun 24 saatte, hücre sayısının azaltılmasında en etkili olduğu sonucunu ortaya koymuştur (Şekil.3.).

4. TARTIŞMA SONUÇ

Laktik asit bakterileri başta olmak üzere (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacteria*), *Bacillus* ve *Escherichia coli* 'nin belli suşları ile *Saccharomyces* ve *Aspergillus* gibi fungusların bazı suşlarının, probiyotik özelliklere sahip olduğu yıllar geçtikçe artan bir şekilde, yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Lee ve ark., 2007; Liong, 2007).

Birçok gıda ürününde işlevsel gıda olarak probiyotiklerin kullanılmasının rolü kabul edilmekte ve insan sağlığı için önemi her yıl giderek artmaktadır. İşlevsel bir gıda olarak en çok kullanılan probiyotik bakteriler, laktik asit bakterileridir (Saikali ve ark., 2004; Moreno ve ark., 2007). LAB 'nin antimikrobiyal, antioksidan, antimutajenik, antiproliferatif özelliklere sahip olduğuna ve de en önemlisi kanser hücrelerine karşı antitümöral etki sergilediklerine dair literatürde çalışmalar yer almaktadır (Saarela ve ark. 2000; Kılıç, 2001; Rafter, 2002; Choi ve ark., 2005; Hoesl ve Altwein, 2005; Koller ve ark., 2008).

Göğüs ve mesane kanseriyle ilgili bazı çalışmalar olmasına rağmen, LAB 'nin antikanser etkileri üzerindeki çalışmaların büyük çoğunluğu kolorektal kanser ile ilgilidir (Rafter, 2002). Caco-2 hücreleri insan kolon adenokarsinoma hücreleri olup, bileşiklerin intestinal absorpsiyon çalışmalarında *in vitro* model olarak en çok kullanılan hücre hatlarından biridir (Turco ve ark., 2011). *In vitro* bir model olan Caco-2 hücreleri uzun yıllardan beri özellikle farmasötik alanda da tarama amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Anonim, 2000). Bu hücreler intestinal bariyeri taklit ederek, sıkı bağlantılarla sürekli tek bir tabaka oluşturması ile yarı geçirgen membranlara ekildiğinde, uzun dönemli kültürlerde farklılaşabilmekte ve polarize olabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, Caco-2 hücreleri *in vitro* çalışmalarda insan intestinal epiteli için popüler bir vekil olmuştur (Turco ve ark., 2011).

Günümüzde kolon kanser riskinin azaltılmasında uygulanan tedavilere alternatif olarak, diyet ve doğal biyoaktif tamamlayıcılar yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Collins ve ark., 1999; Chau ve ark., 2006). Yaptığımız

çalışmada bu sebeplerden dolayı hedef hücre hattı olarak kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2 hücreleri) ve de bağırsak mikroflorasını düzenleyici özelliğinden yola çıkılarak, alternatif tedavi amaçlı kullanılabilirliği olan probiyotikler çalışılmıştır.

Çalışmamızda, çalıştığımız her 3 laktik asit bakterisine ait gerek hücresiz taze filtratlarda, gerekse hücresiz liyofilize filtratlarda hücre canlılığında değişen oranlarda azalma meydana gelmiştir. 3 bakteriye ait hücresiz taze filtratın özellikle *L.plantarum* ve *W.confusa* 'nın 100 µg/mL dozunun Caco-2 hücre canlılığı üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Lee ve arkadaşları (2004) *L.acidophilus* SNUL (son hücre sayısı 2.0×10^9 cfu/mL), *L.casei* YIT9029 (son hücre sayısı 1.1×10^9 cfu/mL) ve *B.longum* HY8001 (son hücre sayısı 8.0×10^9 cfu/mL) 'un hücresiz taze filtratının bir kolon kanser hücre hattı olan SNUC2A hücre canlılığı üzerine inhibitör etkisinin var olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 50.000 SNUC2A hücresiyle, 100 µg/mL konsantrasyonda bakterilerin hücresiz taze filtratlarının 72 saatlik inkübasyonu sonrası grafiklerden elde edilen verilere göre *L.acidophilus* 'un % 20-25, *L.casei* 'nin % 35-40, *B.longum* 'un ise % 35-40 oranında SNUC2A hücre canlılığını inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2004). Çalışmamızda 96 kuyucuklu plakada herbir kuyucuk için 15.000 Caco-2 hücresi kullanılmış ve de inkübasyon süresini 24 saat olarak kısa tutulmuştur. Bu inhibisyon değerleri arasındaki farklılık, inkübasyon süresinin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi, çalışmada kullanılan hücre sayısından da kaynaklanmış olabilir.

Yine Thirabunyanon ve arkadaşları (2009) tarafından benzer olarak yapılan bir çalışmada, günlük fermente süttten elde edilen *Enterococcus faecium* RM11, *Lactobacillus fermentum* RM28 'un hücresiz taze filtratının, Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinde bu mikroorganizmaların sadece hücresiz taze filtratları uygulandığında, *E.faecium* RM11 'in % 21, *Lactobacillus fermentum* RM28'in ise % 23 oranında Caco-2 hücresinin (1×10^6 hücre/100 µL) çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 500 µl/mL konsantrasyonda *P.pentosaceus*, *L.plantarum*, ve *W.confusa* 'nın hücresiz taze filtratları, Caco-2 hücresinin (15.000 hücre/100 µL)

gelişimini sırasıyla % 25, % 50 ve % 37 oranında inhibe etmiştir. Bu inhibisyon değerleri arasındaki farklılık, bakteri türü ve çalışmada kullanılan Caco-2 hücre sayılarındaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir (Thirabunyanon ve ark., 2009).

Liu ve Pan (2010) *L.plantarum* NTU 102 'nin ısıyla inaktive edilmiş hücreleri ve sitoplazmik fraksiyonunun *in vitro* HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücreleri üzerine 48 saat inkübasyon süresinde inhibitör etkilerinin değişen oranlarda olduğunu bildirmiştir. Çalışmada 2×10^4 hücre/100 μ L kullanılmıştır. Araştırmacılar *L.plantarum* NTU 102 'nin ısıyla inaktive edilmiş hücreleri ile yapılan çalışmada 100 μ g/mL dozda yüzde Caco-2 hücre canlılığını 72.0 ± 4.0 , 500 μ g/mL dozda ise 44.5 ± 2.3 bulduklarını bildirmişlerdir. *L.plantarum* NTU 102 'nin sitoplazmik fraksiyonunun ise; 100 μ g/mL dozda yüzde Caco-2 hücre canlılığını 95.1 ± 6.5 , 500 μ g/mL dozda 76.1 ± 7.0 bulduklarını ortaya koymuşlardır. Ayrıca araştırmacılar *L.plantarum* NTU 102 'nin ısıyla inaktive edilmiş hücreleri ile yapılan çalışmada 100 μ g/mL dozda yüzde HT-29 hücre canlılığını 51.5 ± 5.9 , 500 μ g/mL dozda ise 29.75 ± 1.1 bulduklarını bildirmişlerdir. *L.plantarum* NTU 102 'nin sitoplazmik fraksiyonunun ise; 100 μ g/mL dozda yüzde HT-29 hücre canlılığını 109.0 ± 10 , 500 μ g/mL dozda 83.2 ± 10 bulduklarını ortaya koymuşlardır (Liu ve Pan, 2010). Bizim çalışmamızda *L.plantarum* 'un hücreli liyofilize filtratı 100 μ g/mL dozda 8 saat inkübasyonda % 4, 24 saat inkübasyonda % 3 oranında, 1.000 μ g/mL dozda 8 saat inkübasyonda % 9, 24 saat inkübasyonda % 14 oranında Caco-2 hücre canlılığını inhibe etmiştir. Çalışmamızda 15×10^3 hücre /100 μ L kullanılmıştır. Elde edilen bu sonuçlardan *L.plantarum* 'un ısıyla inaktive edilmiş hücrelerinin, hücreli liyofilize filtrat ve bakteri sitoplazmasına göre Caco-2 hücre canlılığı üzerine daha etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Yine Orlando ve arkadaşları (2009), *Lactobacillus rhamnosus* 'un sonikasyon işlemi ile elde edilen sitoplazmasının, bir kolon kanser hücre hattı olan DLD-1 hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerini değerlendirmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası 1:2 konsantrasyondaki dozun, DLD-1 hücre canlılığı üzerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir (en fazla % 10). 48 saat inkübasyon sonrası ise; bu etkinin % 20-30 arasında olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda *Lactobacillus plantarum* 'un taze hücre dışı filtratı 500 μ L/mL 'lik dozu; 8 saatte

% 36, 24 saatte % 50 oranında Caco-2 hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. Ancak burada önemli olan her iki hücre hattının ve de bakterilerin farklılık göstermesinin yanında, Orlando ve arkadaşları 4.000 hücre /100 µL sayıda hücre kullanmıştır, bizim çalışmamızda 15.000 hücre/100 µL Caco-2 hücresi kullanılmıştır. Buradan *L.plantarum* 'un hücresiz taze filtratının, *L.rhamnosus* sitoplazmasından daha etkili olabilmesi ve de hücre sayısının da buna etki gösterebilmesinin muhtemel olabileceğini söyleyebiliriz (Orlando ve ark., 2009).

Ayrıca Kim ve arkadaşları (2002a) tarafından *in vivo* yapılan çalışmada *L.plantarum* 'un sitoplazmik fraksiyonunun doza bağlı olarak F9 teratokarsinomaya sahip farelerde antitümör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. En iyi aktivitenin 200 mg/kg/günde dozda kontrol grubuna göre % 44 oranında azalmayla meydana geldiğini bildirmişlerdir (Kim ve ark., 2002a). Bizim çalışmamızda da *L.plantarum* 'un hücresiz taze filtratının, Caco-2 hücrelerinde % 50 oranında hücre canlılığında azalmaya sebep olduğundan yola çıkarak *L.plantarum* 'un kolon kanser hücrelerine karşı etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Liu ve arkadaşları (2011), *Lactobacillus casei* 01 'in ekzopolisakkaritlerinin (EPS) 100µg/mL 'de HT-29 hücreleri üzerine antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu dozda kontrol grubu % 100 olarak alındığında, HT-29 hücre canlılığı % 73.9±9.3 olarak belirtilmiştir (Liu ve ark., 2011). Çalışmamızda her 3 laktik asit bakterisinin hücresiz liyofilize filtratının 100 µg/mL 'de Caco-2 hücre canlılığı üzerine herhangi inhibitör etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir; ancak her 3 bakteriye ait hücresiz liyofilize filtratın 10.000 µg/mL 'lik dozunda Caco-2 hücre canlılığı üzerine etki ettiği saptanmıştır. Buradan EPS 'lerin hücre canlılığı üzerine daha etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda kullandığımız hücresiz taze filtrat ve liyofilize filtratın EPS miktarının düşük olmasından dolayı, saf EPS 'nin hücre inhibisyonu üzerine daha etkin olabileceğini söyleyebiliriz. Yapılan çalışmalar sonucunda EPS 'nin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü, antitümör ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca LAB 'nin antikanser aktiviteleri

üzerindeki çalışmalar tüm hücre fraksiyonlarını içermektedir; ancak EPS bu anlamda büyük öneme sahiptir.

Lee ve arkadaşları (2008) *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 'nin santrifüj sonrası elde edilen hücre peletinden bütanolle hazırlanan ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresinde, Caco-2 hücreleri üzerine antiproliferatif etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 100 µg/mL 'lik dozun Caco-2 hücre proliferasyonunu % 30-40 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Lee ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda 100 µg/mL 'lik hücresiz liyofilize filtratının 24 saatlik inkübasyon süresinde Caco-2 hücre sayısını, *P.pentosaceous*, *L.plantarum* ve *W.confusa* 'nın belirgin bir şekilde etkilemediği gözlenmiştir. Buradan direkt canlı bakteri liyofilizatının daha etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Paolillo ve arkadaşları (2009) 96 kuyucuklu plakada her kuyucukta 1×10^6 Caco-2 hücresi olacak şekilde *L.plantarum* 'un canlı bakteri hücreleriyle yaptıkları çalışmada 12 saatlik inkübasyon süresinin sonunda Caco-2 hücre canlılığı üzerine *L.plantarum* 'un belirgin bir etkisinin olmadığını; oysaki 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda kontrol grubuyla (sırasıyla % 73.6±2.9, % 68.25±2.8) kıyaslandığında madde uygulanan hücrelerde canlı bakteri tarafından Caco-2 hücre canlılığının stimüle edildiğini (sırasıyla % 92±3, % 91±3) belirtmişlerdir. Burada *L.plantarum* 'un MTT testi ile belirlenen hücre canlılığının artması ile bağırsak epitel homeostazisini teşvik ettiğinden ve sitokinle indüklenen epitel hücre apoptozisini inhibe ettiğinden bahsedilmiştir. Ayrıca *L.plantarum* 'un bağırsaktaki inflamasyonun kontrolünde bir role sahip olduğu ve de TLR-2 (toll-like reseptörü-2)'nin indüksiyonu ile sistemik immünitenin aktivasyonu için önemli olduğu bildirilmiştir (Paolillo ve ark., 2009). Ancak bu çalışmanın aksine Thirabunyanon ve arkadaşları (2009) *E.faecium* RM11 ve *L.fermentum* RM28 'in canlı bakteri hücrelerinin Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini (*E.faecium* RM11 % 29±3, *L.fermentum* RM28 ise % 29±4 oranında) bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu sonucu Gonet-Surowka ve arkadaşlarının (2007) sadece bazı türlerinin probiyotik olduğu *Lactobacillus* 'un hem canlı hem de ısıyla inaktive edilmiş hücrelerinin kolon kanser hücre apoptozisine neden olan pan-kaspazları güçlü bir şekilde aktive ettiğini bildirdikleri çalışmayla desteklemişlerdir (Thirabunyanon ve ark., 2009).

Yapılan bu çalışmalara ek olarak, istenen koruyucu etkilerin uygulanan probiyotiğin dozuna bağlı olduğu ortaya konmuştur. 10 mL NaCl/kg vücut ağırlığında 1×10^{10} miktarında probiyotik uygulandığında, ratların kolon hücrelerindeki karsinojenle indüklenmiş lezyonlara karşı *L.casei* 'nin korucu bir etkisi gözlenmiştir. Benzer bir şekilde canlı *L.acidophilus*, *L.gasseri*, *L.confusus*, *Streptococcus thermophilus*, *B.breve*, ve *B.longum* 'un tek başına uygulanmasıyla kolonda MNNG (*n*-metil-*n'*-nitro-*n*-nitrosoguanidin) ile indüklenmiş DNA hasarını önlediği bulunmuştur. Ancak % 50 ya da % 90 oranında bakteriyal dozun azaltılması, karsinojen koruma etkisinin kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu, gama interferon, interferon-12 (IL-12), IL-14 ve IL -10 gibi inflamatuvar ve düzenleyici sitokinleri salan bağırsak immün hücrelerinin probiyotiğin doza-bağımlı stimülasyonuna katkıda bulunabilir (Liong, 2008). Zabala ve arkadaşları (2001a) *Enterococcus faecium* CH3 ve *Lactobacillus salivarius* HA8 'in bakteriyal süspansiyonlarının, myeloma hücre proliferasyonunun inhibisyonunu değerlendirmişlerdir. 10^6 - 10^7 cfu/mL bakteriyal konsantrasyonda her iki suşta da hücresel proliferasyonun zayıf bir inhibisyonu (% 70.9-81.5) gözlenmiştir. Ancak 10^8 cfu/mL bakteriyal konsantrasyonda güçlü bir inhibitör etki (*E.faecium* HN1 için % 16.7, *L.salivarius* HA8 için % 5) olduğu belirtilmiştir. Diğer LAB 'nin anti-karsinojenik ve anti-mutajenik özelliğinin doza bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Zabala ve ark., 2001a).

Bu alanda yapılan çalışmaların çoğunluğu özellikle *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri üzerinedir. Yaptığımız çalışmada en güçlü inhibitör etki de yine bir *Lactobacillus* türü olan *L.plantarum* 'da gözlenmiştir. Ancak yaptığımız literatür çalışmasında *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa* ile yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa* ilk kez çalışılmış gözükmektedir. Her ne kadar *L. plantarum* 'a ait filtratların etkisine göre daha düşük etki gösterebilir de ümit vaat etmektedir. Bu konudaki çalışmaların detaylandırılması farklı bilgilerin elde edilmesine neden olacaktır. Ayrıca bu mikroorganizmaların piyasada bulunan probiyotik ürünlere alternatif olarak kullanılmasına da olanak sağlayabilir. Bunun yanında probiyotiklerle ilgili tüm bu pozitif buluşlara rağmen, bazı araştırmacılar probiyotiklerin kolon kanserini koruyucu etkilerinin önemsiz olduğunu da rapor

etmiştir. Ancak bu alanda kesin mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla değerlendirme yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

SONUÇ

Sonuçlarımız Caco-2 hücre canlılığına karşı en güçlü inhibitör etkinin *L.plantarum* 'un hücresiz taze filtratının 500 µL/mL konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyon süresinde olduğunu göstermiştir. Ancak *P.pentosaceus* ve *Weissella confusa* 'nın da en yüksek dozunda (hücresiz taze filtrat için 500 µL/mL, hücresiz liyofilize filtrat için 10.000 µg/mL) Caco-2 hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etki gözlenmiştir. Bu sonuçlar bu 2 bakterinin probiyotik ürün eldesinde potansiyel bir aday olabileceğini, ayrıca antikanser aktivite çalışmalarında da kullanılabilceğini desteklemektedir. Bu alanda yaptığımız çalışmaları devam ettireceğiz.

KAYNAKLAR

- Allsopp, P., Rowland, I. (2009), "Potential protective effects of probiotics and prebiotics against colorectal cancer," *Prebiotics and Probiotics Science Technology*, Springer, 997-1048.
- Amanatidou, A., Bennik, M.H., Gorris, L.G., Smid, E.J. (2001), "Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen," *Arch. Microbiol.*, **176**, 79–88.
- Anonim (2000), FDA, Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA. <http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.pdf>.
- Anonim (2001), FAO/WHO. Regulatory and Clinical Aspects of Dairy Probiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Archibald, F.S., Fridovich, I. (1981a), "Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*," *Journal of Bacteriology*, **145**, 442–451.
- Archibald, F.S., Fridovich, I. (1981b), "Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria," *Journal of Bacteriology*, **146**, 928–936.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö. (1992), *Özel Mikrobiyoloji*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Yay., No: 741.
- Arimochi, H., Kinouchi, T., Kataoka, K., Kuwahara, T. ve Ohnishi, Y. (1997), "Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced

aberrant crypt foci in the rat colon,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **238**, 753–757.

Bars, A. (2010), *Bazı heterosiklik ligandların Au(III), Pt(II) dinükleer metalkomplekslerinin sağlam ve kanserli hücreler üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Barutça, B. (2006), “Bazı bitki ekstraktlarının memeli hücre kültürlerinde sitotoksik aktivitelerinin *in vitro* araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Beasley, S. (2004), *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*, Academic Dissertation in Microbiology, University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, Finland.

Bengmark, S. (2001), “Pre-, pro- and synbiotics,” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **4**, 571-579.

Bengmark, S., Martindale, R. (2005), “Prebiotics and synbiotics in clinical medicine,” *Nutr. Clin. Prac.*, **20**, 244–261.

Bergonzelli, G.E., Blum, S., Brüssow, H., Corthésy-Theulaz, I. (2005), “Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases?,” *Digestion*, **72**, 57–68.

Biffi, A., Coradini, D., Larsen, R., Riva, L., Di Fronzo, G. (1997), “Antiproliferative Effect of Fermented Milk on the Growth of a Human Breast Cancer Cell Line,” *Nutrition and Cancer*, **28:1**, 93-99.

Brady, L.J., Gallaher, D.D., Busta, F.F. (2000), “The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer,” *Journal of Nutrition*, **130**, 410-414.

Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W., Newman, S.M. (1997), “The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells,” *P.S.E.B.M.*, **214**, 248-257.

- Brown, A.C., Valiere, A. (2004), “Probiotics and Medical Nutrition Therapy,” *Nutr. Clin. Care*, **7:2**, 56–68.
- Bruno-Barcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., Klaenhammer, T.R., Hassan, H.M. (2004), “Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity,” *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4702–4710.
- Burns, A.J., Rowland, I.R. (2000), “Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics,” *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **1:1**, 13-24.
- Burns, A.J., Rowland, I.R. (2004), “Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells,” *Mutation Research*, **551**, 233–243.
- Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Bartolozzi, F., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. (2000), “Lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases Helicobacter pylori eradication rates,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14**, 1625-1629.
- Cani, P.D., Delzenne, N.M. (2009), “The Role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease,” *Current Pharmaceutical Design*, **15**, 1546-1558.
- Cebeci, A., Gürakan, C. (2003) “Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains,” *Food Microbiology*, **20**, 511-518.
- Chang, S.K., Hassan, H.M. (1997), “Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*,” *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3732–3735.
- Chau, I., Cunningham, D. (2006). “Adjuvant therapy in colon cancer-what, when and how?,” *Annals of Oncology*, **17**, 1347 - 1359.
- Cheon, S., Lee, K.W., Kim, K.E., Park, J.K., Park, S., Kim, C., Kim, D., Lee, H.J., Cho, D. (2011), “Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* La205

enhances NK cell cytotoxicity through increased granule exocytosis,” *Immunology Letters*, **136**, 171-176.

Choi, S.S., Kim, Y., Han, K.S., You, K.S., You, S., Oh, S., Kim, S.H. (2005), “Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro,” *Lett. Appl. Microbiol.*, **42:5**, 452-8.

Chou, L., Weimer, B. (1999), “Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*,” *J. Dairy Sci.*, **82**, 23–31.

Collins, M.D., Gibson, G.R. (1999), “Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut,” *American Journal of Clinical Nutrition*, **69**, 1052-1057.

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

Çenesiz, S., Devrim, A.K., Kaya, N., Özcan, A., Sözmen, M. (2004), “Azoksimetanla kolonik anormal kript oluşturulmuş farelerde vitamin C'nin aspartat aminotferaz (AST) ve alanin aminotferaz (ALT) aktiviteleri üzerine etkisi,” *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10:2**, 175-177.

Çevik, N. (2006), *Memeli hücre kültürlerinde bazı bitki ekstralarının aktin hücre iskeleti üzerine olan etkilerinin in vitro araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Dave, R.I., Shah, N.R. (1997), “Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts,” *Food Aust.*, **49**, 164–168.

De Angelis, M., Gobbetti, M. (1999), “*Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism,” *Applied and Environmental Microbiology*, **51**, 358–363.

De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., Verstraete, W. (2000), “Protective effect of the bile salt hydrolase-active

Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 709–714.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005), “Diversity of the human intestinal microbial flora,” *Science*, **308**, 1635-1638.

Ewaschuk, J.B., Walker, J.W., Diaz, H., Madsen, K.L. (2006), “Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice,” *J. Nutr.*, **136**, 1483-1487.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., Vigi, V. (2003), “Intestinal microflora in early infancy: composition and development,” *Acta. Pediatr. Suppl.*, **441**, 48-55.

Fang, W.F., Strobel, H.W. (1978), “Activation of carcinogens and mutagens by rat colon mucosa,” *Cancer Research*, **38**, 2939-2944.

Freshney, I., (1994), *Culture of animal cells*, 3 rd Ed., John Wiley & Sons Inc., Publication, New York, USA, **486**.

Freshney, R. I., (2005), *Culture of Animal Cells*, 5th Ed, A Manual of Basic Technique, **359-372**.

Fuller, R. (1991), “Probiotics in human medicine,” *Gut* **32**, 439-442. Gardiner, G.E., Heinemann, C., Bruce, A.W., Beuerman, D., Reid, G. (2002), “Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA,” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9:1**, 92-96.

Gilliand, S.E. (1990), “Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria,” *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 175-188.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., Campieri, M. (2000), “Oral bacteriotherapy as

maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial,” *Gastroenterology*, **119**, 305–309.

Griffiths, J. B., Doyle, A. (1998), *Cell and tissue culture Laboratory procedures in Biotechnology*, **62-64**.

Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., Roques, C. (2010), “*In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics,” *Anaerobe*, **16**, 493-500.

Guarner, F., Schaafsma, G.J. (1998), “Probiotics,” *International Journal of Food Microbiology*, **39**, 237–238.

Gürsoy, O. ve Kınık, O. (2005), “Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri,” *Müh. Bil., Derg.*, **11** (3), 361–371.

Han, S., Cho, K., Lee, C.K., Song, Y., Park, S.H., Ha, N.J., Kim, K. (2005), “Enhancement of antigen presentation capability of dendritic cells and activation of macrophages by the components of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* SPM 1204,” *The Journal of Applied Pharmacology*, **13**, 174-180.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001), “Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria,” *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 3086–3091.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. (1996), “A placebo- controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects,” *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767-771.

Hepner, G., Fried, R., Jeor, S., Fusetti, L., Morin, R. (1979), “Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk,” *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 19-24.

Hertel, C., Schmidt, G., Fischer, M., Oellers, K., Hammes, W.P. (1998) “Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene katA of

Lactobacillus sakei LTH677,” *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1359–1365.

Hirayama, K., Rafter, J. (2000), “The role of probiotic bacteria in cancerprevention,” *Microbes and Infection*, **2**, 681-686.

Hoesl, C.E., Altwein, J.E. (2005), “The probiotic approach: an alternative treatment option in urology,” *European Urology*, **47**, 288–296.

Hoyos, A.B. (1999), “Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit,” *Int. J. Infect. Dis.*, **3**, 197–202.

Hugas, M. (1998), “Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation meat and meat products,” *Meat Science*, **49:1**, 139-150.

Iacono, A., Raso, G.M., Canani, R.B., Calignano, A., Meli, R. (2011), “Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, **22:8**, 699-711.

Isolauri, E. (2001), “Probiotics in human disease,” *Am. J. Clin. Nutr.*, **73:11**, 1142-1146.

Iyer, C., Kusters, A., Sethi, G., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., Versalovic, J. (2008), “Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kB and MAPK signalling,” *Cellular Microbiology*, **10:7**, 1442-1452.

İnal T. (1990), *Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi*, Final Ofset, İstanbul.

Jakoby, B.W. ve Pastan, H.I. (1979), *Cell Culture*, Academics Pres Ltd., San Diego, USA, **642**.

Johnston, M.A., Delwiche, E.A. (1965), “Distribution and characteristics of the catalases of Lactobacillaceae,” *Journal of Bacteriology*, **90**, 347–351.

- Kam,N.P., Albright, E., Mathur, S., Field, F.J. (1990), “Effect of lovastatin on acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase (ACAT) activity and the basolateral-membrane secretion of newly synthesized lipids by CaCo-2 cells,” *Biochem. J.*, **272**, 427-443.
- Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A. (2002) “Probiotics: potential pharmaceutical applications,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **15**, 1–9.
- Kılıç S. (2001), *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri Lactobacillus*, E.Ü. Ziraat Fak., Süt Teknolojisi Bölümü.
- Kim, J.Y., Woo, H.J., Kim, K.H., Kim, E.R., Jung, H.K., Juhn, H.N., Lee, H.J. (2002a), “Antitumor activity of *Lactobacillus plantarum* cytoplasm on teratocarcinoma- bearing mice,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12:6**, 998-1001.
- Kim, J.Y., Woo, H.J., Kim, Y.S., Lee, H.J. (2002b), “Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines,” *Biotechnology Letters*, **24**, 1431-1436.
- Kim, Y., Lee, D., Kim, D., Cho, J., Yang, J., Chung, M., Kim, K., Ha, N. (2008), “Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212,” *Arch. Pharm. Res.*, **31:4**, 468-473.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998), “Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria,” *International Journal of Food Microbiology*, **41**, 103–125.
- Klinder, A., Forster, A., Caderni, G., Femia, A.P., Pool-Zobel, B.L. (2004), “Fecal water genotoxicity is predictive of tumor preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination,” *Nutrition and Cancer*, **49**, 144–155.

- Knasmüller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C., Kassie, F. (2001), "Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines," *Mutation Research*, **480-481**, 129–138.
- Koller V.J., Marian, B., Stidl, R., Nersesyanyan, A., Winter, H., Simic, T., Sontag, G., Knasmüller, S. (2008), "Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells," *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 1221–1229.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., Zilmer, M. (2003), "Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects," *British Journal of Nutrition*, **90**, 449–456.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A. (2002), "Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics," *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 215–224.
- Langdon, S.P., (2004), *Cancer Cell Culture, Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Lee, D.K., Jang, S., Kim, M.J., Kim, J.H., Chung, M.J., Kim, K.J., Ha, N.J. (2008), "Anti proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines," *BMC Cancer*, **8**, 310.
- Lee, J.W., Shin, J.G., Kim, E.H., Kang, H.E., Yim, I.B., Kim, J.Y., Joo, H.G., Woo, H.J. (2004), "Immunomodulatory and antitumor effects *in vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*," *J. Vet. Sci.*, **5:1**, 41–48.
- Lee, N.K., Park, J.S., Park, E., Paik, H.D. (2007), "Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine," *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 274-278.

- Lee, D.K., Jang, S., Kim, M.J., Kim, J.H., Chung, M.J., Kim, K.J., Ha, N.J. (2008), "Anti proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines," *BMC Cancer*, **8**, 310.
- Lewus, B.C., Kaiser, A., Montville, T.J. (1991), "Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat," *Appl. Environ. Microbiol.*, **57:6**, 1683-1688.
- Lim, B.K., Mahendran, R., Lee, Y.K., Bay, B.H. (2002), "Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the Mouse," *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 36–41.
- Lim, H.S., Park, K.O., Nishizawa, N., Bae, S.O., Choi, M.R. (2008), "Cytotoxicity of extracts from dolsan leaf mustard kimchi treated with lactic acid bacteria on lung and gastric cancer cells," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**, 174-181.
- Lin, M.Y., Chang, F.J. (2000), "Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356," *Digestive Diseases and Sciences*, **45:8**, 1617-1622.
- Lin, M.Y., Yen, C.L. (1999), "Antioxidative ability of lactic acid bacteria," *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1460–1466.
- Liong, M.T. (2008), "Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in-vivo evidence," *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, 854-863.
- Liong, M.Y. (2007), "Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesteroleemics, and perimenopausal treatments," *Nutrition Reviews*, **65:7**, 316–328.
- Liu, C.F., Pan, T.M. (2010), "*In vitro* effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity," *Journal of Food and Drug Analysis*, **18:2**, 77-86.

- Liu, C.T., Chu, F.J., Chou, C.C., Yu, R.C. (2011), “Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01,” *Mutation Research*, **721**, 157–162.
- Ljungh, Å., Wadström T. (2006), “Lactic acid bacteria as probiotics,” *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, **7**, 73–90.
- Madigan, M.T., Matrinko, J.M., Stahl, D., Clark, D. (2011), *Brock Biology of Microorganisms*, Thirteenth Edition, Pearson Education.
- Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H., Turnbaugh, P.J., Fulton, R.S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K., Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Crock, L.W., Russell, A., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L., Gordon, J.I. (2009), “Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla,” *PNAS*, **106:14**, 5859-5864.
- Majamaa, H., Isolauri, E. (1996). “Evaluation of the gut mucosal barrier: Evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 985-90.
- Mariadason, J.M., Pickard, K.L., Barkla, D.H., Augenlicht, L.H., Gibson, P.R. (2000), “Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation,” *Journal of Cellular Physiology*, **183**, 347–354.
- Matsuzaki, T. (1998), “Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota,” *International Journal of Food Microbiology*, **41**, 133-140.
- Matsuzaki, T., Chin, J. (2000), “Modulating immune responses with probiotic bacteria,” *Immunology and Cell Biology*, **78**, 67–73.
- McIntosh, G.H., Royle, P.J., Playne, M.J. (1999), “A probiotic Strain of *L.acidophilus* Reduces DMH-Induced Large Intestinal Tumors in Male Sprague –Dawley Rats,” *Nutrition and cancer*, **35:2**, 153-159.

- Meydani, S.N., Ha, W.K. (2000), “Immunologic effects of yoğurt,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 861–872.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L., Corthésy-Theulaz, I. (1999), “Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans,” *Digestion*, **60**, 203–209.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K. (1996), “Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria,” *Infection and Immunity*, **64:12**, 5403–5405.
- Moreno, A., Matar, C., Perdigon, G. (2007), “The application of probiotics in cancer,” *British Journal of Nutrition*, **98:1**, 105–110.
- Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Yoshikai, Y. (2000), “Antitumor effect of heat killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice,” *Cancer Immunol Immunother*, **49**, 157-164.
- Naidu, A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. (1999), “Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB),” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **38:1**, 13-126.
- Németh, E., Halász, A., Baráth, Á., Gálfı, P. (2007), “Influence of lactic acid bacteria and their spent culture supernatant on hydrogen peroxide-induced interleukin-8 synthesis and necrosis of Caco-2 cells,” *Food and Agricultural Immunology*, **18:2**, 95-105.
- O’Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F. (1999), “Expression and regulation of the human b-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium,” *The Journal of Immunology*, **163**, 6718–6724.

- Oberreuther-Moschner, D.L., Jahreis, G., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L. (2004), "Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells," *British Journal of Nutrition*, **91**, 925–932.
- Oelschlaeger, T.A. (2010), "Mechanisms of probiotic actions – A review," *International Journal of Medical Microbiology*, **300**, 57–62.
- Oktar, N. (2009), *K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolum bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Orlando, A., Messa, C., Linsalata, M., Cavallini, A., Russo, F. (2009), "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines," *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **31:1**, 108-116.
- Osset, J., Bartolome, R.M., Garcí'a, E., Andreu, A. (2001), "Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells," *The Journal of Infectious Diseases*, **183**: 485–91.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M.M., Isolauri, E., Salminen, S.J. (1999), "Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus," *Int. Dairy J.*, **9**, 623–630.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002), "Probiotics: an overview of beneficial effects," *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 279–289.
- Özban, N., (1988), *Hücre*, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 37-38.
- Özbaş Y. (1993), "Bifidobakterler'ler ve *Lactobacillus acidophilus*: özellikleri, diyetetik amaçlar için kullanımları, yararlı etkileri ve ürün uygulamaları," *Gıda Tekn. Dergisi*, **18:4**, 247-251.

- Özdemir, K.G. (2007), “*Farklı yumuşak astar materyallerinin sitotoksitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi,*” Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özer, D. ve Akalın, M.S. (2000), “Probiyotik fermente süt ürünleri ve probiyotikler,” VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 273-277.
- Packey, C.D., Sartor, R.B. (2009), “Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases,” *Current Opinion in Infectious Diseases*, **22**, 292–301.
- Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S., Wingo, P.A. (1996), “Cancer Statistics,” *Ca-A cancer Journal for Clinicians*, **65**, 5-27.
- Paolillo, R., Carratelli, C.R., Sorrentino, S., Mazzola, N., Rizzo, A. (2009), “Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells,” *International Immunopharmacology*, **9**, 1265-1271.
- Parente, E., Ricciardi, A. (1999), “Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 628-638.
- Park, H.D., Rhee, C.H. (2001), “Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from *kimchi* Korean fermented vegetables,” *Biotechnology Letter*, **23**, 1583-1589.
- Penders, J., Stobberingh, E.E., Van den Brandt, P.A., Thijs, B.C. (2007), “The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders,” *Allergy*, **62**, 1223–1236.
- Penner, R., Fedorak, R.N., Madsen, K.L. (2005), “Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases,” *Current Opinion in Pharmacology*, **5**, 596-603.

- Perdigon, G., de Macias, M.E.N., Alvarez, S., Oliver, G., de Ruiz Holgado, A.P. (1988), "Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*," *Immunology*, **63**, 17-23.
- Pereira, D.I.A., Gibson, G.R. (2002), "Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37:4**, 259–281.
- Possemiers, S., Grootaert, C., Vermeiren, J., Gross, G., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2009), "The intestinal environment in health and disease – recent insights on the potential of intestinal bacteria to influence human health," *Current Pharmaceutical Design*, **15**, 2051-2065.
- Rafter, J. (1995), "The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention," *Scand. J. Gastroenterol.*, **30**, 497-502.
- Rafter, J. (2002), "Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective," *British Journal of Nutrition*, **88**, 89-94.
- Rafter, J. (2003), "Probiotics and colon cancer," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **17:5**, 849-859.
- Rafter, J. (2004), "The effects of probiotics on colon cancer development," *Nutrition Research Reviews*, **17**, 277-284.
- Raven, P.H., Johnson, G.B. (1992), *Biology*. Third Edition, St. Louis, MO: Mosby Year Book.
- Reddy, B.S., Rivenson, A. (1993), "Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, a food mutagen," *Cancer Research*, **53**, 3914-3418.
- Reid, G. (1999), "The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*," *Applied and Environmental Microbiology*, **65:9**, 3763–3766.

- Reid, G., Bruce, A.W. (2001), "Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications," *The Journal of Infectious Diseases* **183:1**, 77–80.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010), "Non-dairy probiotic products," *Food Microbiology*, **27**, 1–11.
- Rodgers, S. (2008), "Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures," *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 188-197.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonde'n, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000), "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties," *Journal of Biotechnology*, **84**, 197–215.
- Saikali, J., Picard, C., Freitas, M., Holt, P.R. (2004), "Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer," *Nutrition and Cancer*, **49:1**, 14–24.
- Salminen, S., Ouwehand A.C., Isolauri, E. (1998a), "Clinical applications of probiotic bacteria," *Int. Dairy Journal*, **8**, 563-572.
- Salminen, S., Von Wrigh, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos, W.M., onde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. (1998b), "Demonstration of safety of probiotics — a review," *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 93–106.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A.; Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I. (1998c) "Functional food science and gastrointestinal physiology and function," *British Journal of Nutrition*, **80:1**, 147-171.
- Saltan, N. (2009), "*Kanserli hücrelerde folik asit içeren magnetik nanopartikül etkileşimi*," Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Sanders, M.E. (1999), "Probiotics," *Food Technology*, **53:11**, 67-77.

- Sanders, M.E., Veld, J.H. (1999), “Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues,” *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 293–315.
- Schillinger, U. (1999), “Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage,” *Int. J. Food Microbiol.*, **47**, 79–87.
- Schrezenmeir J., Vrese, M. (2001), “Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition,” *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 361–364.
- Schultz, M., Linde, H.J., Lehn, N., Zimmermann, K., Grossmann, J., Falk, W., Scholmerich, J. (2003), “Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers,” *Journal of Dairy Research*, **70**, 165–173.
- Shah, N.P. (2007), “Functional cultures and health benefits,” *Int. Dairy J.* **17**, 1262–1277.
- Shahani, K.M., Ayebo, A.D. (1980), “Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal Microecology,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, **33**, 2448-2457.
- Sheih, Y.H., Chiang, B.L., Wang, L.H., Liao, C.K., Gill, H.S. (2001), “Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001,” *Journal of the American College of Nutrition*, **20: 2**, 149–156.
- Sheil, B., McCarthy, J., O’Mahony, L., Bennett, M.W., Ryan, P., Fitzgibbon, J.J., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F. (2004), “Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis,” *Gut*, **53**: 694–700.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M. Shimamura, S., Ishibashi, N., Reddy, B.S. (1997), “*Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal

bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis,” *Carcinogenesis*, **18:4**, 833–841.

Spiller R, Garsed K. (2009), “Infection, inflammation, and the irritable bowel syndrome,” *Dig. Liver Dis.*, **41:12**, 844-849.

Terahara, M., Meguro, S., Kaneko, T. (1998), “Effects of Lactic Acid Bacteria on Binding and Absorption of Mutagenic Heterocyclic Amines,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62:2**, 197-200.

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

Toklu, G.Ş. (1999), “Fermente süt ürünleri ve probiyotikler,” *Gıda Bil. ve Tekn.*, **4 (2)**, 4-6.

Trachoo, N., Boudreaux, C., Moongngarm, A., Samappito, S., Gaensakoo, R. (2006), “Effect of germinated rough rice media on growth of selected probiotic bacteria,” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9:14**, 2657-2661.

Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E., Testai, E., Stammati, A. (2011), “Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human?,” *Toxicology in Vitro*, **25**, 13–20.

Van't Veer, P., Dekker, J.M., Lamers, J.W.J. (1989), “Consumption of Fermented Milk Products and Breast Cancer: A Case-Control Study in the Netherlands,” *Cancer Research*, **49**, 4020-4023.

Verschure, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000), “Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture,” *Microbiology and molecular biology reviews*, **64:4**, 655-671.

Weid, T., Bulliard, C., Schiffrin, E.J. (2001), “Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD41 T cells with low proliferative capacity that

produce transforming growth factor b and interleukin-10,” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8:4**, 695–701.

Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L. (2001), “Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer,” *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 451-455.

Yaman, H. (2000), *Partial characterisation of lactobacilli isolated from commercial kefir grain*, Doktora tezi, Huddersfield University, Huddersfield, UK.

Zabala, A., Martín, M.R., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Morales, P. (2001a), “Anti proliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line,” *Applied Microbiology*, **32**, 287-292.

Zabala, A., Martín, R., Haza, A., Fernández, L., Morales, P., Rodríguez, J.M. (2001b), “Inhibition of the proliferation of myeloma cells by the meat origin strain *Enterococcus faecium* CH3,” *Meat Science*, **59**, 79-85.