ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA KOLİT TEDAVİSİNDE AĞIZDAN VERİLEN CANLI VE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ *Pediococcus pentosaceus* OZF SUŞUNUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Zhanatgul SAKYP

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2013

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Zhanatgul SAKYP tarafından hazırlanan ''**Sıçanlarda Kolit Tedavisinde Ağızdan Verilen Canlı ve Enkapsüle Edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF Suşunun Etkisinin Araştırılması**'' adlı tez çalışması 26.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr.İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIÇANLARDA KOLİT TEDAVİSİNDE AĞIZDAN VERİLEN CANLI VE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ *Pediococcus pentosaceus* OZF SUŞUNUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Zhanatgul SAKYP

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Çalışmamızda daha önceki çalışmalarda anne sütünden izole edilerek moleküler teknikler neticesinde *Pediococcus pentosaceus* OZF olarak tanımlanan ve probiyotik olduğu belirlenen suşun kolit hastalığı üzerinde tedavi edici/önleyici etkisinin olup olmadığı amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, probiyotik bir suş olan *P. pentosaceus* OZF'nin hem canlı hem de enkapsüle edilmiş formu (aljinat+kalsiyum+peynir altı suyu proteinleri) trinitrobenzin sülfonik asit (TNBS) ile kolit oluşturulan sıçanlar üzerinde denenmiştir. 14.gün sonunda ötanaziye tabi tutulan sıçanlardan elde edilen kan, dalak ve kolon örneklerinden RNA izole edilerek, cDNA eldesi ve akabinde qPZR yapılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen verilere göre *P. pentosaceus* OZF suşunun diğer antioksidan enzimlere gerek duymadan kendisi antioksidan etki göstererek inflamasyonu azalttığı, dolayısıyla antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Kolit gruplarına canlı suşun uygulamasına müteakip pro-inflamatuvar etki gösteren IL1β ve IL6 gibi sitokinlerin miktarında azalma olduğu saptanmış, bununla beraber kapsüle edilmiş OZF suşunun kolit hastalığı üzerinde olumlu herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Temmuz 2013, 87 sayfa

Anahtar kelimeler: Probiyotik, kolit, enkapsülasyon, *Pediococcus pentosaceus*

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ORAL ADMINISTRATIONS OF LIVE AND ENCAPSULATED *Pediococcus pentosaceus* OZF STRAIN ON TREATMENT OF COLITIS IN RATS

Zhanatgul SAKYP

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

In our study, whether the strain , which were isolated from breast milk in the previous studies, defined as *Pediococcus pentosaceus* OZF as a result of molecular techniques and determined as probiotic , has any therapeutic / preventive impact on colitis disease was aimed.Within this study, both live strain and the encapsulated form (alginate+calcium,+whey proteins) of *Pediococcus pentosaceus* OZF which is a probiotic strain was tested in rats which were induced colitis disease using trinitrobenzin sulfonic acid (TNBS).RNA isolated from blood, spleen and colon samples that obtained from the rats were subjected to euthanasia at the end of 14. day , cDNA was synthesized and then qPCR was performed. According to the data obtained from all groups, *Pediococcus pentaceus* OZF strain itself, reduces inflammation by indicating antioxidant effect without the need for the other antioxidant enzymes , and therefore found to have anti-inflammatory effect. Following the implementation of live strains to the colitis groups , in the amount of cytokines such as IL1b and IL6 acting as pro-inflammatory were decreased, however, encapsulated OZF strain did not have any positive effect on the colitis disease.

July 2013, 87 pages

Key Words: Probiotic, colitis, encapsulation, *Pediococcus pentosaceus*

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2.KAYNAK ÖZETLERİ **3**

2.1 PROBİYOTİKLER **3**

2.1.1 Probiyotiklerin Etki Mekanizması **5**

2.1.2 Probiyotiklerin Kullanım Alanları **7**

2.2 PROBİYOTİKLERİN ETKİLERİ **8**

2.2.1 Probiyotiklerin İntestinal Flora Üzerindeki Etkisi **8**

2.2.2 Probiyotiklerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri **8**

2.2.3 Probiyotiğin İmmünomodülatör Etkisi **9**

2.3 İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIĞI **11**

2.3.1 Probiyotiklerin İBH'de etki mekanizması **12**

2.3.2 Crohn Hastalığı (CH) **13**

2.3.3 Kolit Hastalığı **15**

2.3.3.1 Kolit Tedavisinde Probiyotiklerin Kullanılması **17**

2.3.3.2 Probiyotiğin konakçı üzerinde etkisini araştırmada kullanılan kolit modelleri **18**

2.3.3.2.1 Dekstran sülfat sodyum (DSS) modeli **19**

2.3.3.2.2Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) modeli **19**

2.4 Enkapsülasyonun amaçları **20**

2.4.1 Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri **22**

2.4.1.1 Aljinat ····· **22**
2.4.1.2 K-karagenan ····· **23**
2.4.1.3 Kitosan ····· **23**
2.4.1.4 Nişasta ····· **24**
2.4.1.5 Jelan gam ve ksantan gam ····· **24**
2.4.1.6 Süt proteinleri ····· **24**
2.4.2 Probiyotik bakterilerin enkapsülasyon uygulamalarında kullanımı ····· **25**
3. MATERYAL VE YÖNTEM ····· **27**
3.1 Materyal ····· **27**
3.1.1 Bakteri kültürleri ····· **27**
3.1.2 Deney hayvanlarının temini ····· **27**
3.1.3 Bakteri aktivasyonu ve gelişimi için kullanılan besiyer ····· **28**
3.1.4 Tampon ve Çözeltiler ····· **28**
3.1.5 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu ····· **28**
3.2 Yöntem ····· **29**
3.2.1 Bakterilerin aktifleştirlmesi ····· **29**
3.2.2 Enkapsülasyon ····· **29**
3.2.3 Sıçanlarda deneysel kolit oluşumu ····· **30**
3.2.4 Dokuların ve kan örneklerinin hazırlanması ····· **33**
3.2.5Histolojik değerlendirme ····· **34**
3.2.6RNA izolasyonu ····· **34**
3.2.7 cDNA'nın elde edilmesi ····· **35**
3.2.8 qRT-PZR ····· **35**
3.2.9 Enzim aktivitesi ····· **36**
3.2.9.1 Protein miktar ölçüm yöntemi ····· **37**
3.2.9.2 Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüm yöntemi ····· **38**
3.2.9.3 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüm yöntemi ····· **39**
3.2.9.4 Katalaz (KAT) aktivitesi ölçüm yöntemi ····· **40**

3.2.9.5 Glutatyon peroksidaz (GSH-P_X) aktivitesi ölçüm yöntemi ····· 40

3.2.10 Hesaplamalar ve istatistiksel analizler ····· 41

4. BULGULAR ····· 42

4.1Histopatolojik değerlendirme····· 42

4.2 Doku ve kan örneklerinden RNA izolasyonu ve miktar tayini ····· 53

4.3 cDNA sentezi ····· 55

4.4 qRT-PZR ile gen (IL1β ve IL6) ekspresyonlarının analizi ····· 55

4.5 Enzim aktiviteleri····· 62

5. TARTIŞMA VE SONUÇ····· 65

KAYNAKLAR ····· 66

EKLER····· 78

EK 1 Etik kurul kararı ve deney hayvanları kullanım sertifikası····· 79

EK 2 Bakteri gelişimi için kullanılan besiyeri içeriği ····· 82

EK 3 Tampon ve çözeltiler ····· 83

EK 4 cDNA sentez protokolü····· 87

ÖZGEÇMİŞ ····· 88

SİMGELER DİZİNİ

İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
ÜK	Ülseratif kolit
CH	Crohn hastalığı
İBS	İnflamtauvar bağırsak sendromu
VSL#3	Karışık probiyotik kombinasyonu
Ig	immünoglobülin
IL	İnterlökin
IFN-γ	İnterferon gamma
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa
TGF-beta	Transforming growth factor-beta
TLR	Tool benzeri reseptör
Th	T yardımcı (T helper)
TNBS	Trinitrobenzene sülfonik asit
CFU	Koloni oluşturan birim
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
DSS	Dekstran sülfate sodyum
GİS	Gastrointestinal sistem
DNA	Deoksiribonükleik asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
LAB	Laktik asit bakterileri
pH	Potensiyel Hidrojen

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Probiyotik Olarak Bilinen Mikroorganizmalar ····· 4
Çizelge 2.2 Probiyotilerin Etki Mekanizması ····· 6
Çizelge 2.3 Biyoteknolojik ve gıda uygulama alanında kullanılan kapsülleme teknolojisi ····· 26
Çizelge 3.1 qPZR'de kullanılan primerler ····· 36
Çizelge 3.2 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan qPZR protokolü ····· 37
Çizelge 3.3 Protein miktar ölçüm yöntemi ····· 37
Çizelge 3.4 MDA düzeyi ölçüm yöntemi ····· 38
Çizelge 3.5 SOD aktivitesi ölçüm yöntemi ····· 39
Çizelge 3.6 GSH-Px aktivitesi ölçüm yöntemi ····· 40
Çizelge 4.1 Çalışmaya dahil edilen hayvanlar ve ait oldukları gruplar ····· 42
Çizelge 4.2 Örneklerden izole edilen RNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları ····· 53
Çizelge 4.3 Örneklerden izole edilen cDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları ····· 56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Sodyum aljinat ile enkapsülasyon yöntemi ····· 29

Şekil 3.2 Sıçanların kafeslere yerleştirilmesi ····· 32

Şekil 3.3 Rektal yoldan kanül yardımıyla TNBS uygulaması ····· 32

Şekil 3.4 TNBS uygulandıktan sonra baş aşağı tutulması ····· 33

Şekil 4.1 Sağlıklı (a) ve hasta (b) kontrol gruplarına ait makroskobik kolon örnekleri ····· 41

Şekil 4.2 Lamina propriada mononüklear hücre infiltrasyonu ve epitel hücrelerinde dökülmeler, HE, x100 ····· 43

Şekil 4.3 Lamina propriada mononüklear hücreler ve submukozada hiperemik damar, HE, x100 ····· 44

Şekil 4.4 Lamina propriada ödem, mononüklear hücreler ve submukozada hiperemik damarlar, HE, x100. ····· 45

Şekil 4.5 Parazit larvası kesiti (P) ve mononüklear hücre infiltrasyonu (a), HE, x100 ····· 46

Şekil 4.6 Lamina propriada ödem, mononüklear ve nötrofil eozinofil hücreler ve submukozada hiperemik damarlar, HE, x100 ····· 47

Şekil 4.7 Nekroz ve nötrofil lökosit infiltrasyonları, tunika serozada mononüklear hücre infiltrasyonu ve fibrosis, HE, x100 ····· 48

Şekil 4.8 Tunika serozaya kadar yayılmış mononüklear hücre infiltrasyonu ve eozinofil lökositler, HE, x100 ····· 48

Şekil 4.9 Nekroz ve nötrofil lökosit infiltrasyonları, HE, x100 ····· 50

Şekil 4.10 Tunika serozada ödem, mononüklear hücre infiltrasyonu, damarlaşma, HE, x100 ····· 51

Şekil 4.11 Kan, kolon ve dalak örneklerinen elde edilen RNA'nın %1,5 agaroz jel görüntüsü ····· 52

Şekil 4.12 Kan örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 55
Şekil 4.13 Kolon örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 58
Şekil 4.14 Dalak örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 59
Şekil 4.15 Kan örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 59
Şekil 4.16 Kolon örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı (a) ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 60
Şekil 4.17 Dalak örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı (a) ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu ····· 61
Şekil 4.18 SOD enzim aktivitesi sonuçları ····· 62
Şekil 4.19 GSH-Px enzim aktivitesi sonuçları ····· 63
Şekil 4.20 MDA enzim aktivitesi sonuçları ····· 63
Şekil 4.21 KAT enzim aktivitesi sonuçları ····· 64

1. GİRİŞ

İntestinal sistem içinde konak ve mikroflora arasında hassas bir denge bulunmaktadır. Mikroflora konağı mukozal immün sistemi ile iletişim içerisindedir. Kolit ve Crohn hastalığının da dahil olduğu inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) ise bu dengenin bozulması neticesinde oluşan ve intestinal mukozada inflamasyon ile meydana gelen kronik bir hastalık grubudur, intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, bozulmuş immün cevapla ilerleyen, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. Bu tür hastalıklar sindirim sisteminde inflamasyon oluşturarak doku yıkımına neden olmaktadırlar ve klinik olarak ortaya çıkmaktadır. İBH'nın etiyolojisi tam olarak açıklanamamaktadır

İBH'lı hastalarda bağırsak mikroflorasının normal kişilerden farklı olduğu ve hastaların serumlarında bazı bakterilere karşı etkili antikorlar bulunduğu bilinmektedir. Hastaların antibiyotik tedavisinden yarar görmeleri, bozulmuş bakteri florası hastalığın ortaya çıkmasında ve devam etmesinde rolü olduğuna işaret etmektedir. Patogenezi açıklamaya yönelik çalışmalara paralel olarak tedavide de yeni ajanlar denenmektedir. Son dönemlerde İBH tedavisinde en ilgi çeken konulardan biri probiyotiklerin kullanımıdır. Probiyotikler mikrobiyal floranı düzenleyerek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulunan canlı mikroorganizmalardır (Martins vd. 2004). Probiyotikler, bağrsak bakteri florasının değiştirilmesinde antibiyotiklere alternatif bir yol olarak güvenli bir seçimdir (Zwolińska-Wcisło vd. 2007). Probiyotiklerin mukozal ve sistemik sitokin parameternini de değiştirdiği bilinmektedir. Probiyotikler bağırsak mukozası ve sistemik sitokin parameternini module ederek İBH'nın iyileşmesine katkıda bulunabilirler (Matsuzaki vd. 1998).

Ancak probiyotik bakterilerin sindirim sisteminin koşullarrına dayanıklı olabilmelidir.

Bununla birlikte birçok probiyotik bakterinin yüksek asitlik ve safra tuzlarına karşı hayatta kalma kabiliyeti azdır (Holzapfel vd. 2001). Probiyotik üretimindeki karşılaşan bunun gibi zorlulukların azaltılması amaçta enkapsülasyon yöntemi gıda endüstrisinin üzerinde önemle durduğu bir yöntemdir. Enkapsülasyon yönteminin amacı, probiyotik mikroorganizmaların çevresinde fiziksel bir ortam hazırlayarak olumsuz çevre koşullarına karşı mikroorganizmaların canlılığını korumaktır. Bu yöntemde aktif mikroorganizma çevresinde çesitli biyopolimerler kullanarak koruyucu bir film veya kaplama tabakası oluşturmaktır (Sultana vd. 2000; Poncelet. 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunanca anlamda ‘yaşam için’ demektir. Probiyotik tanımı 1965 yılında ilk olarak Lilly ve Stillwell tarafından başka mikroorganizmaların üremesini engelleyen mikroorganizmalar tarafından üretilen büyüme destekleyici metabolit faktörler olarak tanımlamışlardır (Marteau 2006). Probiyotiklerle ilk çalışan, “yaşlanmada uzun ömürlülük” teorisiyle 1907 yılında Nobel ödülü kazanan Rus biyoloğu Elie Metchnikoftur. Metchnikof laktobasilleri içeren gıdaları tüketen insanların daha sağlıklı olduğunu göstermiştir. 1989 yılında Fuller ise probiyotikleri konukçunun intestinal mikrobiyal florasına olumlu etkileri olan canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlamıştır. Probiyotiklerin bağırsak bakteri florasının değiştirilmesine güvenli bir seçenek olduğuna iligili kanıtlar son yıllarda artmaktadır. Probiyotikler, FAO ve WHO tarafından “yeterli miktarlarda tüketildiğinde konakçının sağlık kazanmasını sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamaktadır (Guarner ve Schaafsma, 1998). Probiyotiklerin bağırsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabet ederek patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri, bakteriyosin olarak bilinen antimikrobiyal maddeler üretmeleri ve sindirim için gerekli bazı enzimleri salgılayarak sindirime yardımcı olmaları ayrı bir özellikleridir (Bengmark 2003).

Probiyotikler normalde bağırsak florasında bulunan ve laktik asit üreten bakteriler (*Lactobacilli, Streptococci, Bifidobacteria*) ile normalde florada bulunmayan mayalardan (*Saccharomyces boulardii*) oluşur (Çizelge 2.1) (Penner vd. 2005). Probiyotiklerin etki mekanizmalarına geçmeden önce intestinal mikrofloranın dağılımının bilinmesi gereklidir. İntestinal flora tek başına 400’den fazla bakteriye ev sahipliği etmektedir. Bu bakterilerin birçoğu kültürde üretilemez (Gibson 1999). Üst

gastrointestinal sistemde aerobik ve gram pozitif mikroorganizmalar çokken, distal bağırsak kısımlarında, anaerobik bakteriler (*Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus* ve *Clostridium*) artmaktadır. Kolon içinde anaerobik bakteri yoğunluğu artmaya devam eder ve 10^{11} -10^{12} CFU/g düzeyine ulaşır.

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar

Lactobacilli	*Bifidobacteri*	*Diğerleri*	*Mantarlar*
L.acidophilus	*B.bifidum*	*Streptococcuc thermofilus*	*Saccharomyces cerevisiae*
L.casei	*B.infantis*	*Enterecoccus faecium*	*Saccharomyces boulardii*
L.delbruckeii supp	*B.lognum*	*Lactococcus lactis*	
L. bulgaricus	*B.thermophilum*	*Propionibaterium freudenreichii*	
L.reuteri	*B.adolescents*	*Escherichia coli* Nissle 1917	
L.brevis	*B.lactis*	*Bacillus clasuii*	
L.cellobiosus	*B.animalis*	*Bacillus oligonitrophilis*	
L.curvatus	*B.breve*		
L.fermentum			
L.plantarum			
L.rhamnosus (GG)			
L.salivarius			
L.gasseri			
L.johnsonii			
L.helviticus			
L.farciminis			

İntestinal sistemde konak ve mikroflora arasında denge vardır. Mikroflora konağının mukozasında immün sistemi ile iletişimdedir. İBH'da ise bu hassas denge bozulur. Eğer mikroflora kompozisyonu egzojen bakteriler ile değiştirilebilirse hasar azaltılabilir.

Başlıca probiyotikler etkilerini antimikrobiyal ürünler salgılayarak, immünmodülasyon yaparak gösterirler.

2.1.1 Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Probiyotikler genel anlamda bağırsak mukozasında tutunma bölgeleri için patojen olma potansiyeli taşıyan mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engeller ve patojene karşı bakteriyosin etkisini göstermektedir. Probiyotiklerin İBH'daki etkinliğini açıklayabilen veriler bulunmaktadır. Son zamanlarda İBH'lı olguların bağırsak lümeninde bulunan antijenlere, özellikle kommensal bakterilere ve onların ürünlerine karşı agresif bir immün cevabın geliştiğini gösteren birçok kanıt elde edilmiştir. İntestinal inflamasyon ve lezyonların oluşmasında mukozal immün sistemin ve inflamasyonun modülasyonunda sitokinlerin merkezi rolü vardır. Klinikte İBH hastalarından alınan biyopsilerde, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-γ ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler artarken, IL-4, IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin baskılandığı saptanmıştır. Deneysel olarak dextran sulfate sodium (DSS) ile uyarılan kolitin kronikleşmesinde proinflamatuvar sitokinler TNF-α ve IFN-γ'nın rol aldığı gösterilmektedir (Obermeier vd. 1999).

Probiyotikler oral olarak uygulandıktan sonra etkilerini farklı yollarla gösterebilmektedir. Örneğin VSL#3 (karışık probiyotik kombinasyonu olup içeriğinde dört farklı *Lactobacillus* suşu + üç farklı *Bifidobacteria* + bir tane *Streptococcus thermophilus* bulunmaktadır), TLR-9 (Toll-like receptor)'a bağlanarak etki gösterir. TLR-9, mikroorganizmaların moleküler ürünlerine karşı tanıma ve cevabı sağlamada dolayısıyla intestinal homeostazın devamlılığında rol oynayan reseptör ailesinin bireyidir. Ayrıca VSL#3, NF-kB aktivasyonunu ve dolayısıyla inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe eder (Tamime 2002). Probiyotiklerin gastrointestinal floraya

yerleşmesi ile beraber periferik kandaki lökositlerin bakterilere karşı fagositoz yeteneğini arttırması tedavide başlıca rol oynamaktadır. Bunu proinflamatuar sitokinleri (IL-12, IL-6, TNF-α ve IFN-γ) azaltarak ve anti-inflamatuvar (IL-10) mediatörleri arttırarak sağlar. Bununla birlikte bazı probiyotikler immünglobülin üretimini düzenleyerek etki gösterir. Bağırsak mukozasında IgA ve IgM salgısını arttırarak immünolojik bariyeri kuvvetlendirir. Ayrıca allerjenlerin de engelenmesi ve emiliminin engellenmesinde de rol oynarlar (çizelge 2.2) (Kim vd. 2003).

Çizelge 2.2 Probiyotilerin Etki Mekanizması

Tipi	**Etkileri**
Lactobacillus acidophilus LA1	Konak intestinal epiteline yapışarak immün sistemi kuvvetlendirir
Lactobacillus acidophilus NCFB174	Mikroflorayı düzenler, Kabızlık tedavisinde, radyoterapiye baglı ishal tedavisinde kullanılır, fekal mutajenik etkiyi azaltır
Lactobacillus GG ATCC 53013	Antibiyotik, Rotavirüs, *Clostridium difficille* iliskili ishalin önlenmesinde ve Crohn hastalığının tedavisinde kullanılır
Lactobacillus bulgarius	Rotavirus ve viral gastroenterit tedavisinde kullanılır
Bifidobacterium bifidum	Rotavirus ve viral gastroenterit tedavisinde kullanılır
Lactobacillus reuteri	Gastrointestinal florada kolonize olur
Lactobacillus plantarum	Bakteriyel translokasyonu inhibe ederek septik cevabı azaltır, immünsupresif hastalarda kullanılır
Lactobacillus salivarius UCC118	Fekal koliform bakterileri, *Clostridium perfringens* ve enterokok düzeyini azaltır, fare modellerinde tümör gelişimini önlediği görülmüştür
*Bifidobacterium infantis*UCC35624	*Clostridium* türlerinin azalmasını, laktobasil ve bifidobakter türlerinin artmasını sağlar, kandaki fagositer aktiviteyi artırır

2.1.2 Probiyotiklerin Kullanım Alanları

Çok sayıdaki hastalık türlerinde probiyotiklerin etkisi araştırılmaktadır.

Helicobacter pylori enfeksiyonu: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) karsinojenik potansiyeli olan, ülser hastalığına yol açan bir enfeksiyon hastalığıdır. *İn vitro* çalışmalarda birçok *Lactobacillus* türünün *H.pylori*'nin gastrik mukozal adezyonunu ve çoğalmasını azalttığı gösterilmektedir (Penner vd. 2005).

İrritabl Bağırsak Sendromu (İBS): İBS, en sık görülen fonksiyonel Gİ sistem hastalığıdır. Tedavide amaç semptomların (rahatsızlık hissi, ağrı, şişkinlik, gaz, gayta yapmak için aciliyeti) ortadan kaldırılmasıdır. Yapılan çalışmalar probiyotiklerin İBS tedavisinde kullanımının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Kim ve arkadaşları ishal ağırlıklı İBS'da VSL#3 kullanılması ile rahatsızlığın ve şişkinliğin azaldığını göstermektedir (Kim vd. 2003). O'Mahony ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise plasebo grubu ile *L. salivarius* veya *B. infantis* alan grup karşılaştırıldığında, *L. salivarius* alan grupta plasebo ile benzer yakınmalar devam ederken, *B. infantis* alan grupta semptomlarda azalma olduğu görülmüştür (O'Mahony vd. 2005).

İshaller: Probiyotikler günümüzde antibiyotik ilişkili ishaller, infeksiyöz etkenlere bağlı ishal tedvisinde kullanılmaktadır. Yapılan birçok klinik çalışmada oral olarak alınan probiyotiklerin kolonda kolonize olarak patojen mikroorganizmaların sayısını azalttığı ve ishal gelişimini önlediği gösterilmiştir. İnfeksiyöz etkenlere bağlı ishalde de probiyotikler oldukça sık kullanılmaktadır. Özellikle çocuklarda akut enfeksiyöz ishallerin başlıca sebebi olan rotavirüs enfeksiyonlarında kullanılan *Lactobacillus GG*'in enfeksiyon süresini kısalttığını göstermiştir (Van Niel vd. 2002). Diğer *E. coli* türleri ve *Vibrio cholerae*'ya bağlı ishal tedavilerinde probiyotiklerin etkili oldğu gösterilememiştir. Yetişkin gastroenteritlerinde de probiyotik kullanımının daha az etkili

olduğu bilinmektedir (Brown ve Valiere 2004).

İmmün Sistem Fonksiyonlarının Korunması: *L. casei, L. acidophilus* ve *B. bifidus,* IgA salınımını arttırarak mukozal immün cevabı kuvvetlendirirler. Çok sayıda çalışmada mitojenlere karşı dalak hücrelerinde T ve B lenfosit çoğalmasını artırdıkları, sitokin cevabını etkiledikleri ve patojenlerin fagositozunu artırdıkları gösterilmiştir

2.2 Probiyotiklerin Etkileri

2.2.1 Probiyotiklerin intestinal flora üzerindeki etkisi

Epitelyal hücrelerdeki sınırlı sayıdaki yerler için probiyotikler patojen bakteriler ile yarışır, patojenden once epiteliye yapışmaya çalışır. Aynı zamanda patojen bakterilerin üremeleri için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, patojen bakterilerin üremelerini inhibe ederler. Organik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üretirler. Kolonda yağ asidi profilini düzenleyerek intestinal mikroflorayı değiştirebilirler. Probiyotik suşlarının linoleik asiti anti-inflamatuvar ve antikarsinojenik özelliği olan konjuge linoleik asite çevirdiği tespit edilmiştir (Morita vd. 2002).

2.2.2 Probiyotiklerin immün sistem üzerindeki etkileri

Probiyotiklerin immün sistem üzerindeki etkileri, antikor üretimini ve NK hücrelerinin aktivitesini arttırmak, nükleer faktör kappa-B (NF-kB)'yı modüle etmek ve T hücre apoptozisini indüklemekten oluşmaktadır. Probiyotikler genellikle IL-10 ve transforming growth factor-beta (TGF-β) gibi intestinal anti-inflamatuvar sitokin üretimini arttırırken, tümör nekrosiz faktör-alfa (TNF-α), interferon-gama (IFN-γ), IL-8

gibi proinflamatuvar sitokin üretimini azaltmaktadır. Probiyotik tedavisi aynı zamanda proinflamasyonu olan hastalarda IFN-γ ve IL-1α üretiminde düşmeye, indüklenebilir nitrik oksit sentezinde ve jelatinaz aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Ménard vd. 2004). Probiyotikler epitel hücreleri üzerine etki ederek sitokin üretimini değiştirmektedir. Epitelyal hücreler bakteri ve bakteri komponentlerine karşı IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin salgılamasına rağmen, probiyotiklere karşı herhangi bir cevap göstermemektedir. Bazı probiyotikler anti-inflamatuvar cevap gösterirler ve nükleer faktör kappa-B (NF-kB) yolunu inhibe ederler. Probiyotik bakteriler patojenik bakteri DNA'sına karşı sistemik inflamatuvar bakteri cevabını baskılayabilir. İntestinal epitelyal hücreler, birçok antijen sunan molekülü ile kostimülatör molekülleri üretmektedir. Probiyotikler, epitelyal bariyer fonksiyonunu TLR-2 etkileyerek düzenler (Madsen 2006).

2.2.3 Probiyotiklerin immünomodülatör etkisi

Bağışıklık hücreleri tarafından üretilen sitokinler, bağışıklık hücrelerinin aktivasyon düzenlenmesi, büyüme ve farklılaşma ve ayrıca inflamasyon ve immün tolerans süreçlerine katılmaktadırlar. İBH modellerinde yapılan çalışmalarda, farklılaşma ve sitokinler tarafından T-hücrelerinin aktivasyonuna bağlı T-hücreleri arasında bir deregülasyonu göstermektedir (Leon vd. 2006). İBH sıçan modellerinde hücre farklılaşmasını bağırsaktaki immün yanıtın tipi belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Aktif olan T-hücreleri sitotoksik patogenezde önemli rol göstermektedir. Bu aktif sitotoksikler T hücrelerinin epitel hücrelerinin parçalanması ve epitel erozyonları yerinde luminal antijenlerin artması ile proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile inflamatuvar etkisi gösterebilir. Probiyotik bakterileri içeren probiyotik ve mayalanmış süt ürünlerinin birçok yararlı etkileri immüno-modülatör, anti-inflamatuvar aktiviteleri ile ilgili olduğu göz önüne alındığında, bağırsak iltihabının önlenmesi ve/ya tedavisi için önemli aday olarak kullanılmaktadır. Probiyotikler doğrudan bağırsağın

bağışıklık sistemi ya da bağırsak mikrobiyotasında oluşan olumlu değişiklikleri uyararak düzenleyerek hareket edebilir. Bağırsak mikrobiyotasının tolere edici etkisi düzenleyici T hücre tarafından meydana gelmiş olabilirler. Bazı LAB suşlarının, bağırsak mikrobiyotasının aşırı duyarlılığına ve inflamasyonu önlemesine, oral tolerans indüksiyonu teşvik etmesine yardımcı T hücre popülasyonlarının uyarıldığı gösterilmektedir.

TNBS ile inokülenen BALB/c fareleri kullanarak yapılan bir çalışmada, geleneksel yoğurt (*L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*) anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Yoğurt yedirdikten sonra IL-17 ve IL-12 seviyeleri düşerken, bağırsak dokularında esas olarak IL-10 artmış, bağırsağın iltihabı azaltmıştır. Bu sonuçlar yoğurt tüketimi inflamatuvar süreçte bağışıklık hücreleri tarafından üretilen inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını uyarır, bağışıklık yanıtını hafifleştirdiğini göstermektedir. LAB immünomodülatör özellikleri, gastrointestinal bazı inflamatuvar hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için proinflamatuvar sitokinleri baskılaması probiyotik mikroorganizmaların mekanizmalarından biri olabilir. İzole edilen probiyotik suşları hücre bileşenlerinin ayrıca bazı terapötik yararları olabilir. Bakteriyel DNA güçlü imüno-uyarıcı etkilere sahip olduğu gösterimektedir. İnsan ve hayvan çalışmaları sonuçları bazı probiyotik suşlarının başarıyla sitokinler gibi moleküllerin aktivasyonu belirli mukozal bağışıklık yanıtı seviyeleri modüle ederek değiştirebileceğimizi göstermektedir. IL-10 düzeylerini yükselterek ve dolayısıyla inflamatuvar sitokinler TNF-α, IFN-γ gibi sitokinleri azaltarak inflamatuvar hastalıkların ortaya çıkmasını önleyebilmektedir, bazı LAB başarılı bir şekilde geleneksel muameleler ile bir yardımcı tedavi edici olarak kullanılabilmektedir (Del Carmen vd. 2011).

2.3 İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBS)

İnflamatuvar bağırsak hastalığı gastrointestinal sistemde birçok kronik inflamatuvar bozukluklara yol açmaktadır (Manuela ve Radu 2012).

İBH, bağırsakta iltihaplanma ve mukozal doku hasarı ile başlayan, bozulan immün cevapla ilerleyen, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır (Martins ve Peppercorn 2004).

İBH başlığı altında birbiri ile ilişkili olan, ancak farklı hastalıklar olarak tanımlanan kolit ve crohn hastalığı (CH) yer almaktadır. Bu iki hastalığın klinikte endoskopik ve histolojik özellikleri ile birbirine benzemeyen hastalık olduğunu söyleyen kanıtlar vardır. İBH bağırsağın enfeksyondan dolayı iltihaba uğramış olduğu kanıtlanmış bir bağırsak bozukluğuna ait bir terimdir (Baumgart ve Sandborn 2007). İBH büyük olasılıkla patogenezin bağırsak çevreleri içinde genetik, immün yanıtlar ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimi içermektedirler (Guarner 2007). Birçok çalışmada bu hastalıkların patogenezin ve etiyolojisinin bilinmediğini söylemektedir. Bu nedenle, ana-mikroflora etkileşimleri ve bağırsak mikroflorası tarafından gelen yanıtlar İBH'nin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için odak noktası haline gelmiştir. Bunun için en iyi yöntem probiyotik verilmesi ile gerçekleştirilebilir. Probiyotikler sağlık için önemli faydaları olan canlı mikroorganizimalardır. Tipik olarak, *Lactobacillus* ve/veya *Bifidobacterium* gibi çeşitli suşlar yer almaktadır. Başkada bilinen probiotikler patojen olmayan *E.coli* Nissle 1917 ve M-17 gibi suşlar içermektedir (Leo ve Kelly 2010). Probiyotiklerin anti-kolit tedavisinde potensiyel rölünü açıklayan mekanizmalar başka bir yerde ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir. Pro-inflamatuvar sitokinlerin azaltılması (TNF-α, INF-γ) ve düzenleyici sitokinlerin (IL-10) artması gibi immunodülator etkisi olduğunu göstermektedir.

İBH, Birleşik Devletlerde yaklaşık iki milyon insanı etkilemektedir. CH istatistik verilere göre 3,6-8,8/100.000 iken, kolit hastalığı için 3-15/100.000'dir. İBH her yaşdaki insanı etkileyebilir. Hastalık tüm ırkları ve etnik grupları etkilemekle birlikte en sık görüldüğü bölgeler Kuzey Amerika ve Avrupa'dır. Kolit hastalığı sigara içmeyenlerde içenlere göre daha sık görülmesine karşın, CH olanlarda sigara içme sıklığı topluma göre daha yüksektir (Loftus vd. 2002). İBH özellikle yüksek sosyoekonomik koşullardaki toplumda sıkça görülmektedir. Bu durum batılılaşma, diyet değişiklikleri, sigara tüketimi, kimyasal maddelere maruz kalma ve çevresel kirlilik ile ilişkilendirilebilir (Loftus vd. 2002). Hastaların sadece %10'u 18 yaş altındadır. Hastalık kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta görülmektedir (Andres ve Friedman 1999).

2.3.1 Probiyotiklerin İBH'da etki mekanizması

Pek az kontrollü çalışma içeren klinik gözlemler, *in vitro* çalışmalar ve hayvan deneyleri, probiyotik bakterilerin İBH'nın tedavisinde potansiyel bir yerinin olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu organizmaların klinik İBH'da ve deneysel modellerde etki mekanizması hala büyük ölçüde bilinmemektedir. En genel anlamda probiyotiklerin bağırsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabete girerek patojen olma potansiyeli taşıyan mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri ve patojenlere karşı bakteriyosinlerin etkisini gösterebilmelidir. Probiyotiklerin İBH'daki etkinliğini açıklayan veriler de bulunmaktadır. Son yıllarda İBH'lı olguların bağırsak lümeninde bulunan antijenlere, özellikle kommensal bakterilere ve onların ürünlerine karşı agresif bir immün cevabın geliştiğini gösteren birçok kanıt elde edilmiştir. İntestinal inflamasyon ve lezyonların oluşmasında mukozal immün sistemin ve inflamasyonun modülasyonunda sitokinlerin merkezi rolü vardır. Klinikte İBH hastalarından alınan biyopsilerde, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-γ ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinler artarken, IL-4, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin baskılandığı saptanmıştır. Deneysel olarak dextran sulfate sodium (DSS) ile uyarılan kolitin kronikleşmesinde

proinflamatuvar sitokinler TNF-α ve IFN-γ'nın rol aldığı gösterilmiştir (Obermeier vd. 1999). Sitokin paterninin düzeltilmesinin koliti tedavi edici rolü ortaya konmuş, TNF- α antikorları ve IL-10 verilmesinin intestinal inflamasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (Prantera vd. 1996, Targan vd. 1997, Van Deventer vd. 1997). Probiyotikler bağırsak mukozası ve sistemik sitokin paternini module ederek İBH'nın iyileşmesine katkıda bulunabilmektedir. Steidler ve arkadaşları DSS ile uyarılan kolit, farelerde intragastrik verilen IL-10 sekrete eden *Lactococcus lactis*'in kolit gelişmesini önlediğini bildirmişlerdir (Steidler vd. 2000). Probiyotik bakterilerin Th-2 yanıtını güçlendirdiğini destekleyen bir klinik çalışmada, çocuklarda yapılmış ve oral olarak *Lactobacillus rhamnosus* GG tedavisinin serum IL-10 konsantrasyonunu anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır (Pessi vd. 2000). Kolit hastalarına yapılan bir klinik çalışmada da üç bifidobakter suşu içeren probiyotik preparatının TNF-α ve IL-1β ekspresyonunu azalttığı, IL-10 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Cui vd. 2003). Farklı probiyotiklerin, çeşitli organlarda değişik etkileri olabileceğinin kanıtları da vardır. Probiyotiklerin İBH ve kolit modellerinde olumlu etkisinin bir başka mekanizması da bakteriyel translokasyonu engellemek veya azaltmak olabilir. Bağırsağın doğal florası ve mukoza bütünlüğünün korunmuş olması bağırsak lümenindeki patojen bakterilere karşı organizmanın savunmasında en önemli parametrelerdir. İBH'da bu savunma mekanizmalarının bozulması, bakteriyel translokasyona yol açar ve hastalık şiddetinin artmasına neden olur (Gardiner vd. 1993). Ayrıca sıçanlarda DSS ile uyarılan akut kolit modelinde, bazı laktobasil ve bifidobakter suşlarının hastalık aktivitesini anlamlı olarak iyileştirirken bakteriyel translokasyonu azalttığı gösterilmiştir (Osman vd. 2004).

2.3.2 Crohn hastalığı (CH)

Crohn hastalığı ince ve kalın bağırsağı etkileyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Burril Crohn, ilk kez 1932 yılında bu hastalık ile çalışan Amerikan gastroenteroloğu olarak adlandırılır. CH genelde genç yaşlarda sık görülür ve tekrarlayıcıdır.

Mikroplar ve CH arasındaki ilişki tam olarak tanımlanmamıştır. Araştırmacılar *E.coli*'in bazı suşlarının da CH'da kötü bir mikrop rölünü oynadığını gösretmektedirler. Diğer bifidobakteriler ve laktobasillerin yararlı etkisinin olduğunu ve bağırsak için koruyucu olduğu düşünülmektdir. Yapılan birçok kontrollü çalışmalar ise CH olan hastalara yardım etmek amaçta probiyotiklerin etkisi incelenmektedir. Kanıtlar probiyotiğin CH'da da kullanabileceğini göstermektedir. Laktobasil ve Bifidobakteriler CH ile ilgili sorunları azaltmak için kullanılmaktadır, ancak unutmayalım ki, CH'ı ince bağırsağı ve kolonu etkileyebilir, o yüzden probiyotiğin iki taraflı yararlı olması gerekmektedir. Probiyotikler *Lactobacillus* GG, CH'da Prednison gibi immünomodülatör ilaçlarla birlikte kullanıldığında ümit verici sonuçlar göstermektedir. Ayrıca bağırsak baryerinde sağlıklı bir iyileşme olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu, bağırsağı daha az mikrop veya alerji etkiledi demektir. *L.salivarius* ve *Saccharomyces boulardii* dahil olmak üzere diğer probiyotikler CH hastalığı çalışmalarda umut verici sonuçlar göstermektedir ve bağırsak sağlığı için yardım edebilmektedir. İBH'nin iyileşmesinde laktik asit bakterileri, *L.rhamnosus* GG ve *L.salivarius* UCC 118 her ikisi de *E.coli* Nissle 1917 suşundan da etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *L. plantarum* CH hastalığı gibi inflamatuvar hastalıkları tarafından etkilenen bağırsak sisteminde yardım sunabilmektedir. Probiyotikler mikrop (enterobakteria) sayısını azaltır ve kolonda yaşamayı başarmaktadır. Çoğunlukta kolonda yaşayan bifidobakterinin, aynı zamanda CH hastalığı olanlar için yardım ettiği düşünülmektedir. Bifidobakteri türleri (*B. breve, B. infantis, B. longum*) araştırılmıştır ve bunlar bağışıklık faktörlerini kontrol ederek bir yararlı etki sağlayabileceği gözlemlenmektedir. Bifidobakteriler, aynı zamanda bağırsak mukozasında bağışıklık T hücrelerine yardımcı olmaktadır. Bağırsak mukozası iltihabını kontrol ederek bifidobakteriler CH hastalığı gibi İBH ile ilişkili belirtiler ve sorunları azaltmak mümkün olmaktadır. Bifidobakteriler CH hastalığının tedavisinde gelecek vaat eden mikroorganizmadır. Laktobasil türleri de CH hastalarında olumlu sonuçlar ortaya koymaktadır. VSL#3 probiyotik adı verilen ve içeriğinde *L. casei, L. plantarum, L. acidophilus, L. bulgaricus, B. longum, B. breve, B. infantis, S. thermophilus, E. coli*

Nissle 1917 ve *S. boulardi* bulunan kombinasyon İBH belirtilerini hafifletmekte olumlu sonuçlar göstermektedir. Birçok farklı probiyotik CH olanlar için yararlı olduğu bilinmektedir (Allison 2008).

2.3.3 Kolit hastalığı

Kolit hastalığı kalın bağırsak ve rektumu etkileyen İBH'nin akut ve kronik bir türüdür. Bu hastalığın nedeni hala bilinmemektedir. Hastalık kolon ve inen kolondan başlar ve bağırsak boyunca peroksimale yayılır ve tüm kolonu etkiler (Mithun Vishwanath 2012). Bu hastalık her yaş grubunu etkileyebilir, 15 ile 30 yaş arasında oluşmaktadır, ancak yaşları 50 ile 70 arası bu hastalığın zirvesi olabilir. Hastalık genellikle rektal bölgede başlar ve en sonunda tüm kalın bağırsak yoluyla uzatabilmektedir, bağırsak duvarının iltihabına neden olmaktadır. Kolon dokusu bile hastalığın şiddetli durumlarında bakteri ile enfekte olabilir ve ölebilmektedir. Kolit hastalığı sık sık kötüleşmeye yönelik olan kronik bir hastalıktır. Kolit yüksek bakteri konsantrasyonu olan kolon ve rektumda insanlarda iltihap oluşturmaktadır. Kolit için olağan tedavi edici ilaç olarak bilinen sulfasalazin ve glukokortikosteroidlerdir. Bu tedavinin amacı inflamasyonu durdurmaktır. Bununla birlikte, çok sayıdaki hastalar sülfasalazina karşı dirençli ve toleranslı hale gelmektedirler ve bu yuzden bu tedavi artık yardım sunamamaktadır. Probiyotikler de kolit hastalığın hafiflenmesine neden olabilmektedir. Birçok çalışmalarda, hastalığı azaltmak için tek probiyotik suşlarının kolit gibi İBH'ye etkisini araştırmaktadır. Probiyotikler kolit hastalığı olan insanlara yardım etmek için bir yol olarak desteklenmektedir. Bir klinik çalışmada, dört *Laktobasil* suşları, *Bifidobakteriler* ve üç *Streptococcus thermophilus* suşları içeren probiyotik karışımını kolit hastalarında kullanılmıştır. Kolit hastalığı olan kişilerde probiyotiklerin kullanımı ile ilgili klinik araştırmanın bir yorumunda, yüksek dozdaki, çok suşulu probiyotik karışımlarını kullanarak inflamasyonu azaltacağına ve tek probiyotik suşlarının remisyon süresini artırarak daha etkin olduğunu düşündürmektedir. Dikkat çekici bir probiyotik *E.coli* de

klinik deneylerinde kullanılmaktadır ve kolit hastalarında iyileşmesine etkisini göstermektedir (Allison 2008).

İltihaplanan kolit hastalığı oranlarının bazı histolojik özellikleri ve insanlara yapılan çalışmalarda kolit hastalarında bakteri mukozasının populasyonu pro-inflamator profilie doğru yönelmektedir. Kolit için antibiyotik kullanma denemelerinde pek çok başarı olmamıştır ve bu aynı zamanda mikroflorada bakımında probiyotik kullanılmasını önermektedir.

Bifidobakteria lognum ile aynı zamanda prebiyotiği aktif kolit hastaların hastalığını hafifletmek için Furrie ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Furrie vd. 2004). Prebiyotik ile probiyotiği birlikte kullanarak probiyotik suşunu çoğalmasını umut etmiştir. Bu prebiyotik kalın bağırsakta var olan mikoroorganizmalardır, o diğer mikroorganizmaların sağlık potensiyelini arttırabilir. Bir önceki araştırmada yüksek sayıdaki bifidobakterilerin sağlıklı insanların rektal mukozasında ve kolit hastalarında büyük bir ölçüde azalma olduğunu gözlememiştir (Macfarlane vd. 2004). Kolit hastalığı rektumda başlatıldığından dolayı hastaların mikroflorasında bir değişiklilik olduğunu gözlemlemiştir. Sağlıklı rektal mukozadan izole edilen *B.lognum* suşu asit ve safra tuzularına, dondurma-kurutma ve oksijen toleranıs direniçliliği açısından uygun olup olmadığı deneysel kanıt temelinde probiyotik olarak tanımlanmıştır (Kennedy 2002). Kolit hastalığın tedavi sonuçları probiyotiklerin etkinliğinin sonuçları olarak kabül edilen klinik çalışmalar yayınlanmaktadır. Halen *E.coli* Nissle 1917 suşu, *S.boulardi*, VSL#3 ve Bifidobakterinin çeşitli suşlarının kolit hastalığında olumlu etkisinin olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Bu nedenle kolit hastalığının tedavisinde probiyotiklerin önemli ölçüde olumlu etki gösterdikleri kabül edilmektedir ve çalışmalarda bu mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

İBH'nın temel alt tipleri olan kolit ve CH'de, klinikte kanlı-mukuslu dışkılama, kilo kaybı, karın ağrısı, ateş ve halsizlik başlıca bulgular olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak bu iki hastalık arasında özellikle anatomik tutulum, yayılma paterni ve oluşturduğu doku harabiyeti açısından farklılıklar bulunmaktadır. Aktif kolit hastalığın remisyona girmesini sağlamak amacıyla probiyotik kullanımı ile ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır. Rembacken ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir haftalık gentamisin antibiyoterapisi ile floradaki doğal *E.coli* türleri baskılandıktan sonra hastalar 12 ay boyunca *E. coli* Nissle 1917 suşu veya mesalamin almışlardır. 12 ay sonırasında remisyona girme oranı mesalamin alan grupta % 75, probiyotik alan grupta %68 olduğunu gözlemlemiştir. *E. coli* Nissle 1917 suşu ile mesalamin tedavisinin karşılaştırıldığı bu çalışmada iki tedavi arasında istatiksel farklılık bulunmamakla beraber remisyon indüksiyonunda eşit etkinlikleri olduğu görülmüştür (Rembacken vd. 1999). Kato ve arkadaşlarının yaptığı bir randomize kontrollü çalışmada hafif/orta şiddetli kolit hastalarda mesalamin tedavisine bifidobakter grubu eklenmiştir. 12 hafta sonra klinik aktivite indekslerinde ve kolonoskopik incelemelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düzelme olduğu görülmüştür (Kato vd. 2004). Plasebo kontrollü çalışmaların yapılamaması nedeniyle probiyotiklerin esas etkinlik düzeyi ve güvenilirliği ile ilgili soru işaretleri halen devam etmekte ve ileri klinik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.3.3.1 Kolit tedavisinde probiyotiklerin kullanılması

Çeşitli çalışmalarda kanser, enfeksiyon ve İBH gibi gastrointestinal bozukluğu olan bazı hastalıkların gelişmesini önlemek için hayvan modellerinde LAB terapötik özellik göstermektedir. Çünkü LAB birçok yararlı özelliklere sahiptir. Bu "sağlık üzerine yeterli miktarda alındığında canlı kalabilen mikroorganizmalar" olarak tanımlanan ve en sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. *Bifidobakteria*, lactobasiller ve *Saccharomyces* gibi probiyotik mikroorganizmalar insanlarda deneysel kolit veya diğer

inflamatuvar bağırsak hastalıklarında etki göstermektedir. Probiyotik bakteriler bağırsak mikrobiotasını ve bağırsak bariyerinin geçirgenlilğini arttırarak inflamatuvar süreçleri giderir ve immünojenitesini değiştirir. *Laktobasillus ruteri* gastrointestinalda LAB sayısını arttırarak kolit hastalığında IL-10 sitokini önlemek için kullanılmaktadır.

Gut mikroflorasına ait bakteri türleri, doğal olarak sağlıklı insanların içinde çok sayıda iyi tolere edilen ve patojen olmayan mikroorganizmalardır. Kolit hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bağırsak mikroflorasının bozulması hastalığın nedensel bir faktörüdür. Bu fikir bağırsak mikroflorasının bakteriyel kompozisyonunun araştırılması ve çalışmaların sonuçları tarafından gözlemlenmektedir (Fedorak ve Madsen 2004). İkinci bir araştırmada İBH hastalarında sağlıklı kontrollere göre mukozasında aerobik ve fakültatif-anaerobik bakteri olduğu gözlemlenmiştir (Conte vd. 2006).

Benzeri bir CH ve kolit hastalığı tedavisi için probiyotik olarak ilk incelemeler terapötik bir ajan *E. coli* Nissle 1917 kullanılmıştır. Laktik asit üreten bakteriler de kolit hastaların iyileşmesinde etki göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hem laktobasillus ürünlerinin tek türünü yanı sıra laktobasillus ve bifidobakterium kombinasyonlarını kullanmıştır. 8 farklı bakteri türleri (*L. casei, L. plantarum, L. acidophilus, L. delbrueckii, B. longum, B. breve, B. infantis, S. thermophilus*) içeren bir yüksek dozdaki probiyotik kullanılan bir çalışmada, 20 kişinin 1 sene düzenli probiyotik kullandıktan sınra iyileşmeye başladığı göstermiştir (Fedorak ve Madsen 2004).

2.3.3.2 Probiyotik suşların konakçı üzerinde etkisini araştırmada kullanılan kolit modelleri

Son yıllarda, deneysel kolitin çeşitli modelleri gastro-intestinal bozukluğu için yeni terapötik tedaviler araştırmak amaçta kullanılmaktadır. Bu modeller İBH'ın çeşitli

patofizyolojik yönleriyle etkilendiği gösterilmektedir. Sonuç olarak, elde edilen sonuçların dikkatle yorumlanmasını gerektirir. Bugüne kadar, probiyotik bakteriler ile yapılan çalışmalarda en yaygın olarak uygulanan kolit modelleri sırasıyla iki kimyasalla indüklenen modeller, dekstran sülfat sodyum (DSS) ve trinitrobenzen sülfonik asitır (TNBS).

2.3.3.2 .1 Dekstran sülfat sodyum (DSS) modeli

DSS (Dekstran sülfat sodyum) modeli genel olarak farelere içme suyuna katılarak kolit indüklenmektedir. Bu indüksiyon sonrası, fare kolonunda ağırlıklı bir iltihaplaşma gelişmeye başlar. Bu iltihap şiddeti DSS konsantrasyonuna ve döngü miktarına bağlı olarak değişebilir. Fare modeli seçiminde en yaygın oalarak kullanılan BALB/c ve C57/BL6 fare modelidir. Akut kolit DSS modelinde epitel bariyer fonksiyonunun probiyotik etkilerini incelemek için özellikle kullanmaktadır. Buna ek olarak, Okayasu arkadaşları (1990) ve Murthy ve arkadaşları (1993) bunu İBH daha kronik yönde çalışmada probiyotiklerin etkisini incelemek için kullanılabileceğini göstermektedir. DSS ile birden fazla döngüleri kullanarak kronik bir kolit oluşturmakta mümkün olduğunu göstermektedir.

2.3.3.2.2.Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) modeli

Kolit oluşturmak amaçta kullanılan ikinci bir model de intrarektal olarak kullanılan TNBS'tir. İnflamasyon iki aşamalı bir süreçte etkileyeceği kabul edilmektedir: ilk önce etanol epitel bariyer fonksiyonunu bozar, sonra, TNBS böylece bağırsağın mikrobik antijenlerini ve proteinleri ve konağın bağışıklık sistemini etkiler. DSS modelinden farklı olarak, bu model yardımcı T hücreye bağımlı incelemekte yararlıdır. TNBS kullanarak yapılan çalışmalarada probiyotiklerin yararları gösterilmiştir. *Bacillus*

polyfermenticus TNBS ile indüklenen koliti iyileştireceğini gösteren çalımalar mevcuttur. *B. bifidum* S17, iyi bir tutunma kapasitesine sahip bir suş, aynı zamanda, bir anti-inflamatuar etkiye yol açmaktadır. Mane ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada, *L. fermentum* CECT 5716 TNBS ile indüklenen kolite karşı sadece korumak için değil, aynı zamanda tedavi edici bir etkisinin olduğunu ve kolitten kurtarmak amaçlı olduğunu gözlemlenmiştir. Probiyotiğin antioksidan etkisi ile kolite karşı hızlı tedavi yapılmaktadır (Grabig vd. 2006). Bir başka çalışmada, *Faecalibacterium prausnitzii* oral uygulanmasından sonra TNBS ile indüklenen kolitin şiddetini azalttığını gözlemlemiştir (Sokol vd. 2008). Bu yapılan çalışmaların çoğu probiyotik bakterilerin (veya onların ürünleri) konak bağırsak mukozasında (ayrıca gelecekteki yönlendirmelere bakın) ile temas sırasında başlangıçta gerçekleşmesi gerekir (Ingmar vd. 2011).

2.4 Enkapsülasyonun amaçları

Kapsülleme işlemi, milimetreden birkaç nanometre çapındaki tanecikler üretmek için bir maddeyle kaplayarak yapılan fiziko-kimyasal ya da mekanik bir işlemdir (Burgain vd. 2011). Biyoaktif bileşenlerini kapsülleme işlemi, gıda endüstrisinde birçok uygulamada, gıdanın oksidatif reaksiyon kontrolünde, hassas gıda bileşenlerini korumakta, besinsel kayıpları önlemekte, renk, tat ve aromaları maskelemekte ve/veya korumaktadır, gıdanın raf ömürünü uzatmak amaçlı kullanılabilmektedir. Probiyotik kapsülleme ise çevresel etkilere karşı hücreleri korumak için kullanılmaktadır (Champagne ve Kailasapathy 2008; Zuidam vd. 2009). Çekirdek malzemesi olarak adlandırılan kapsüllenmiş madde, aynı zamanda kaplama veya kabuk gibi bir matris içinde dağınılmaktadır. Bu taşıyıcı malzeme kapsüllü maddeyi, gıda endüstrisinde kullanılması durumunda korumak için bir bariyer oluşturmak gerekmektedir. Kapsüllerin 2 farklı, matris ve rezervuar tipi bulunmaktadır. Rezervuar-tipinde çekirdek malzemesinin etrafında bir kabuk vardır, matris tipinde ise aktif madde taşıyıcı madde

üzerine dağılmaktadır ve aynı zamanda yüzey üzerinde bulunmaktadır. Bu iki tip bir arada kapsüle üçüncü bir tip vermektedir: matris tipi aktif maddeyi bir kaplama ile elde edilmektedir (Zuidam vd. 2009).

Kapsülleme işlemi probiyotik ürünleri için bir yapı vermektedir ve yeni bir fonksiyon ya da yenilikçi sistemler oluşturmasına olanak sağlayabilmektedir (Poncelet vd. 2007). Canlı probiyotik hücreleri kapsülleme teknoloji hücre kültürü immobilize teknolojisi biyoteknolojik endüstrisinde gelişmektedir. Probiyotikler kapsüllemede dikkate alınacak iki çeşit sorun mevcuttur: probiotiklerin kapsüle canlı tutulabilmesi ve onların boyutu (1 µm ve 5 µm arasında). Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu için bir çok teknik kullanılmaktadır ve kullanılan her bir teknik ile farklı karakteristik özelliklere sahip (kapsülün tipi, büyüklüğü gibi) mikrokapsüller elde edilir. Probiyotik mikroorganizmaları güçlü bir şekilde hayatta ve konukçuda çoğalma yeteneğine sahiptir. Çalışmalarda, laktik asit ve asetik asit, düşük pH, hidrojen peroksit var ortamda ve yüksek oksijen konsantrasyonu nedeniyle yoğurt, süt ve dondurulmuş tatlılar gibi süt ürünlerinde probiyotiklerin canlılığınının düşük olduğu bildirilmektedir (De Vos vd. 2010). Kapsülleme işlemi, mikroorganizmaların gastrointestinal sistemde ve süt ürünlerinde canlılığını koruyabilmesi için araştırılmaktadır (Krasaekoopt vd. 2003; Picot ve Lacroix 2004). Kapsüllenmiş probiyotik hücrelerin canlılığı kapsüllerin fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır. Aslında, kapsüllerin tipi ve kaplama malzemeleri, parçacık büyüklüğü, ilk hücre sayılarının ve bakteri suşlarının konsantrasyonu için önemli olan bazı parametrelerdir (Chen vd. 2007). Probiyotik kapsülleme işleminde amaç sadece olumsuz çevre koşullarından hücreleri korumak değil, aynı zamanda bağırsakta canlı ve metabolik olarak aktif bir şekilde serbest salınımlarını sağlayabilmektir (Picot ve Lacroix 2004).

2.4.1 Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

2.4.1.1 Aljinat

Canlı bakteriyel hücrelerin kapsüllenmesi için, yardımcı madde olarak kullanılan malzeme toksik olmamalı ve yumuşak olmalıdır. Bu zamana kadar, bakteri hücrelerinin mikrokapsüllenmesi için en yaygın olarak kullanılan biyo gam aljinattır (Kailasapathy 2002).

Aljinat kahverengi deniz yosununun çeşitli türlerinin hücre duvarından elde edilen, α-L-gluronik asit ve β-d-mannuronik asit olmak üzere iki yapısal ünite içeren bir polisakkarit olup, bitkilere sağlamlık ve esneklik kazandıran bir polimerlerdir. Aljinatın kapsülleme işleminde yaygın olarak kullanılma nedenleri de, bakteri hücrelerinin etrafında kolay jel matriksi oluşturabilmesi, ve kalsiyum aljinatın metabolizma için toksik özellik taşımaması, biyouyumluluk ve düşük maliyetli olması, kolay hazırlanabilmesi, bağırsakta kolay çözünebilmesi ve hücrelerin salınımına izin verebilmesi nedeniyle probiotikleri kapsülleme işleminde tercih edilmektedir (Krasaekoopt vd. 2003). Bununla birlikte, bazı aljinat kullanımını kısıltlayabilen dezavantajları vardır. Örneğin, aljinat tanecikleri, mide koşullarına uyumlu olmaması ve asidik ortama duyarlı olmasıdır. Bununla birlikte, farklı bir katkı maddeyi kullanılarak, aljinata yapısal değişiklik uygulanması ya da başka bir polimer bileşikleri ile kapsülleri kaplayarak aljinatın dezavantajını azaltabilmektedir (Burgain vd. 2011). Aljinatlar mikrobiyel hücrelerin mikroenkapsülasyonunda özellikle laktik asit bakteri kültürlerinin gıda fermantasyonlarında başarıyla kullanılmaktadır. bakteri kültürlerinin gıda fermantasyonlarında basarıyla kullanılmaktadır. Örneğin yaygın olarak kullanılan aljinat-nişasta karışımıyla kaplanmış probiyotik bakterilerin, gastrointestinal şartlarda ve yoğurtta bakterilerin canlılıklarını önemli ölçüde daha iyi korudukları bilinmektedir

(Lee ve Heo 2000; Homayouni vd. 2008). Genel olarak % 0,5-4'lük konsantrasyonlarda kullanılmaktadırlar

2.4.1.2 K-karagenan

İrlanda'nın Carragheen köyünden alan K-karagenan gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal bir polimerdir. Sert ve katı jeller oluşturmaktadır ve *Kappaphycus cottonii*'den üretilmektedir. κ-karagenanın çözünmesi için yüksek sıcaklıklar gerektirir. Bu polimere sterilize edilmiş ve soğutulmuş (40-50ºC) probiyotik içeren hücreler eklendikten sonra oda sıcaklığında soğutulan karışımda jelleşme meydana gelir ve daha sonra, mikro-potasyum iyonları eklenerek stabilize edilir. Probiyotik hücrelerin kapsülleme işleminde κ-karagenan uygun bir durumda bakteri tutar ama üretilen jeller kırılgan ve streslere dayanıklı değildir (Burgain vd. 2011). Genel olarak %2-5 konsantrasyonlarda uygulanmaktadır.

2.4.1.3 Kitosan

Kitosan glukozamin bileşenlerinden oluşan anyon ve polianyonların varlığında, çapraz bağ oluşumu ile polimerize olan bir lineer polisakkarittir. Bu bileşenle kapsülleme işlemi hücre canlılığı artırmakta iyi bir verimlilik gösterememiş ve tercihen bir kapsül olarak değil, bir kaplama olarak kullanılmaktadır. Aslında, aljinat ve kitosan bileşimi ile probiyotik bakterilerin kapsülleme işleminde Gİ hastalıklarında koruma sağlamaktadır ve bu nedenle, kolonda bakteri hücrelerinin yaşayabililmesi için iyi bir yol oluşmaktadır. Bununla birlikte, kitosanın bazı dezavantajları vardır, örneğin LAB üzerinde inhibitör etkiye sahip olması gibi.

2.4.1.4 Nişasta

Nişasta glikosidik bağları ile büyük ölçüde glukoz birimlerinden oluşan bir polisakkarittir. Özellikle dirençli nişasta ince bağırsakta pankreatik amiloz tarafından parçalanamaz ve kalın bağırsağa ulaşabilmektedir ve kolonda bulunan gastrointestinal sistem mikroflorası tarafından fermente edilebilmektedir. Ayrıca, prebiyotik özelliğe göre, dirençli nişasta kalın bağırsakta probiyotik bakteriler tarafından kullanılabilmektedir (Burgain vd. 2011). Dirençli nişasta kullanımının diğer başka nedeni ise, uygun granül yüzeyde, probiyotiklerin işlenmesi, depolanması ve sindirim sisteminde taşınmalarına yardım etmesi, aynı zamanda çevresel strese karşı esneklik ve sağlamlık kazandırmasıdır.

2.4.1.5 Jelan gam ve ksantan gam

Jelan gam *Pseudomonas elodea* tarafından türetilen mikrobiyal bir polisakkarittir. Ardı ardına tekrarlanan dört monomerin (glukoz, glukuronik asit, glukoz, ramnoz) bir araya gelmesi sonucu oluşan bir polisakkarittir (Burgain vd. 2011). Ksantan-Jelan gam karışımı asit koşullarına karşı yüksek bir direnç göstermekte ve probiyotik hücreleri kapsüllemek için kullanılmaktadır.

2.4.1.6 Süt proteinleri

Süt proteinleri probiyotik hücreleri ve yapısal ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle doğal araç olarak kullanılmaktadır. Heidebach arkadaşları tarafından probiyotik hücrelerin kapsüllenme işleminde proteinler mükemmel jelasyon özelliklerine sahip olduğu istismar edilmiştir.

2.4.2 Probiyotik bakterilerin enkapsülasyon uygulamalarında kullanımı

Probiyotik suşlarda enkapsülasyon uygulamalarının önemli nedeni ilave edildiği gıdanın teknolojik üretim süreçlerinde, konakçının sindirim sisteminde gerçekleşen metabolik faaliyetler süresince hücrenin canlılığını belirli sayıda korumasını sağlamaktır. Probiyotik kültürlerin enkapsülasyonu konusunda yapılmış olan çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Shah ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* suşların kalsiyum aljinatta kapsüllemiş, dondurmadan önce karışm dondurulmuş fermente süt tatlılar yapmak için kurutulmuş ve karıştırmıştır. Dondurulmuş tatlılar 12 hafta boyunca -20° C'de muhafaza edilmiş. Bu kapsüllenmiş bakteriler içeren dondurulmuş tatlılarda *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* suşlarının sayımları, standart kapsüllü olmayan bakterilerden depolama suresinin 12 hafta daha yüksek olduğu gözlenmiştir, bu nedenle, kalsiyum aljinatın probiyotik bakteri hücrelerini kapsülleme teknolojisi fermente edilmiş dondurulmuş tatlılarda organizmalara karşı koruma sağladığını gösterilmiştir.

Probiyotik bakterilerin bağırsakta kolonize olması ve midenin asit ortamı, safra tuzları, enzimler, toksik metabolitler, bakteriyofajlar, antibiyotikler gibi anaerobik koşullarında hayatta kalması gerekmektedir. Fermantasyon sonrası soğutarak depolama sırasında yoğurtlarda pH azalması nedeniyle asitleşme gerçekleşmektedir ve bu probiyotik bakterilerin büyük hücre ölümüne neden olmaktadırlar (Kneifel vd. 1993; Lourens-Hattingh ve Viljoen 2001). Yoğurt gibi yüksek asit fermente ürünlerinde, probiyotik mikroorganizmaları kapsülleme işlemi ile probiyotik organizmaların hayatta kalması için tatmin edici olduğu tespit edilmiştir.

Khalida vd (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, kalsiyum aljinat-nişastayı kullanan mikro-kapsülleme içeren bir modifiye metodu kullanımışlar. Bu çalışmada *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* suşundan kapsülleme ile yoğurt yapılmış, ve 4°C'de 8 hafta boyunca saklanmış. Bu çalışmada, *L. acidophilus* ve Bifidobakterinin kapsüllü kültürlerin 8 hafta depolama süresinde raf ömürinin kapsül olmayan kültürden daha uzun olduğu tespit edilmiştir.

Adhikari'nin vd (2000) yaptığı bir çalışmada, mikrokapsüllü *B. longumlu* yoğurtu 30 gün boyunca 4°C'te saklayarak serbest hücrelere kıyasladığında canlı hücre sayımı arasında önemli bir fark olduğu gösterilmiştir. Biyoteknolojik ve gıda uygulamaları alanında kullanılan kapsülleme teknolojisi çizelge 2.3' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3.Biyoteknolojik ve gıda uygulama alanında kullanılan kapsülleme teknolojisi

Kültür	Mekanizma	Ürün	Referans
B. bifidum, B.infantis	kalsiyum aljinat	mayonez	Khalil and Mansour, 1998
L. paracasei	süt yağı	çedar peyniri	Stanton ve ark., 1998
Enterococcus faecium	süt yağı	çedar peyniri	Gardiner ve ark., 1998
B. bifidum, B. adolescentis	krem	Beyaz salamura peynir	Ghoddusi ve Robinson, 1998
B. bifidum, B.infantis, B. longum	kalsiyum aljinat jel	Krezcenza peynir	Gobbeti ve arkl., 1997
L. lactis subsp. lactis	k-karagnnan ve keçiboynuzu gam	taze peynir	Sodini ve ark., 1997
L. casei	sıvı çekirdek aljinat kapsül	laktik asit	Yoo ve arkl., 1996
Lactobacilli	kalsiyum aljinat	dondurulmuş tatlı	Sheu ve Marshall, 1993
Lactococci	kalsiyum aljinat	krem	Prevost ve Divies, 1992
L casei	k-karagnnan ve keçi boynuzu gam	yoğurt	Lacroix ve ark., 1990

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda anne sütünden izole edilen ve 16S rDNA dizi analizi neticesinde *Pediococcus pentosaceus* OZF olarak tanımlanarak gen bankasına kaydedilen suş (HM051378) Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Labaratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışma kapsamında, probiyotik seçim kriterleri dahilinde birçok özelliği taşıdığı *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla belirlenen insan kaynaklı bu suşun (Osmanağaoğlu ve ark. 2010, 2011, 2012) hem canlı hem de enkapsüle edilmiş formu (aljinat+kalsiyum+peynir altı suyu proteinleri) kullanılmıştır. Bakteri kültürleri %50'lik gliserol solüsyonu içinde -86ºC'de saklı olarak tutulmuş ve çalışma öncesi 3 kez ardı ardına aktifleştirilmiştir.

3.1.2 Deney hayvanlarının temini

Çalışma kapsamında kullanılacak olan yaklaşık 6 haftalık dişi sıçanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM, Türkiye) temin edilmiştir ve bu merkezde barındırılmıştır. Çalışmalar için gerekli olan Etik Kurul Kararı (G.Ü. Etik Kurul, Protokol No: 66332047-604.01.02/102-12322) ve Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası EK 1'de verilmiştir. Deney hayvanlarının barındırıldıkları odanın ısısı klima yardımı ile 22±˚C, nem oranı ise %40-60 oranında olacak şekilde sabit tutulmuştur. Odanın camları ışık geçirmeyecek şekilde olup aydınlık-karanlık döngüsü otomatik olarak denetleyici bir cihaz ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney

hayvanları için kullanılan yemler özel olarak deney hayvanları için üretilmekte olup (Harlan, Barcelona, İspanya) deneklere herhangi bir kısıtlama olmadan verilmiştir. Su ihtiyaçları için yine herhangi bir kısıtlama olmadan çeşme suyu kullanılmıştır. Her bir sıçanın yediği yem ve içtiği sıvı miktarının belirlenmesi için sıçanlar metabolik kafeslere konulmuştur. Ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma boyunca her gün sıçanların ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.1.3 Bakteri aktivasyonu ve gelişimi için kullanılan besiyeri

Çalışmada kullanılan bakteri kültürü (*Pediococcus pentosaceus* OZF) TGE (Tripton-Glukoz-Yeast ekstraktı) besiyerinde 37ºC'de 18 saat geliştirilmiştir. Kullanılan besiyerinin içeriği EK 2'de verilmiştir.

3.1.4 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışları EK 3'de verilmiştir.

3.1.5 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin, pipet uçlarının, tampon, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonu otoklav (121˚C'de 15 dakika) (Nüve, Türkiye) ile yapılmıştır.

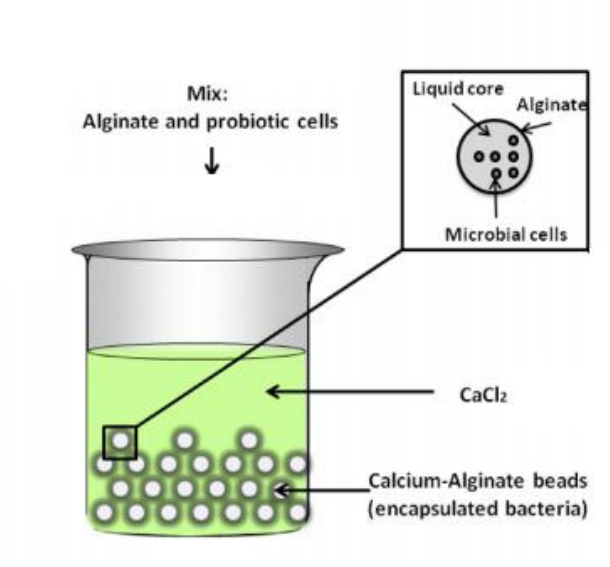
3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin aktifleştirilmesi

-86ºC'de muhafaza edilen *P. pentosaceus* OZF suşu ardı ardına iki kere aktive edildikten sonra gelişmesi için 100 ml TGE besiyerinde 37ºC'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sıvı kültürler falkon tüplerine aktarılarak hücre pelletlerinin elde edilmesi için +4ºC'de 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra süpernatant kısmı atılarak pellet fosfat tamponu (KPO_4) ile iki kere yıkanmıştır.

3.2.2 Enkapsülasyon

Enkapsülasyona başlamadan önce kapsül için steril sodyum aljinat (20g/L) 2 saat boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra soğuması için bekletilmiş ve önceden hazırlanan bakteri hücresine 10 ml sodyum aljinat ilave edilerek 5 dakika daha manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 50ml'lik enjektöre alınan aljinat ve bakteri hücre karışımı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen diğer steril bir beher içerisinde hazırlanan steril 0.15M kalsiyum klorür ($CaCl_2$) tamponu üzerine steril 27G şırında kullanılarak damlatılmak suretiyle kapsüller elde edilir ve karıştırmaya 45 dakika daha devam edilir. Karıştırdıktan sonra tampon dökülür ve iki kere 0.15M $CaCl_2$ tamponu ile yıkanır (Iyer ve Kailasapathya 2005).



Şekil 3.1 Sodyum aljinat ile enkapsülasyon yöntemi

3.2.3 Sıçanlarda deneysel kolit oluşumu

Çalışma 12 farklı deney grubundan (n=12) oluşturulmuştur ve bu deney gruplarına ait bir kısım örnek şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Deneysel kolit oluşturmak için 80mg/kg olarak hazırlanan TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid) + %50 etanol karışımı kullanılmıştır. Bu yönteme göre anestezi altındaki sıçanlara 8 French poliüretan kanül rektal yoldan 8cm içeri itilerek kanül yardımıyla 400µl TNBS + 0,5ml %50 etanol yavasça içeri verilmiş ve kolit oluşumu sağlanmıştır (Şekil 3.2). Verilen maddenin geri kaçmasını engellemek için sıçanlar 30 saniye süre ile kuyruktan kaldırılarak "trandelenburg" pozisyonunda (baş aşağı tutularak) (Şekil 3.3) anesteziden çıkana kadar yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir.

Grup I Normal besleme ve serum fizyolojik solüsyon verilen sağlıklı kontol grubu

Grup II Normal besleme ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen sağlıklı kontol grubu

Grup III Normal besleme ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen sağlıklı kontol grubu

Grup IV Normal besleme ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF verilen sağlıklı kontol grubu

Grup V Normal besleme ve serum fizyolojik solüsyon verilen hasta (kolit) grubu

Grup VI Normal besleme ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen hasta (kolit) grubu

Grup VII Normal besleme ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen hasta (kolit) grubu

Grup VIII Normal besleme ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF içeren aljinat kapsülleri verilen hasta (kolit) grubu

Grup IX Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve serum fizyolojik solüsyon verilen deneysel grup

Grup X Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen deneysel grup

Grup XI Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen deneysel grup

Grup XII Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF içeren aljinat kapsülleri verilen deneysel grup



Şekil 3.2 Sıçanların kafeslere yerleştirilmesi



Şekil 3.3 Rektal yoldan kanül yardımıyla TNBS uygulaması



Şekil 3.4 TNBS uyguladıktan sonra baş aşağı tutulması

Deney düzeneği 14 gün olarak tasarlanmıştır. Grup I, II, III ve IV sağlıklı kontrol grubu olup kolit oluşumu yapılmamıştır. Çalışmada iki farklı yaklaşım sergilenmiştir; kolit oluşturulduktan sonra (Grup IX-XII) 7 gün boyunca kapsül verilen gruplar ve kolit oluşturulmadan önce ve sonra, yani toplamda 14 gün boyunca (Grup V-VIII) kapsül verilen gruplar. Sıçanlarda TNBS uygulamasıyla gelişen kolit, 7 gün boyunca her gün ”hastalık aktivite indeksine” göre skorlanmıştır. Sıçanların vücut ağırlık kayıpları (% olarak), gayta kıvamındaki değişiklikler ve rektal kanama olup olmadığına göre skorlama yapılmıştır. 15. günde sıçanlara intramasküler yoldan 45mg/kg ketamin ve 5mg/kg xylasine uygulanarak ötenazi yapılarak kan, dalak ve kolon örnekleri aseptik koşullar altında alınmış ve çalışmanın daha sonraki aşamalarında kullanılmak üzere sıvı nitrojende saklanmıştır.

3.2.4 Dokuların ve kan örneklerinin hazırlanması

Ötenaziden sonra abdominal kavite orta hat kesi ile açılarak tüm kolon ve dalak çıkarılmıştır. Alınan tüm kolondan 3cm kesilerek bunun 1cm’lik kısmı kolondan RNA izolasyonu için kullanılmıştır. Dalak ve kolon örnekleri aseptik koşullar altında serum

fizyolojik ile dikkatli bir şekilde yıkanmış ve homojenize edilmiştir. 1800 rpm'de 8 dakika santrifüjleme sonunda çöken hücreler tekrar serum fizyolojik ile yıkanmış ve 1ml trizol eklenerek RNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. Kandan RNA izolasyonu için ise intrakardiaktan 200µl kan alınmış ve 1ml trizol eklenerek RNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5 Histolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AnaBilim Dalı'nda yapılmıştır. 25 adet sıçan bağırsağı (kolon) %10 Formaldehid solusyonunda tespit edilmiş, rutin doku takibine tabi tutulmuş ve parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklarından alınan 5 mikron kalınlığında kesitler hemotoksilen-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda (Leica DM4000B) 100X büyütmede değerlendirilmiş ve resmedilmiştir (Leica DFC280).

3.2.6 RNA izolasyonu

Üzerine 1ml Trizol eklenen örnekler elde mümkün olduğunca hızlı sallamak suretiyle 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 200µl kloroform eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletilmiş ve +4ºC de 12000g de 13-15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde 3 katman oluşmuştur. Üst fazda bulunan RNA hassas bir şekilde 1000µl'lik pipetle çekilerek yeni eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 500µl izopropanol eklenip 1 dakika hafifçe aşağı yukarı çalkalanarak oda ısısında 10 dakika bekletilen örnek daha sonra +4ºC de 12000g de 10 dakika santrifüj edilerek tüpün dibinde beyaz RNA pellet oluşumu sağlanmış ve elde edilen pellet önce %75'lik sonra %99'luk EtOH ile yıkanmıştır. +4ºC de 7500g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra alkolü uçurulan pellet üzerine 35-50µl RNAse-DNAse içermeyen su eklenmiş

ve pellet çözülmüştür. Elde edilen RNA stoğu çalışmanın daha ileriki aşamalarında kullanılmak üzere -86ºC'de bekletilmiştir.

3.2.7 cDNA'nın elde edilmesi

cDNA sentezi EK 4'de içeriği verilen **Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)** kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada farklı cDNA sentez primerleri olan **Random Hexamer Primer** ve **Anchored-oligo(dT)$_{18}$** ayrı ayrı denenmiş, ancak hem hedef genler hem de çalışmada housekeeping gen olarak kullanılan β-ACT (β-actin) gen bölgelerinin uzunluklarının 500bç'den büyük olması nedeniyle Anchored-oligo(dT)$_{18}$ ile çalışılmanın uygun olduğuna karar verilmiş ve EK 4'de ki protokol uygulanmıştır.

3.2.8 qRT-PZR

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezini takiben üzerinde çalışma yapılacak hedef (IL1β, IL6, IL10 ve TNFα) ve housekeeping (β-ACT1 ve β-ACT2) gen bölgeleri için tasarlanan ve Çizelge 3.1'de verilen primerler üzerinde uygulanan **"Melting Curve Analizi"** ile hem PZR reaksiyon koşulları optimize edilmiş hem de herhangi bir dimer oluşumunun olup olmadığı kontrol edilmek suretiyle uygun primerler (housekeeping gen olarak β-ACT1'in kullanımı) seçilmiştir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu için uygun primer (0,2 ile 1 μM arasında taranmıştır) ile cDNA konsantrasyonları taranmış ve gerçekleştirilen koşullar arasında en erken cq (quantification cycle) değerini veren reaksiyon koşulu optimal koşul olarak seçilmiş ve çizelge'3.2'de verilmiştir. qPZR uygulamaları Light Cycler Nano (Roche) cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Verilerinin normalizasyonu 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre yapılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001).

Çizelge 3.1 qPZR çalışmalarında housekeeping genler ve sitokin alakalı genler için kullanılan primer sekansları

Primerler	**Sekans (5'-3')**	**Position cDNA gene**	**Accession number[b]**
βactin FW1	CTGGCCTCACTGTCCACCTT	3474–3570	J00691
RW1	GGGCCGGACTCATCGTACT	exon	V01217
βactin FW2	AAGTCCCTCACCCTCCCAAAAG		
RW2	AAGCAATGCTGTCACCTTCCC		
IL-1b FW	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	793–871	M98820
RW	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	exon	NW_047658
IL-6 FW	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	532–610	E02522
RW	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	exon	M26745
TNFα FW	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	195–305	X66539
RW	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	İnt.span	D00475
IL-10 FW	AGTCAGCCAGACCCACATG		
RW	TGCTCCACTGCCTTGCTTTT		

3.2.9 Enzim aktivitesi

-86ºC derin dondurucuda saklanan kolon örnekleri ağırlıklarının 10 katı hacimde serum fizolojik içinde homojenize edilmiştir. Örnek homejenatları 4000g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlardaki protein konsantrasyonları Lowry yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan qPZR Protokolü

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyonu
5X SYBR Green I Master	2 µl	1X
İleri primer (10 pmol/µl)	0,7 µl	0,7 µM
Geri primer (10 pmol/µl)	0,7 µl	0,7 µM
DNA kalıbı	1 µl	2 µg
H_2O PZR suyu	5,6 µl	-
Toplam hacim	10 µl	-

3.2.9.1 Protein miktarı ölçümü yöntemi (Lowry yöntemi)

Elde edilen süpernatanların protein konsantrasyonu belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanılmış (Lowry vd. 1951) ve bu yöntemde kullanılan reaktifler EK 3'de reaksiyon bileşikleri ise çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Protein miktar ölçüm yöntemi.

	Kör	Numune (N_m)
Süpernatant	---	10 µl
Distile su	500 µl	490 µl
C reaktifi	2,5 ml	2,5 ml

Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildikten sonra hem kör hem de numune tüplerine 0,25ml D reaktif eklenmiş, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 700nm dalga boyunda kör ve numnenin absorbansı (OD) distile suya karşı spektrometrik olarak ölçülmüştür. Protein konsantrasyonu hesaplamak için albumin standardı kullanılmış ve buna göre faktör değeri 20 alınmıştır. Hesaplama açağıdaki

förmüle göre yapılmıştır.

Protein konsantrasyonu (mg/ml) = (OD_{nm} -$OD_{kör}$) x Faktör (F)

3.2.9.2 Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüm yöntemi

Lipit peroksidayonunun ürünlerinden olan MDA oksidasyon göstergesi olarak kullanılmıştır. MDA oksidasyonunun tespiti tiyobarbiturik (TBA)'nın oluşturduğu ve 532nm dalga boyundaki ölçülebilen pembe renkli kompleks temel alınarak gerçekleştirilmiştir (Dahle vd.1962). Bu analizde kullanılan reaktifler EK 3'de 3'de reaksiyon bileşikleri ise çizelge 3.4'de verilmiştir. Tüpler 30 dakika su banyosunda inkübe edildikten sonra 6000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Kör tüplere spektrometrik ölçüm sırasında 1ml TBA konularak 532 nm dalga boyunda distile suya karşı tüm tüplerdeki çözeltilerin absorbansı ölçülmüş, hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

MDA (nmol/ml) = OD(Nm) x 161,3 µM (MDA) / Prot. Kon. (mg/ml)

Çizelge 3.4 MDA düzeyi ölçüm yöntemi.

	Kör	**Numune**
Süpernatan	100 µl	100 µl
Etil alkol (%95)	1 ml	1 ml
Fosfat tamponu	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	---

3.2.9.3 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüm yöntemi

Bu yöntemin temeli ksantin oksidaz tarafından oluşturulan süperoksit radikallerinin SOD enzimince nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi esnasına dayanmakta olup (Durak vd. 1996) bu analizde kullanılan reaktifler EK 3'de, reaksiyon bileşikleri ise çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5 SOD aktivitesi ölçüm yöntemi.

	Numune	Kör
Reaktif 1	2,75 ml	2,75 ml
Süpernatant	100 µl	---
Ksantin oksidaz (XO)	50 µl	50 µl
Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiş ve aşağıdaki şekilde devam edilmiştir		
$CcCl_2$	100 µl	100 µl
Süpernatant	---	100 µl

Kör ve numunenlerin absorbansları 560 nm dalga boyunda distile suya karşı okunmuş, elde edilen absorbans değeri aşağıdaki formüle göre SOD aktivitesinin ölçümünde kullanılmıştır.

SOD Aktivitesi (U/mg) = $[(K_{OD}-N_{mOD})/ K_{OD}] \times F/Prot.kon\ (mg/ml)]$ F = 20

3.2.9.4 Katalaz (KAT) aktivitesi ölçüm yöntemi

Hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbans değeri KAT enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında azalma göstermekte ve bu azalma spekrometrik olarak izlenebilmektedir (Abei vd. 1974). Gerekli reaktifler EK 3'de gösterilmektedir. Deney Kuartz küvete 0,01 ml fosfat tamponu (pH=7), 2,99 ml H_2O_2 çözeltisi ve 0,01 ml süpernatant konularak distile suya karşı 240 nm dalga boyunda absorbansın 1 dakika izlenmesi protökolü temel alınarak yapılmış ve KAT enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

KAT Aktivitesi (IU/mg) = (Nm_{OD}/dk) x F/Prot.kon(mg/ml) F = 20

3.2.9.5 Glutatyon Peroksidaz (GSH-P_X) ölçüm yöntemi

Bu yöntem GSH (indirgenmiş glutatyon) ile H_2O_2'in GSH-P_X enziminin etkisiyle su ve GSSG'e (yükseltgenmiş glutatyon) dönüşümünü izleyen basamakta GSH redüktaz enziminin NADPH oksidasyonu, oluşan GSSG miktarına bağlı olarak gerçekleştirilmesi temeline dayanmaktadır (Pagila vd. 1967). Gerekli reaktifler EK 3'de, reaksiyon bileşikleri ise çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 GSH-Px aktivitesi ölçüm yöntemi.

Fosfat Tamponu	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
Gsh Redüktaz	100 µl
Sodyum Azid	100 µl
Süpernatant	100 µl

Spektrofotometre fosfat tamponuyla 340 nm dalga boyunda sıfırlanır, maddeler yukarıdaki miktarlarda kuartz küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans izlenir ve elde edilen sonuç kör değeri olarak ifade edilir. Aynı küvete 100 µl H_2O_2 eklenerek 1 dakika daha izlenir. Bu kez elde edilen sonuç numune değeridir. Her iki değer arasındaki fark (ΔOD) GSH-P_X aktivitesiyle doğru orantılıdır. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında ΔOD ve NADPH'ın molar absorpsiyonu kullanılmakta, hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmaktadır.

GSH-P_X aktiviesi (mIU/mg) = (ΔOD/dk.) x F/ [Protein kons. (mg/ml)] F = 4800

3.2.10 Hesaplamalar ve istatiksel analizler

İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik analiz programı kullanılmıştır. Veriler varyansın tek yönlü analizi olan ANOVA-Dunnet testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistik analizlerinde $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda her biri 1-6 sıçandan oluşan toplam 12 grup ve 48 hayvan kullanılmıştır. Bununla beraber, kolit oluşturulduktan hemen sonra hem kontrol hem de hasta gruplarında nedeni bilinmeyen ölümler meydana gelmiştir. Dolayısıyla, çalışmaya dahil edilen sıçanlara ait gruplar yeniden düzenlenerek Çizelge 4.1 de sunulmuştur.

4.1 Histo-patolojik değerlendirme

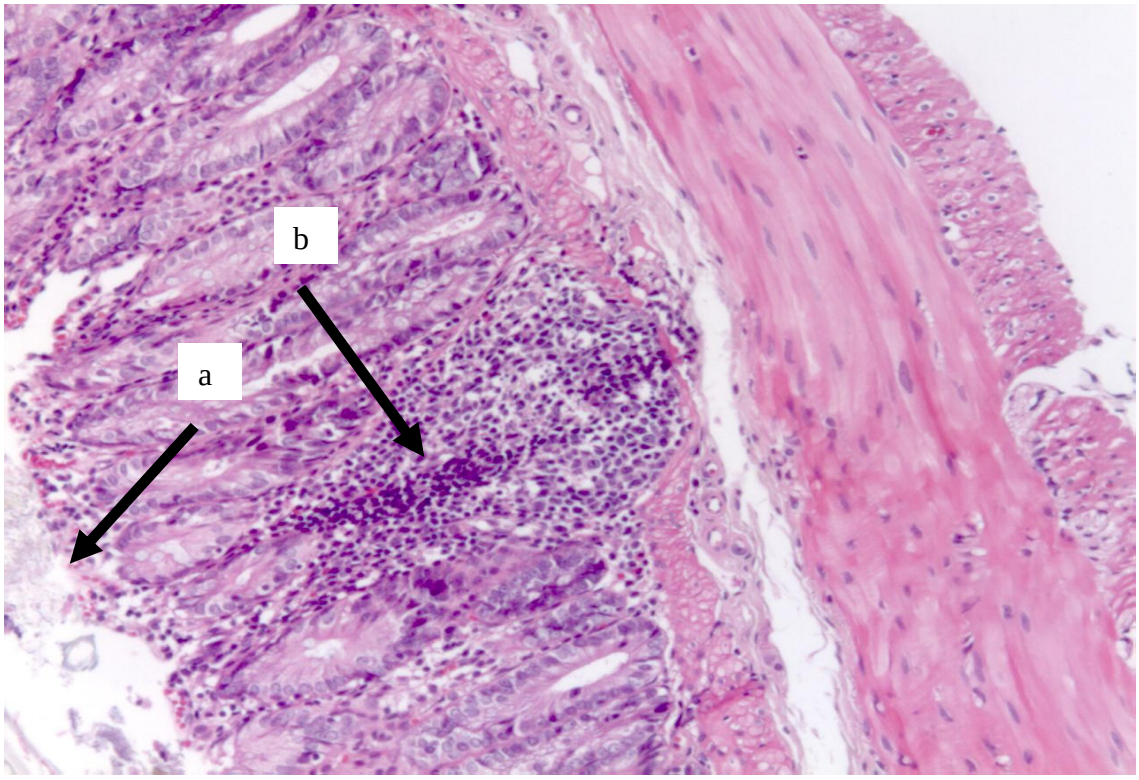
Kolona ait makroskobik görünüm şekil 4.1 de verilmiştir. Histopatolojik inceleme Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AnaBilim Dalı'nda yapılmıştır. 25 adet sıçan bağırsağı (kolon) %10 Formaldehid solusyonunda tespit edilmiş, rutin doku takibine tabi tutulmuş ve parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklarından alınan 5 mikron kalınlığında kesitler hemotoksilen-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda (Leica DM4000B) 100X büyütmede değerlendirilmiş ve resmedilmiştir (Leica DFC280) (Şekil 4.2-4.9).



Şekil 4.1 Sağlıklı (a) ve hasta (b) kontrol gruplarına ait makroskobik kolon örnekleri

Çizelge 4.1 Çalışmaya dahil edilen hayvanlar ve ait oldukları gruplar

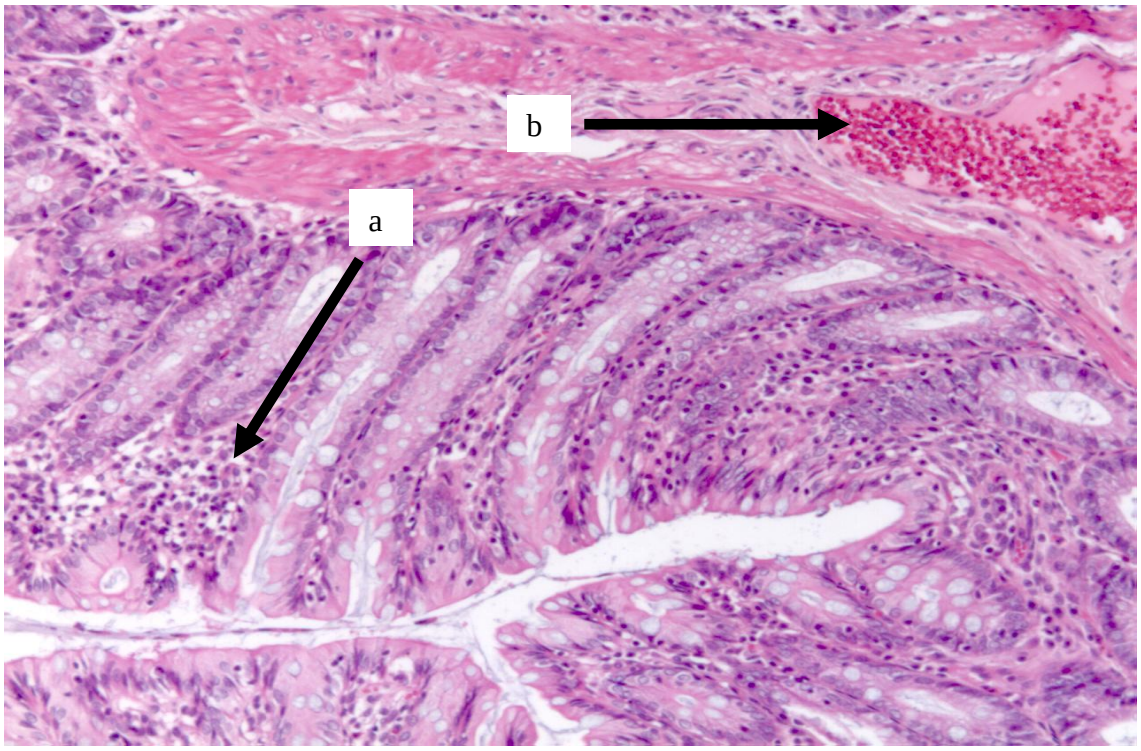
	Gruplar		Toplam hayvan (48)	Ölen hayvan sayısı (23)	Kalan Hayvan Sayısı (25)
SAĞLIKLI KONTROL GRUBU	Grup I	Normal besleme ve serum fizyolojik solüsyon verilen sağlıklı kontol grubu	3	0	3
	Grup II	Normal besleme ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen sağlıklı kontol grubu	3	0	3
	Grup III	Normal besleme ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen sağlıklı kontol grubu	6	0	6
	Grup IV	Normal besleme ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF verilen sağlıklı kontol grubu	6	0	6
HASTA (KOLİT) GRUBU	Grup V	Normal besleme ve serum fizyolojik solüsyon verilen hasta (kolit) grubu	3	1	2
	Grup VI	Normal besleme ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen hasta (kolit) grubu	3	3	0
	Grup VII	Normal besleme ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen hasta (kolit) grubu	6	4	2
	Grup VIII	Normal besleme ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF içeren aljinat kapsülleri verilen hasta (kolit) grubu	6	3	3
KOLİT OLUŞTURULMADAN ÖNCE PROBİYOTİK VERİLEN GRUP	Grup IX	Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve serum fizyolojik solüsyon verilen deneysel grup	2	2	0
	Grup X	Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve suş içermeyen aljinat kapsülleri verilen deneysel grup	2	2	0
	Grup XI	Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve canlı *P. pentosaceus* OZF verilen deneysel grup	4	4	0
	Grup XII	Kolit oluşturmadan önce normal beslenen ve aljinat ve whey ile kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF içeren aljinat kapsülleri verilen deneysel grup	4	4	0



Şekil 4.2 a .Lamina propriada epitel hücrelerinde dökülmeleri, b.. mononüklear hücre infiltrasyonu , HE, x100.

Grup I (SAĞLIKLI KONTROL GRUBU)

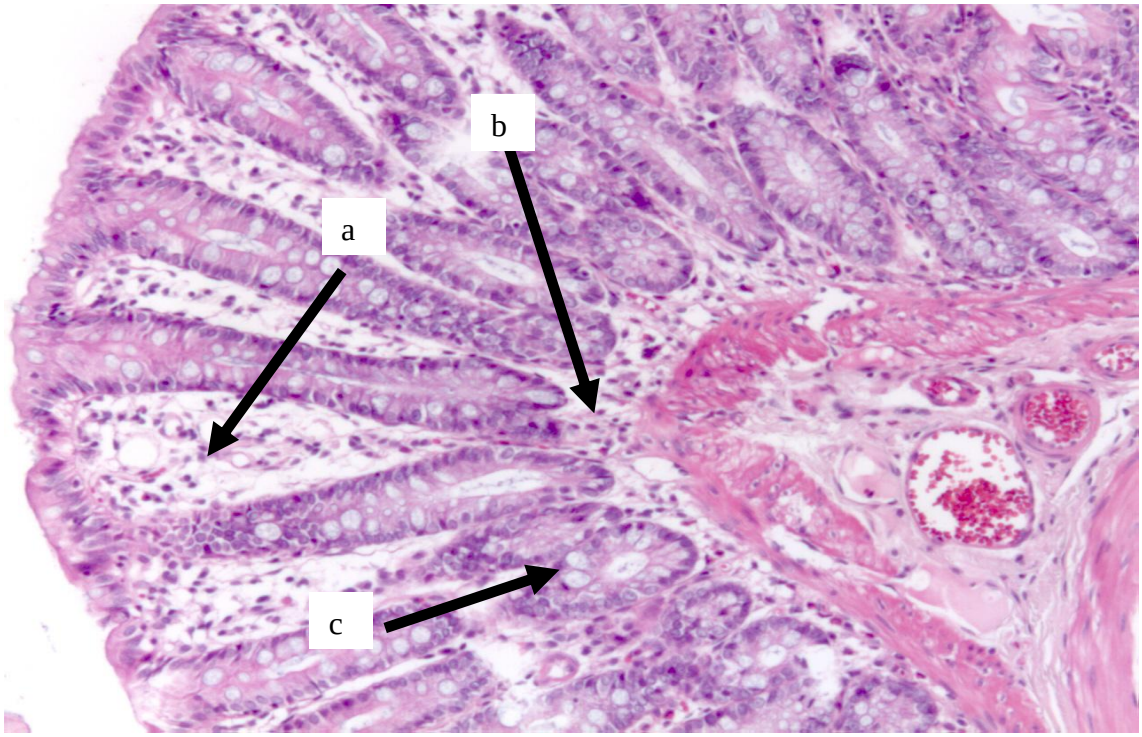
Yer yer epitel hücrelerinde dökülmeler ve lamina propriada lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bir olguda bu hücrelere patolojik durumlarda sayısı artan ve damar dışına çıkan beyaz kan hücreleri yani eozinofil lökositler de eşlik etmektedir.



Şekil 4.3 Lamina propriada mononüklear hücre infiltrasyonu (a) ve submukozada hiperemik damar (b), HE, x100.

Grup II :

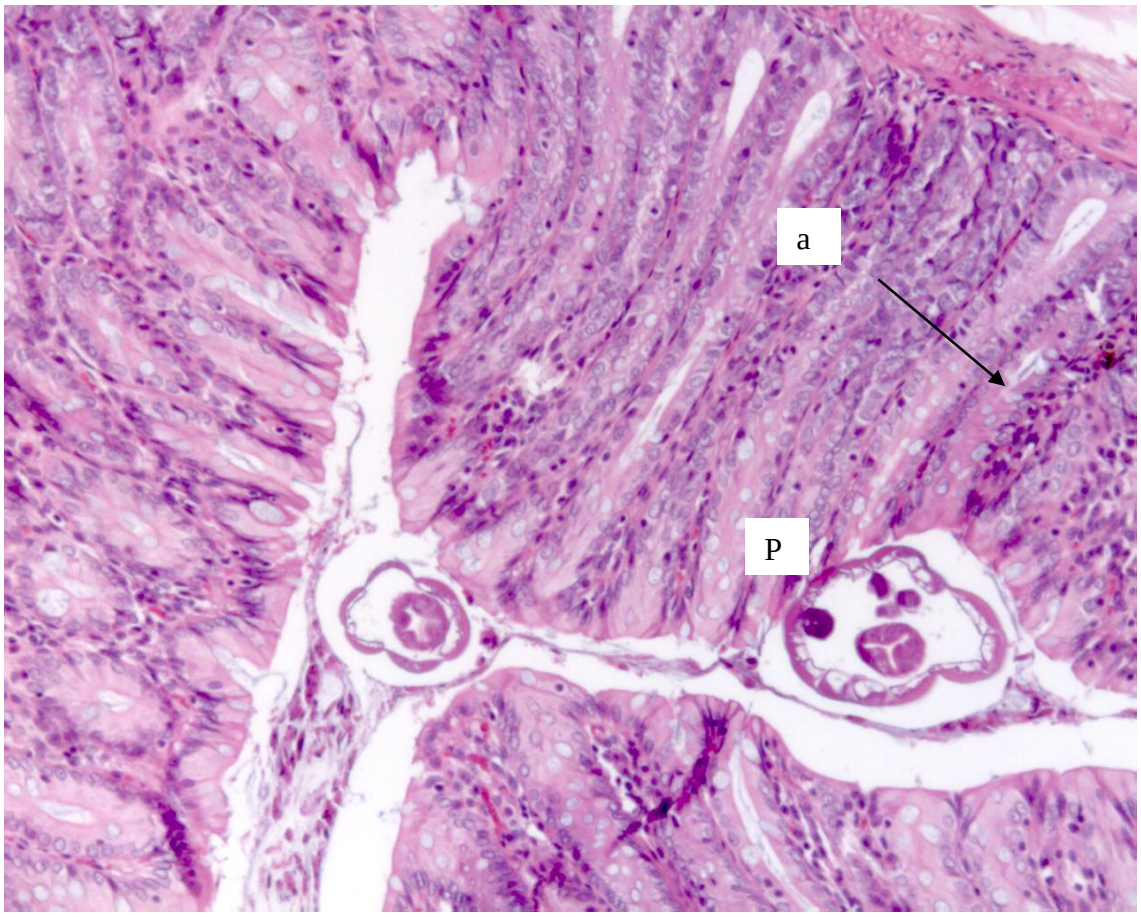
Lamina propriada özellikle villuslara yakın alanlarda ödem (kanın sıvı kısmının doku arasına sızması, tüm akut ve subakut olaylarda artar) belirgindir. Ayrıca bu alanlarda lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonları görülmüştür (Şekil 4.3).



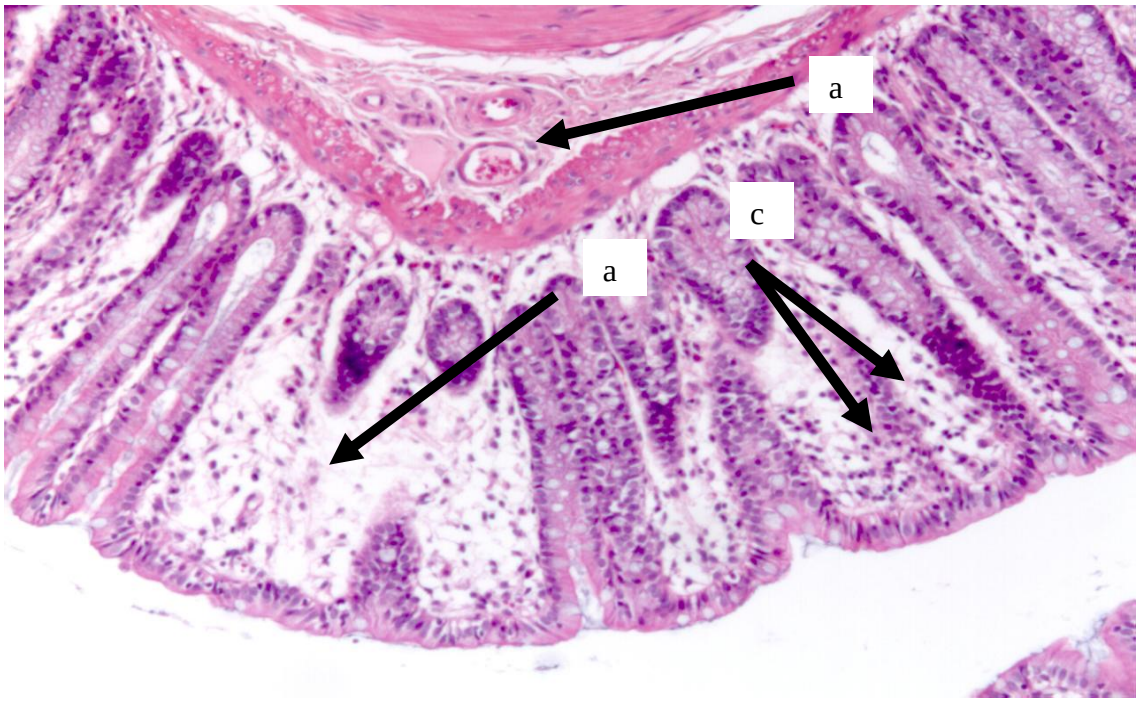
Şekil 4.4 a Lamina propriada ödem,, b mononüklear hücre infiltrasyonu, c goblet hücrelerinde artış , submukozada hiperemik damarlar, HE, x100.

Grup III:

Damarlar hiperemikti (venöz damarların kanla dolu olması, tüm akut ve subakut olaylarda artar). Lamina propriada ödem, lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonları gözlendi. Bir olguda bu hücrelere eozinofil lökositler de eşlik ediyordu (Şekil 4.4). Farklı birer olguda Goblet hücrelerinde (normal hücrlerde mevcut olup yangılarda artan hücre tipi) artış ve parazit larvası (Şekil 4.5) dikkati çekti.



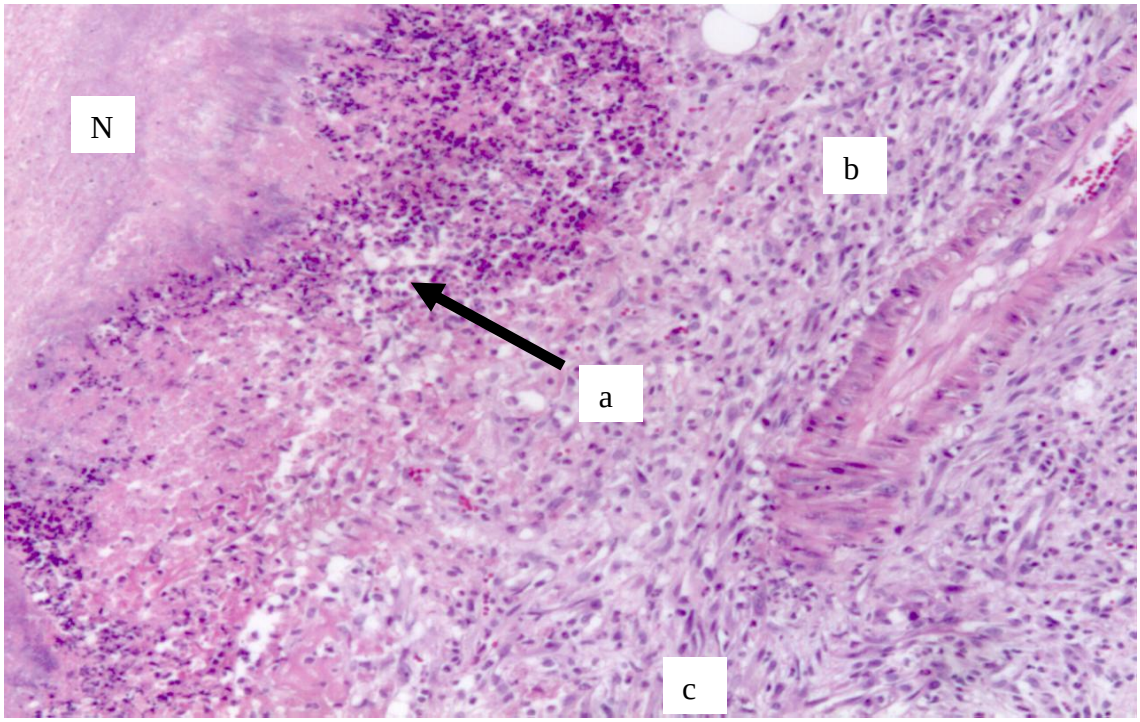
Şekil 4.5 Parazit larvası kesiti (P) ve mononüklear hücre infiltrasyonu (a), HE, x100.



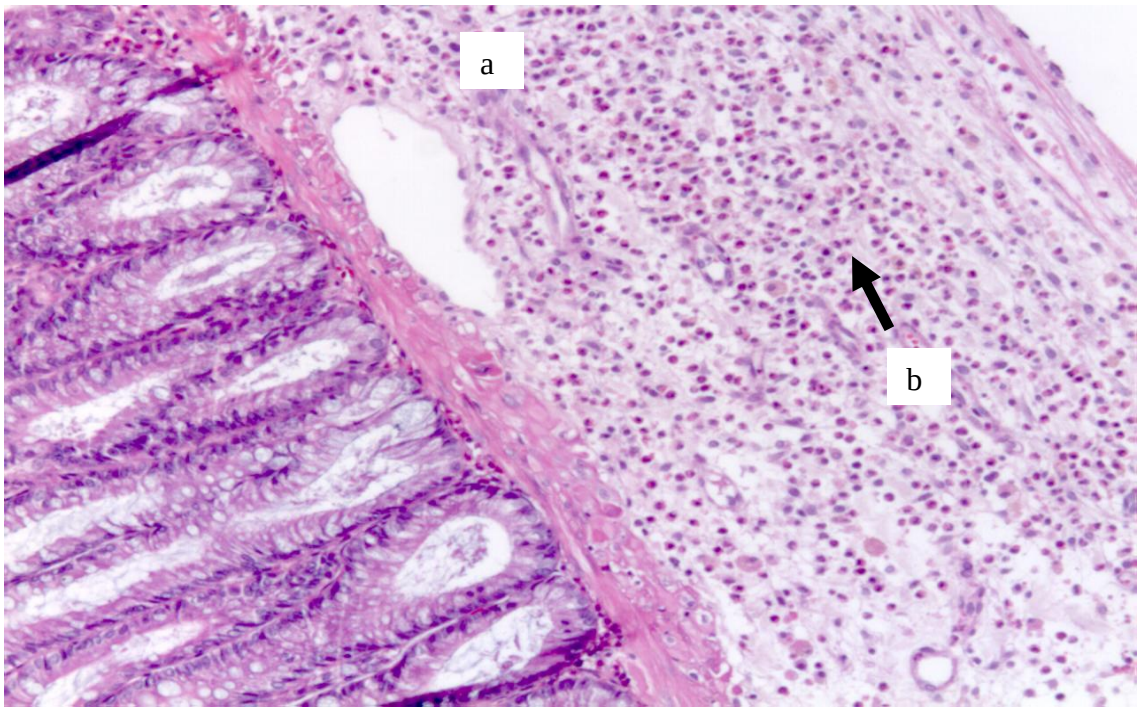
Şekil 4.6 a. Lamina propriada ödem , b. mononüklear hücreler, nötrofil eozinofil Hücreler, c. submukozada hiperemik damarlar , HE, x100.

Grup IV:

Damarlar hiperemikti. Lamina propriada özellikle villuslara yakın alanlarda ödem belirgindi. Yer yer epitel hücrelerinde dökülmeler ve lamina propriada lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonları gözlendi (Şekil 4.5). Bir olguda bu hücrelere submukozada da rastlandı. Ayrıca aynı olguda lenfatiklerde genişleme ve Goblet hücrelerinde azalma dikkati çekti.



Şekil 4.7 N. Nekroz, a. nötrofil lökosit infiltrasyonları, b. tunika serozada mononüklear hücre infiltrasyonu, c. fibrosis HE, x100.

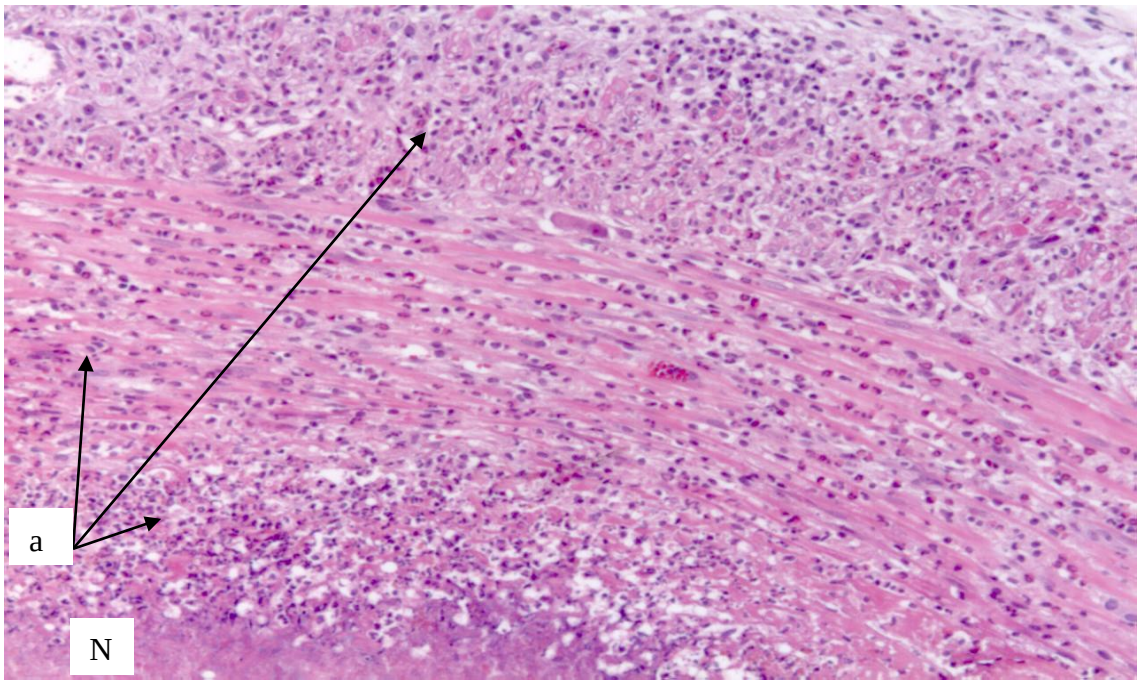


Şekil 4.8 a Tunika serozaya kadar yayılmış mononüklear hücre infiltrasyonu eozinofil, b lökositler, HE, x100.

Grup V (Olgu 5.1 ; 5.2) (KONTROL HASTA GRUBU)

Damarlar hiperemikti. Her iki olguda da lamina propriadan tunika serozaya kadar yayılan geniş nekroz (N) alanları dikkati çekti. Bu sahalarda ölü ve/veya sağlam nötrofil lökositlerle (a) bakteri kümeleri görüldü (Şekil 4.7). Etkilenen bölgelere yakın alanlarda ise bilhassa submukozada, tunika muskulariste ve tunika serozada da eozinofil ve nötrofil lökositlerinde bulunduğu mononüklear hücre infiltrasyonu fark edildi (Şekil 4.8). Lenfatikler genişlemişti.

Tanı : Akut nekrotik kolitis ve peritonitis

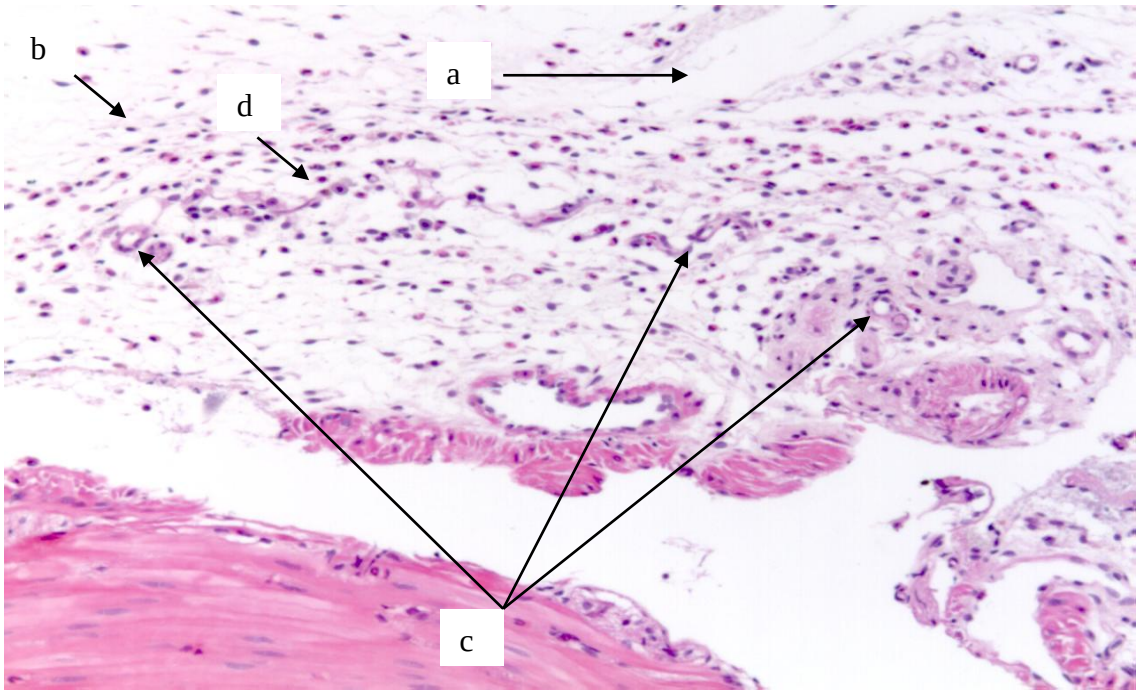


Şekil 4.9 Nekroz (N) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (a), HE, x100.

Grup VII (Olgu 7.2 ; 7.6) :

Damarlar hiperemikti. Bir olguda (Olgu 7.2), lamina propriadan tunika serozaya kadar yayılan geniş nekroz alanları dikkati çekti. Ayrıca bu sahalarda ölü ve/veya sağlam nötrofil lökositlerle bakteri kümeleri görüldü (Şekil 4.9). Etkilenen bölgelere yakın alanlarda ise bilhassa tunika muskulariste ve tunika serozada da belirgin nötrofil lökosit infiltrasyonu saptandı. Tunika serozada kimi sahalarda fibrosis ve mononüklear hücre infiltrasyonu nedeniyle kalınlaşma gözlendi. Diğer olguda (Olgu 7.6) ise lamina propria ve submukozada ödem, lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonlarına rastlandı.

Tanı : Akut nekrotik kolitis ve peritonitis



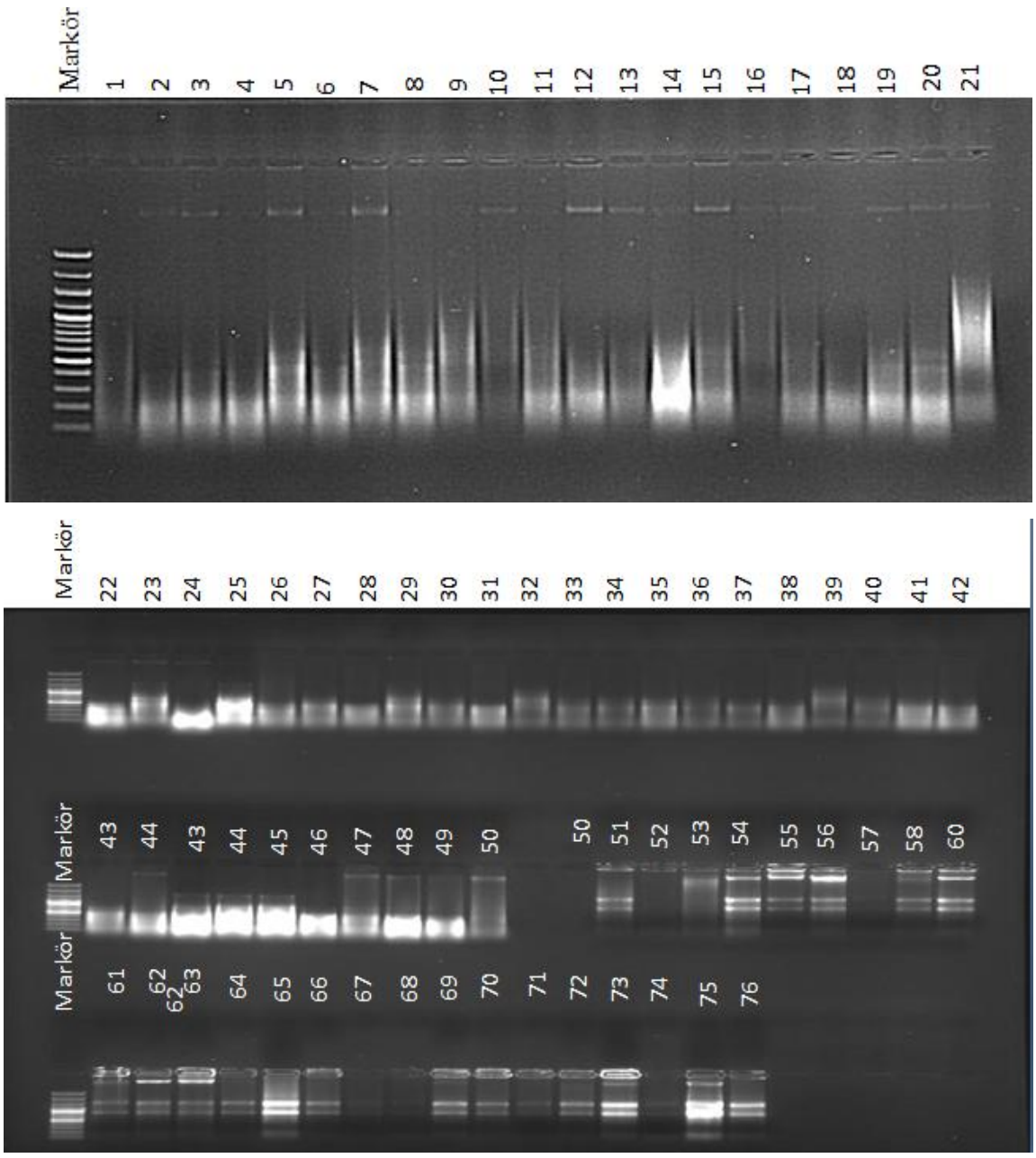
Şekil 4.10 Tunika serozada ödem (a), mononüklear hücre infiltrasyonu (b), damarlaşma (c), HE, x100.

Grup VIII (Olgu 8.1 ; 8.2 ; 8.6) :

Damarlar hiperemikti. Bir olguda (Olgu 8.6), lamina propriadan tunika serozaya kadar yayılan geniş nekroz alanları dikkati çekti. Ayrıca bu sahalarda ölü ve/veya sağlam nötrofil lökositlerle (d) bakteri kümeleri görüldü. Etkilenen bölgelere yakın alanlarda ise lamina propria ve submukozada ödem, lenfosit ve makrofajlardan ibaret mononüklear hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Bir olguda (Olgu 8.2) lamina propria, submukoza ve tunika serozada ödem ve eozinofil lökositlere rastlandı. Aynı olguda kimi alanlarda tunika serozada fibrosis ve mononüklear hücreler fark edildi. Diğer olguda (Olgu 8.1) ise lamina propria, submukoza ve tunika serozada ödem ve mononüklear hücrelere rastlandı. Aynı olguda kimi alanlarda tunika serozada fibrosis ve mononüklear hücreler fark edildi (Şekil 4. 10).

Tanı : Akut nekrotik kolitis ve peritonitis

4.2 Doku ve Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini



Şekil 4.11 Kan, kolon ve dalak örneklerinen elde edilen RNA'nın %1,5 agaroz jel görüntüsü (1-25 arası dalağın RNA'sı, 26-50 arası kolon RNA'sı; 50-76 arası kan örnekleri)

Çizelge 4.2 Örneklerden izole edilen RNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları

	KAN			KOLON			KOLON		
Grup	**KONT (ng/µl)**	**OD 230/260**	***OD 260/280***	**KONT (ng/µl)**	**OD 230/260**	***OD 260/280***	**KONT (ng/µl)**	**OD 230/260**	***OD 260/280***
1.grup, denek 1	83,2	0,54	1,93	2295,7	1,58	2,08	2065,2	1,42	2,09
1.grup, denek 2	25,4	0,06	1,92	2368,3	1,62	2,08	3979	1,35	1,83
1.grup, denek 3	45,7	0,25	1,91	2146,8	1,84	2,08	3557	1,5	1,88
2.grup, denek 1	133	0,49	2,04	2512,2	1,26	2,09	4047,8	1,43	1,79
2.grup, denek 2	69,9	0,51	2,02	1750,3	1,88	1,76	3890,5	1,51	1,87
2.grup, denek 3	112,7	0,25	1,98	2162,5	1,3	2,1	3937,8	1,66	1,86
3.grup, denek 1	14,2	0,03	2,12	1433,5	1,24	2,12	3992,3	1,74	1,76
3.grup, denek 2	56,5	0,12	2,03	1003	1,96	2,09	3836,6	1,72	1,86
3.grup, denek 3	73	0,25	2,01	1328,8	1,03	2,12	3174	1,7	2,02
3.grup, denek 4	97,4	0,41	1,86	2093,7	1,78	2,09	1328,2	1,35	2,03
3.grup, denek 5	115,5	0,06	2,07	1341,5	1,47	2,11	3215,6	1,9	2,00
3.grup, denek 6	96	0,46	1,99	1192,2	1,41	2,1	3428,3	1,97	1,99
4.grup, denek 1	50,7	0,14	2,1	1775,5	1,7	2,1	2052,5	1,88	2,07
4.grup, denek 2	304,4	0,61	2,08	1307,2	1,1	2,1	4248,4	1,54	1,58
4.grup, denek 3	48,6	0,13	2,03	1167,1	1,42	2,1	2901,6	1,83	2,05
4.grup, denek 4	19,6	0,05	2,01	2138,3	1,81	2,08	1184,1	1,5	2,1
4.grup, denek 5	19,6	0,07	1,81	1945,2	1,95	2,08	2496	1,73	2,07

Çizelge 4.2 Örneklerden izole edilen RNA’nın nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)									
4.grup, denek 6	84,7	0,15	2,05	3204,7	1,82	2,02	2366,1	1,38	2,09
7.grup, denek 2	42,6	0,37	2,01	3969,1	1,73	1,82	3383,3	1,94	1,99
7.grup, denek 6	39	0,09	2	4359,9	1,12	1,15	3786,9	1,94	1,9
8.grup, denek 1	83	0,22	2,02	4361,7	1,46	1,74	4034,5	1,69	1,85
8.grup, denek 2	203,5	0,36	2,07	4176,7	1,38	2,06	4066,1	1,75	1,72
8.grup, denek 6	27	0,11	2,08	2501,9	1,83	1,62	3760,3	1,9	1,89
10.grup, denek 1	841,9	1,53	2,07	4364	1,61	1,94	3872,9	1,35	1,83
10.grup, denek 2	164,5	0,40	2,08	1736,7	1,38	2,02	4234,6	1,61	1,7

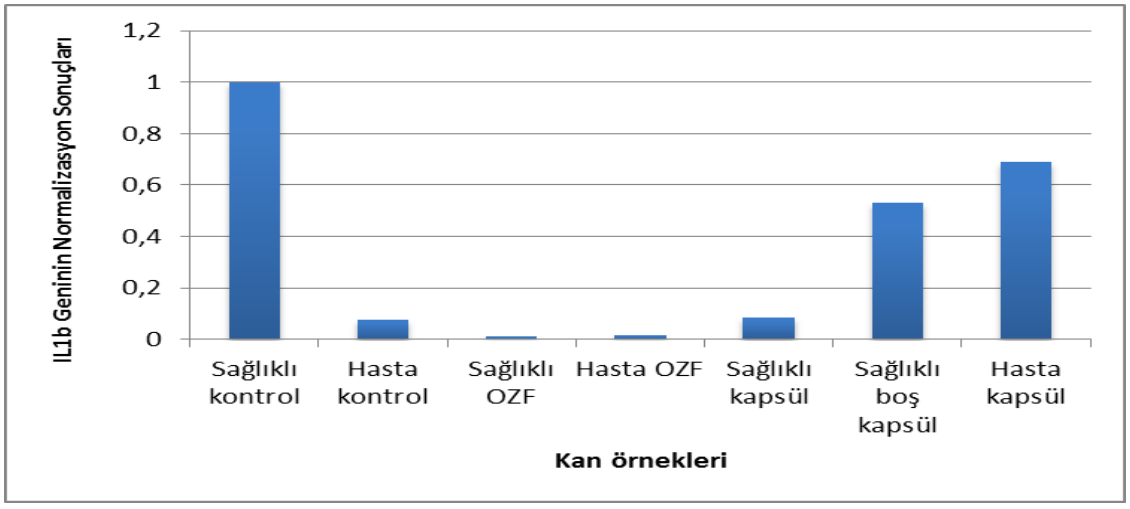
4.3 cDNA Sentezi

Örneklerden elde edilen cDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

4.4 qRT-PZR ile gen (IL-1β ve IL6) Ekspresyonlarının analizi

Sistemik inflamasyondan sorumlu olan **IL-1β** düzeyinin kolit hastalığında arttığı bilinmektedir.

TNBS-ile deneysel kolit oluşturulan hasta (kolit) grubu kan örneklerinden elde edilen sonuç sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pro-inflamatuvar etki gösteren IL-1β geninin hasta kontrolde baskılandığı (p<0.05), canlı OZF suş alan hasta grubunda anlamlı bir değişim gözlemlenmediği (p>0.05) ancak enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşu ile muamele edilen hasta gruplarında genin ekspresyonunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir (p<0.05) (Şekil 4.12).



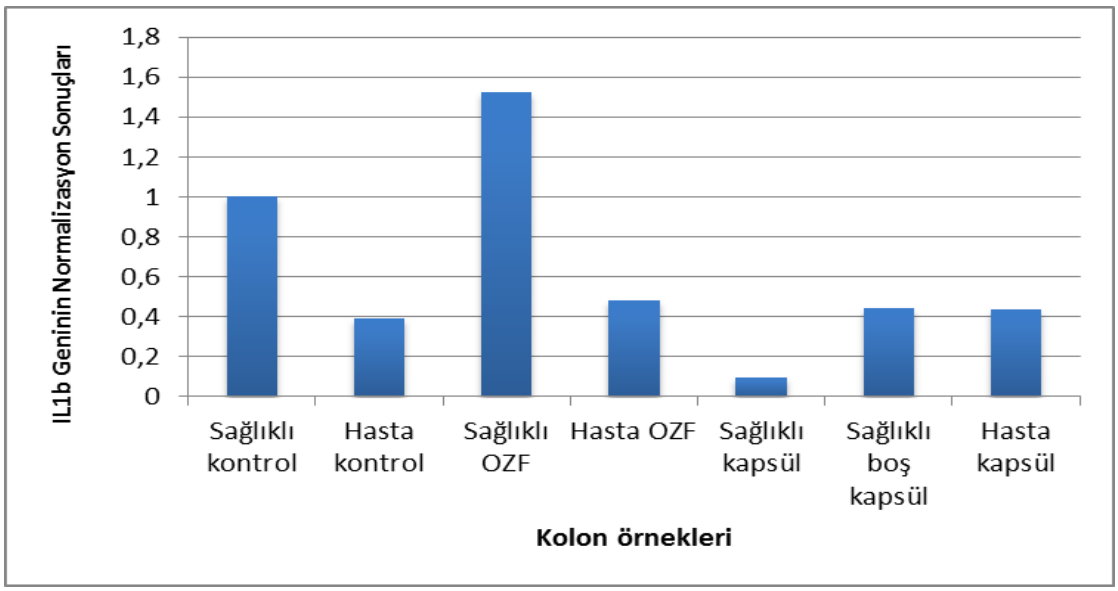
Şekil 4.12 Kan örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu

Çizelge 4.3 Örneklerden elde edilen cDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçlar

	KAN			**KOLON**			**DALAK**		
Grup	**KONT (ng/µl)**	**$OD_{230/260}$**	**$OD_{260/280}$**	**KONT (ng/µl)**	**$OD_{230/260}$**	**$OD_{260/280}$**	**KONT (ng/µl)**	**$OD_{230/260}$**	**$OD_{260/280}$**
1.grup, denek 1	2364,3	2	1,79	4608,9	1,82	1,66	5308,3	1,47	1,40
1.grup, denek 2	1872,9	1,37	1,81	2505,5	2,06	1,82	5153	1,38	1,24
1.grup, denek 3	2014,8	1,89	1,81	3352,2	2,06	1,77	4692,4	1,89	1,66
2.grup, denek 1	2457,8	1,8	1,77	3601,1	1,95	1,77	4087,8	2,00	1,75
2.grup, denek 2	2340,8	1,7	1,81	3352,2	2,02	1,75	4500,5	1,86	1,67
2.grup, denek 3	2592	1,41	1,81	2957,1	1,95	1,76	4644,5	1,95	1,68
3.grup, denek 1	2206,8	1,45	1,78	3217,6	2,03	1,77	4310,1	2,00	1,71
3.grup, denek 2	2264,2	1,4	1,8	3302,4	2,04	1,76	4982,3	1,67	1,46
3.grup, denek 3	2022,6	1,73	1,82	3366,7	1,95	1,74	4262	2,00	1,73
3.grup, denek 4	2413,9	1,91	1,81	4615,8	1,84	1,60	4453,6	1,99	1,72
3.grup, denek 5	2168,5	0,88	1,81	3140,8	2,05	1,78	4203,6	2,02	1,71
3.grup, denek 6	1692,4	1,78	1,81	3466,4	1,99	1,74	4289,2	2,00	1,70
4.grup, denek 1	2051	1,65	1,8	3617,2	2,03	1,75	3854,8	2,09	1,75
4.grup, denek 2	2057,5	1,56	1,83	3717,8	1,97	1,76	4229,6	2,05	1,72
4.grup, denek 3	1991,3	1,61	1,81	3850,8	2,02	1,76	3987,4	1,75	2,05
4.grup, denek 4	2113,1	1,48	1,79	4665,1	1,86	1,63	3975,2	1,73	2,00
4.grup, denek 5	1698,2	1,61	1,82	2302,9	2,12	1,80	4005,1	1,74	2,06

Çizelge 4.3 Örneklerden elde edilen cDNA'nın nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)									
4.grup, denek 6	2118,2	1,17	1,82	3402,9	2,07	1,78	5162,3	1,47	1,69
7.grup, denek 2	1834,9	1,96	1,81	3960	2,02	1,77	4971,6	1,63	1,9
7.grup, denek 6	1968,9	1,45	1,80	4646,4	1,79	1,77	4542,8	1,37	1,59
8.grup, denek 1	2005,5	1,59	1,81	5140,4	1,69	1,55	4510,7	1,94	1,67
8.grup, denek 2	1769,7	1,95	1,83	4262,5	1,77	1,75	4512,3	2,02	1,72
8.grup, denek 6	3529	1,95	1,51	4274,9	1,96	1,70	4788,1	1,86	1,59
10.grup, denek 1	1912,5	1,73	1,83	3035,1	2,09	1,81	4632,7	1,88	1,68
10.grup, denek 2	2413	1,72	1,81	3186,3	2,00	1,78	4624	1,83	1,64

Hasta kolon doku örnekleri sağlıklı kontrol kolon doku örneklerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında (Şekil 4.13), kolit grubunda IL-1β gen ekspresyonunun sağlıklı kontrole anlamlı bir şekilde baskılandığı (p<0.05) tespit edilmiştir. Ancak canlı ve enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşu ile muamele edilen hasta grupları, kontrol hasta grupları ile karşılaştırıldığında bu ekspresyonda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p>0.05). Elde edilen bu verilerin histopatolojik çalışmalardan elde edilen görüntüler (Şekil 4.7-4.8) ile bir uyum içerisinde olduğu gözlemlenmektedir. Kolon örneklerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda canlı ya da enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşunun sıçanlarda TNBS-ile oluşturulan deneysel kolit üzerinde olumlu herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir.

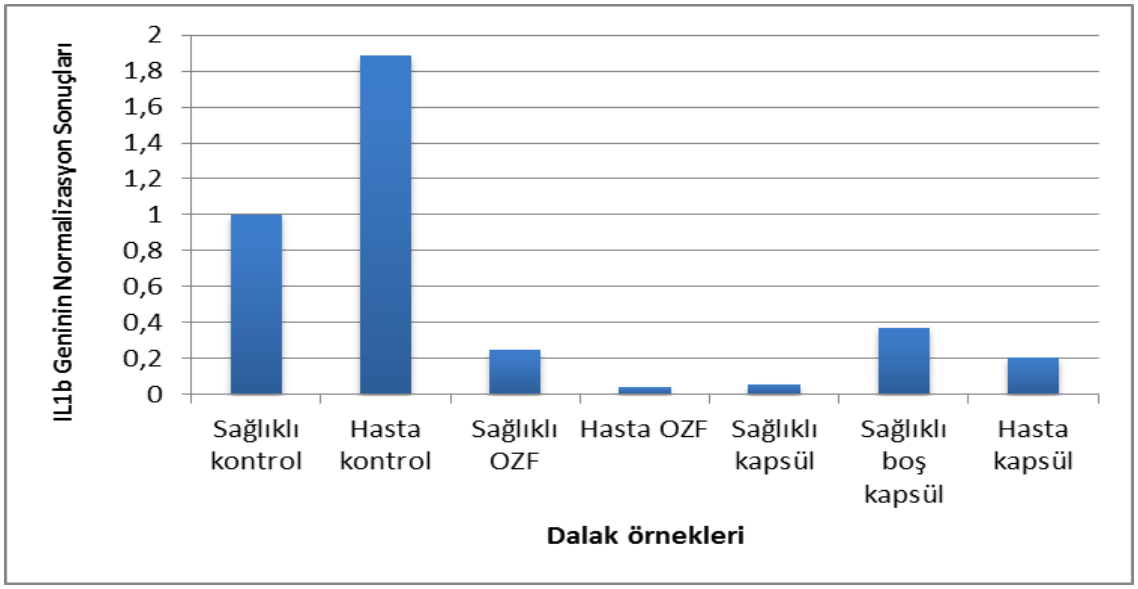


Şekil 4.13 Kolon örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu

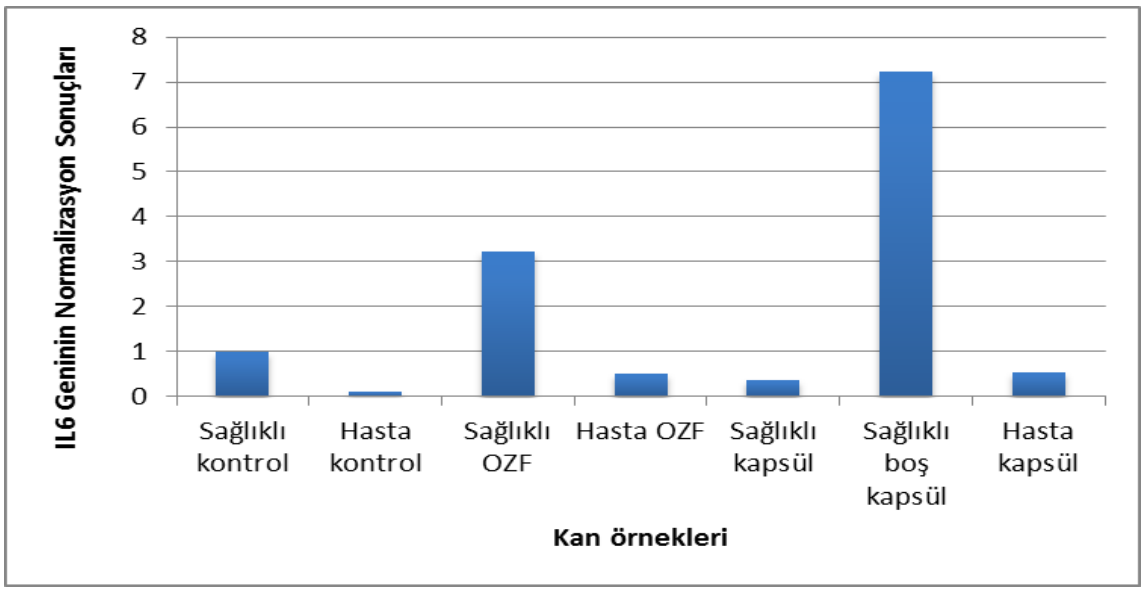
\

Sağlıklı ve hasta gruplar arasında dalak doku örneklerinde qRT-PZR ile IL-1β geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında sağlıklı kontrole kıyasla hasta kontrolün IL-1β gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.05) (Şekil 4.14). Hasta gruplar

üzerinde canlı ya da enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşunun uygulamasına müteakip gen ekspresyonun seviyelerinde anlamlı bir azalma (p<0.05) kaydedilmiştir.



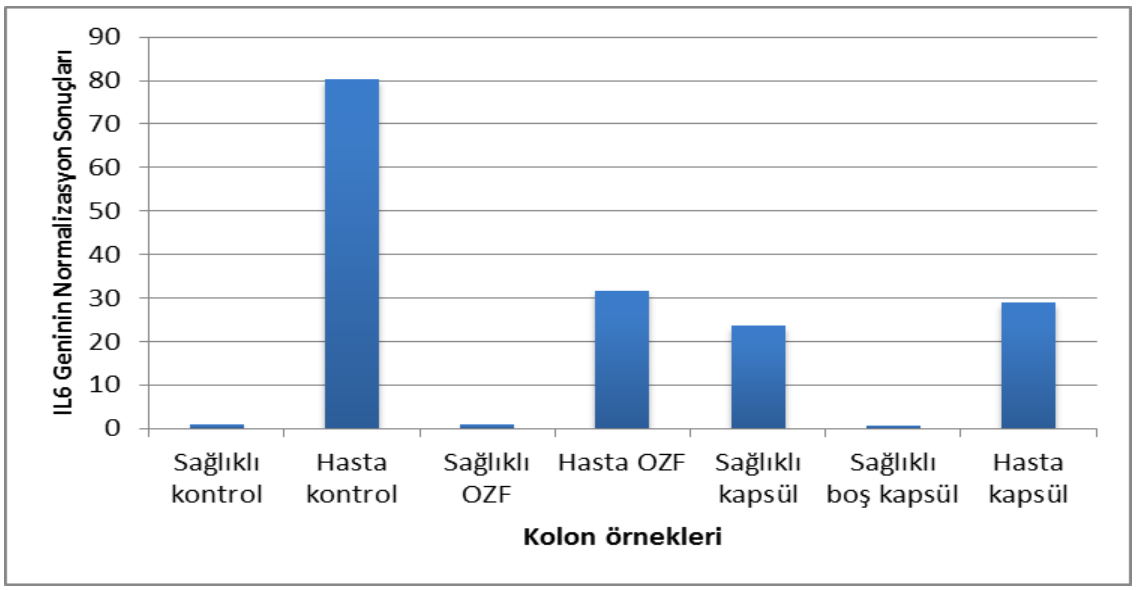
Şekil 4.14 Dalak örneklerindeki IL-1β geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu



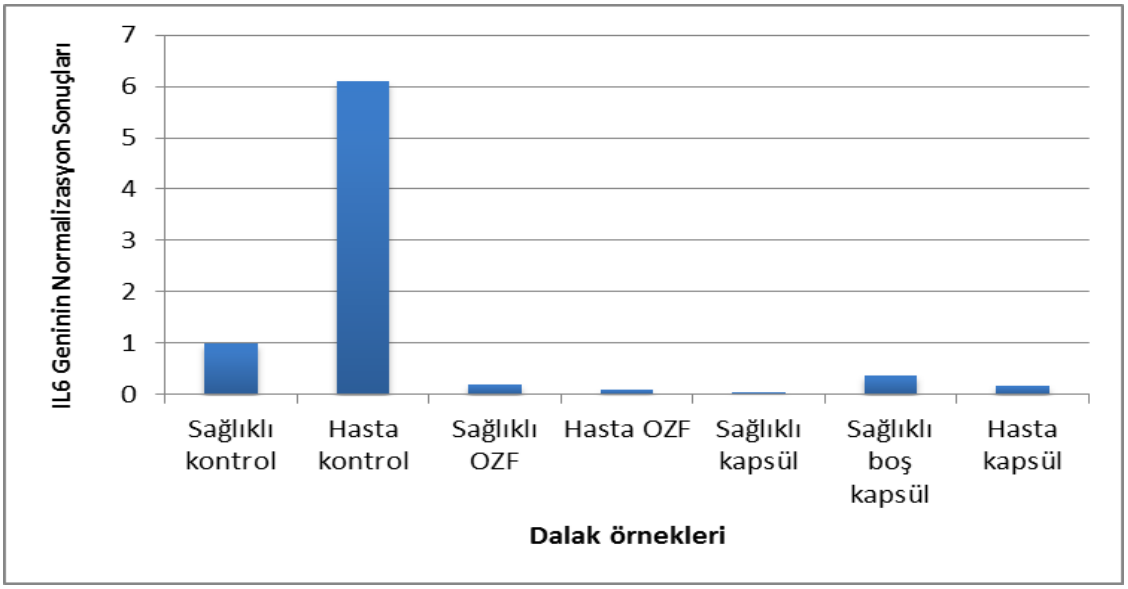
Şekil 4.15 Kan örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu

Proinflamatuvar etki gösterdiği bilinen IL-6 geninin ekspresyonu göz önünde bulundurulduğunda, TNBS-ile deneysel kolit oluşturulan hasta (kolit) grubu kan örneklerinden elde edilen sonuç sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda IL-6 gen ekspresyonunun baskılandığı (p>0.05), akabinde canlı ve enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşu ile muamele edilen hasta gruplarında bu ekspresyonunun bir miktar arttığı ancak bu artışın anlamlı (p>0.05) olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Yapılan bazı çalışmalarda IL6 geninin dual etki gösterebileceği yani, proinflamatuvar etki gibi anti-inflamatuvar etki sergileyebildiği gösterilmiştir.

IL-6 geninin hasta ve sağlıklı kolon örneklerindeki ekspresyonunda pro-inflamatuvar etki gösteren IL-6 geninin hasta grubunda ekspresyona uğradığı, canlı ve enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşu ile muamele edilen hasta gruplarında ise suşun immunomodülatör (anti inflamatuvar) etki gösterdiği ve sentezdeki bu artışı baskıladığı gözlemlenmiştir (p<0.05) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Kolon örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu



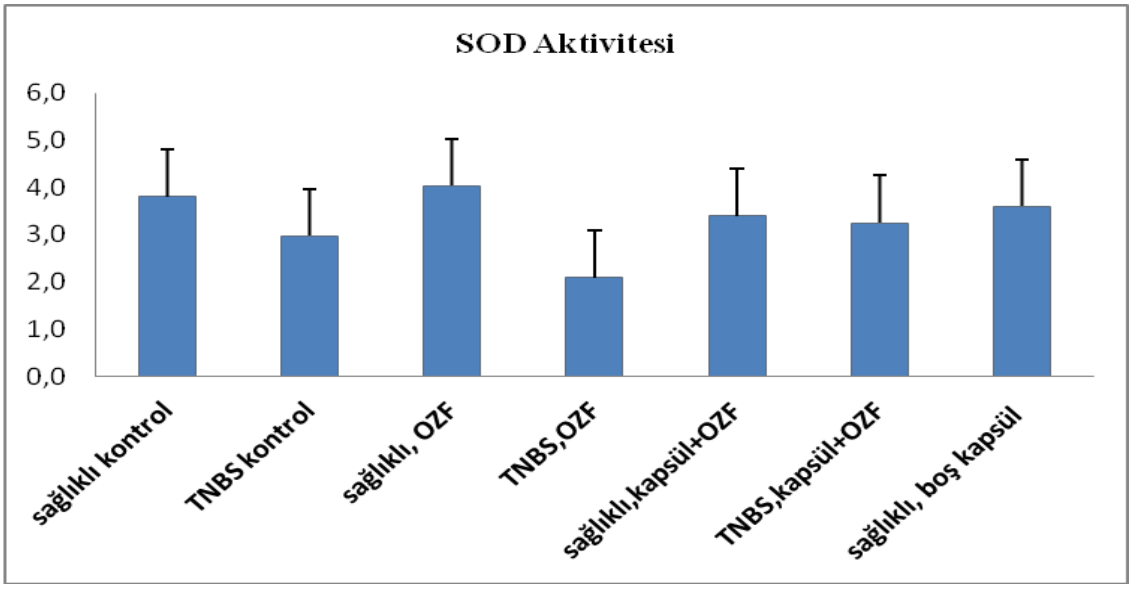
Şekil 4.17 Dalak örneklerindeki IL-6 geninin sağlıklı ve hasta (kolit) kontrol gruplarında qPZR ile normalizasyonu

Sağlıklı ve hasta gruplar arasında dalak doku örneklerinde qRT-PZR ile IL-6 geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında sağlıklı kontrole kıyasla hasta kontrolün IL-6 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.17). Hasta gruplar üzerinde canlı ya da enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşunun uygulamasına müteakip gen ekspresyonun seviyelerinde anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($p<0.05$).

4.5 Enzim Aktiviteleri

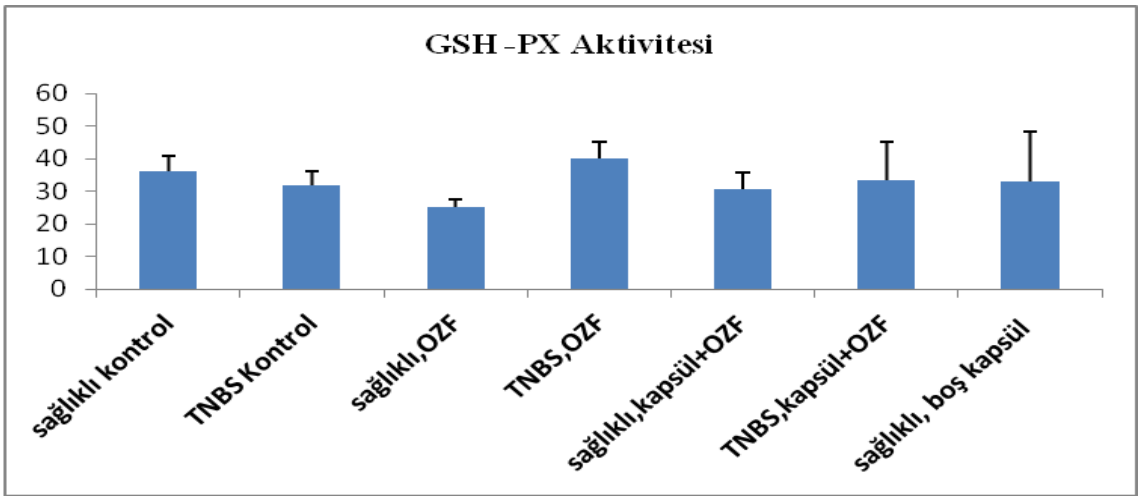
SOD aktivitesi: Antioksidan bir enzimdir. İBH'da SOD enzimi artaması gözlemlenmektedir.

TNBS, OZF ile beslenen gurupta SOD enziminin aktivitesi diğer guruplara göre azalmış, eğer antioksidan etki gösteren enzimin aktivitesi azalmışsa, bu demek ki, kullandığımız probiyotik bakterinin antioksidan etki gösterdiğini, diğer antioksidan enzimlere gereksinim duymadığını göstermektedir.



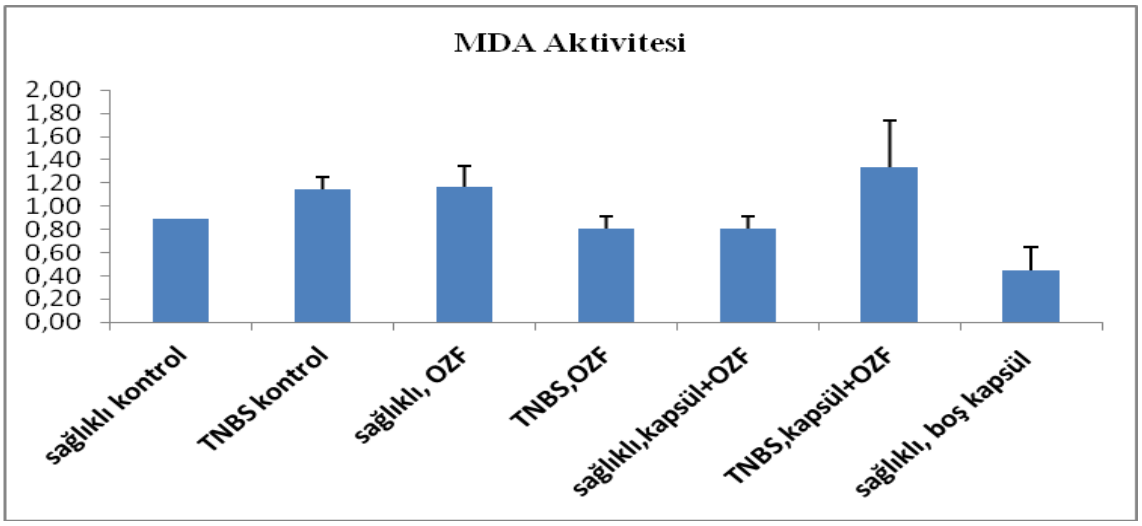
Şekil 4.18 SOD enzim aktivitesi sonuçları

GSH-Px aktivitesi: antioksidan bir enzimdir. Lipit peroksidasyonunun önlenmesinde önemli role sahiptir. Strese bağlı artmaktadır. Tüm gruplarda enzimin arttğı saptanmıştır ve *Pediococcuspentosaceus* OZF suşu enzimlere gereksinim duymadan antioksidan etki göstererek stresi azaltmış ve GSH-Px enziminin artmasını sağlamış.



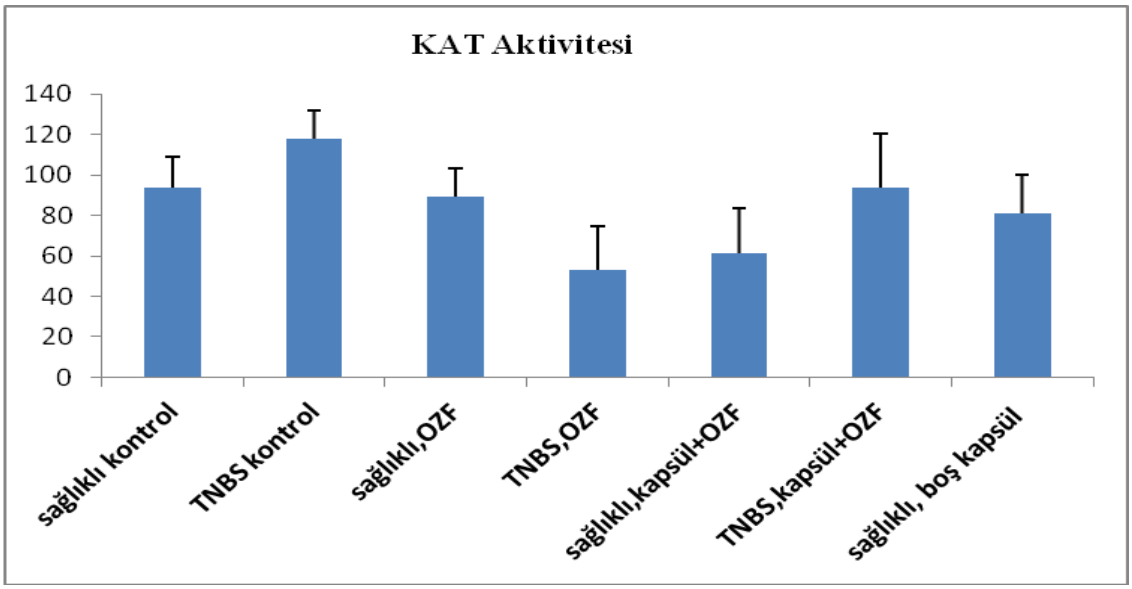
Şekil 4.19 GSH-Px enzim aktivitesi sonuçları

MDA enzim aktivitesi: peroksidasyonla oluşan MDA membran komponentlerin polimerizasyonuna sebebp olur. Enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonunu gibi membran özelliklerini değiştirir. MDA enzimi, Oksidatif enzimdir. Oksidatif stres yükselirse antioksidan enzimler salgılanır ve MDA enzim aktivitesi düşer. TNBS,OZF gurubunda MDA düşmüş, ve bu enzimin düşmesini antioksidan enzimleri kullanarak değil, probiyotik bakterinin kendisi nonenzimatik bir şekilde antioksidan etki göstermiş, ucutta bu enzimleri sentezlemeye gerek kalmamış.



Şekil 4.20 MDA enzim aktivitesi sonuçları

Katalaz, antioksidan etki gösteren enzimdir, tüm gurplara bakıldığında gruplarda katalaz aktivitesi artış göstermıştir. *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun katalaz enzimini arttırma etkisinin olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.21 KAT enzim aktivite sonuçları

Bağırsak hastalığında probiyotiklerin uygulanması bağırsak dokularında oksidatif stresi baskılayarak iyileştirdiği görülmüştür, ancak daha genç ölçekli insan çalışmasında kullanılabilir etki gözlemlenmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda daha önceki çalışmalarda anne sütünden izole edilerek moleküler teknikler neticesinde *Pediococcus pentosaceus* OZF olarak tanımlanan ve probiyotik olduğu belirlenen suşun hem canlı hem de enkapsüle edilmiş formunun (aljinat+kalsiyum) kolit hastalığı üzerinde tedavi edici etkisi trinitrobenzin sülfonik asit (TNBS) ile kolit oluşturulan sıçanlardan elde edilen kan ile dalak ve kolon gibi doku örneklerinde araştırılmıştır.

Sıçanlara TNBS muamelesini takip eden 24. saatte sıçanlarda su ve yem tüketiminde azalma, kilo kaybı ve bazı kayvanlarda kanlı ishal gözlenmeye başlandı. Yedi günün sonunda yapılan histopatolojik çalışmalar deneysel kolit oluşumunu doğrulamıştır. Sağlıklı ve hasta (kolit) grubu örneklerden izole edilen RNAüzerinden cDNA elde edilmiş ve IL1β ile IL6 gen ekspresyonu qRT-PZR ile gerçekleştirilmiştir. Anlamlı bulgular dalak doku örneklerinden elde edilmiştir. TNBS-ile deneysel kolit oluşturulan hasta (kolit) grubu dalak doku örneklerinden elde edilen sonuç sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta kontrolün IL-1β gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Hasta gruplar üzerinde canlı ya da enkapsüle edilmiş formdaki OZF suşunun uygulamasına müteakip gen ekspresyonun seviyelerinde anlamlı bir azalma kaydedilmiştir. Bu azalma suşun anti-inflamatuvar etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Benzer sonuçlar yine dalak doku örneklerinden elde edilen IL6 gen ekspresyon seviyesinde de gözlenmiştir.

Probiyotiklerin kolit üzerinde tedavi edici etkileri bilinmekle beraber bu etki suşa-bağımlıdır. Çalışmamızda kullanılan OZF suşundan elde edilen ön veriler bu suşun birincil organlarda ve kanda yeterli düzeyde anti influmatuvar etki sergilemediğini, daha kapsamlı ilave çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abei, H. and Bergmayer, H.U. Methods of Enzimatic Analysis. 1974. Catalase. New York and London: Academic Press Inc. 673-677.

Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I.V. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage. J Dairy Sci. 83:1946-1951.

Allison, T. 2008. Probiotic rescue: how you can use probiotics to fight cholesterol, cancer superbugs, digestive complaints and more. 850-879

Andres, P.G. and Friedman, L.S. 1999. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 28(2): 255-281.

Baumgart, D.C. and Sandborn, J. 2007. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. The Lancet. 369: 1641–1657.

Bengmark, S. 2003. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 17: 833-848.

Brown, A.C. and Valiere, A. 2004. Probiotics and medical nutrition therapy. Nutr Clin Care. 7(2): 56-68.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. J Food Eng. 104: 467–483.

Champagne, C.P. and Kailasapathy, K. 2008. Encapsulation of probiotics. In: Garti, N. (Ed.), Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals. Woodhead publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 344–369.

Chen, M.J and Chen, K.N. 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, 1st edition edited by Jamileh ML Wiley-Blackwell, USA 83-107.

Conte, M.P., Schippa, S. and Zamboni, I. 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. Gut. 55 (12): 1760 – 1767.

Cui, H.H., Chen, C.L., Wang, J.D., Yang, Y.J., Sun, Y., Wang, Y.D. and Lai, Z.S. 2003. The effects of bifidobacterium on the intestinal mucosa of the patients with ulcerative colitis. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 42(8): 554-557.

Dahle, L.K., Hill, E.G. and Hollman, R.T. 1962. The thiobarbiuturic acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Arch Biochem Biophys. 98: 253-261.

De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Int Dairy J. 20 (4): 292–302.

Del Carmen, S., de LeBlanc, A.M., Miyoshi, A., Rocha, C.S., Azevedo, V. and LeBlanc, J.G. 2011. Potential application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases. Ulcers. doi:10.1155/2011/841651

Durak, İ., Canbolat, O., Kavutucu, M., Öztürk, H.S. and Yurtaslan, Z. 1996. Activites of total, cytoplasmic and mitochondryal superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung canser. J Clin Lab Anal. 10: 17-20.

Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. 2004. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. Curr Opin Gastroenterol. 20(2):146-55.

Furrie, E., Macfarlane, S., Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T. 2004. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. Gut 53: 92–99.

Gardiner, K.R., Erwin, P.J., Anderson, N.H., Barr, J.G., Halliday, M.I. and Rowlands, B.J. 1993. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. Br J Surg. 80: 512-516.

Ghoddusi, H.B. and Robinson, R.K. 1998. The test of time. Dairy Industries Intl. 61: 25-28.

Gibson, G.R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. J Nutr. 129(7): 1438-1441.

Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A. and de Angleis, M. 1997. Production of crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. J Dairy Sci. 81: 37-47.

Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C. and Dankof, A. 2006. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4- dependent pathways. Infect Immun. 74: 4075–4082.

Guarner, R. 2007. Prebiotics in inflammatory bowel diseases. Brit J Nutr. 98: 85–89.

Guarner, F. and Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. Int J Food Microbiol. 39: 237-238.

Holzapfel, W.H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth, U. and Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. Am. J Clin Nutr. 73: 365S-373S.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem. 111: 50–55.

Ingmar Claes, J.J., Sigrid-De Keersmaecker, C.J., Vanderleyden, J. and Lebeer, S. 2011. Lessons from probiotic–host interaction studies in murine models of experimental colitis. Mol Nutr Food Res. 55: 1441–1453.

Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt

Iyer, C. and Kailasapathy, K. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. J Food Sci. 70: M18-M23

Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Iss Int Microbiol. 3(2): 39–48.

Kato, K., Mizuno, S. and Umesaki, Y. 2004. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 20(10): 1133-1141.

Kennedy, R.J., Kirk, S.J. and Gardiner, K.R. 2002. Mucosal barrier function and the commensal flora. Gut. 50:441–442.

Khalida, S., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt. Int Food Microbiol. 62: 47-55.

Khalil, A.H. and Mansour, E.H. 1998. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. J Food Sci. 63 (4): 702–705.

Kim, H.J., Camilleri, M. and McKinzie, S. 2003. A randomized controlled trial of probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. 17(7): 895-904.

Kneifel, W., Jaros, D. and Erhard, F. 1993. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt-related products fermented with commercially available starter cultures. Int J Food Microbiol. 18: 179-189.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int Dairy J. 13 (1), 3–13.

Lacroix. C., Paquin, C. and Arnaud, J.P. 1990. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Optimisation of the rheological properties of the entrapment gel matrix. Appl Microbiol Biotechnol. 32: 403-408.

Lee, K.Y. and Heo, T.R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Appl Envir Microbiol. 66: 869-873.

Leo, R.F. and Kelly, D.K. 2010. Bioactive Foods in Promoting Health. Probiotics and Prebiotics. Loftus EV and Sandborn WJ. 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 31:1-20.

Leon, F., Contractor, N., Fuss, I., Marth, T., Lahey, E., Iwaki, S., la Sala, A., Hoffmann, V., Strober, W. and Kelsall, B.L. 2006. Antibodies to complement receptor 3 treat established inflammation in murine models of colitis and a novel model of psoriasiform dermatitis. J Immunol 177: 6974-6982.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. Methods 25: 402–408.

Loftus, E.V. and Jr, Sandborn, W.J. 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 31: 1–20.

Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C. 2001. Review: Yoghurt as probiotic carrier in food. Int Dairy J. 11: 1-17.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, L. and Randall, R. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 182:265-275

MacDonald, T.T. and Murch, S.H. 1994. Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. Baillieres Clin Gastroenterol. 8(1):1-34.

Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T. 2004. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. Clin Infect Dis. 38: 1690–1699.

Madsen, K. 2006. Probiotics and the immune response. J Clin Gastroenterol. 40(3): 232-234.

Mañé, J., Lorén, V., Pedrosa, E., Ojanguren, I., Xaus, J., Cabré, E., Domènech, E. and Gassull, M.A. 2009. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. Inflamm Bowel Dis. 15(8):1155-63.

Manuela, G.N. and Radu, M.N. 2012. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. Translational Res. 160: 29–44.

Marteau, P. 2006. Living drugs for gastrointestinal diseases: the case for probiotics. Dig Dis. 24: 137-147.

Martins, N.B. and Peppercorn, M.A. 2004. Inflammatory bowel disease. Am J Manag Care. 10: 544-552.

Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S. and Yokokura, T. 1998. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J Dairy Sci. 81: 48-53.

Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M. 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. Gut. 53(6): 821-828.

Mithun Vishwanath, K. P., Amit, D.K. and Sucheta, D.B. 2012. Effect of aqueous extract of *Cucumis sativus* Linn. fruit in ulcerative colitis in laboratory animals. Asian Pac J of Trop Biomed. S962-S969.

Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H. and Hosoda, M. 2002. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. Microbiol Immunol. 46(4): 293-297.

Murthy, S.N., Cooper, H.S., Shim, H., Shah, R.S., Ibrahim, S.A. and Sedergran, D.J. 1993. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. Dig Dis Sci. 38(9):1722-34.

Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross,V. and Falk, W. 1999. İnterferongamma (IFN-γ) and tumour necrosis factor (TNF) induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis in mice. Clin Exp Immunol. 116: 238-245.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. and Nakaya, R.1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 98(3):694-702.

O'Mahony, L., McCarthy, J. and Kelly, P. 2005. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. Gastroenterology. 128(3): 541-551.

Osman, N., Adawi, D., Ahrne, S., Jeppsson, B. and Molin, G. 2004. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Dig Dis Sci. 49: 320-327.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Ataoglu, H. 2010. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. Probiotics Antimicrob Proteins. 2:162–174.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Nes, I.F. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceous* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. Afr J Biotechnol. 10(11):2017–2079.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F., Yagci, F.C. and Gursel, I. 2012. Immunomodulatory function and in vivo properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain. Ann Microbiol DOI 10.1007/s13213-012-0590-9.

Pagila, D.E. and Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterizastion of erythrocyte glutathione peroksidase. J Lab Clin Med. 70:158-169.

Penner, R., Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. Curr Opin Pharmacol. 5(6): 596-603.

Pessi, T., Sutas, Y., Hurme, M. and Isolauri, E. 2000. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. Clin Exp Allergy. 30: 1804-1808.

Picot, A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int Dairy J. 14 (6), 505–515.

Prantera, C., Zannoni, F., Scribona, M.L., Berto, E., Andreoli, A. and Lohn, A. 1996. An antibiotic regimen for to the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled trial of metranidazole plus ciprofloxacin. Am J Gastroenterol. 91: 328-332.

Poncelet, D., Dreffier, C., Subra-Paternault, P. and Vandamme, T.F. 2007. Introduction aux techniques de microencapsulation. In: Vandamme, T., Poncelet, D., Subra-Paternault, P. (Eds.), Microencapsulation: des Sciences aux Technologies. Ed. Tec & doc, Paris, pp. 3–7.

Poncelet, D., Silva Prata, A., El Mafadi, S.and Boillereaux, L. 2009. Advances in Fluid Bed Coating: from dynamic to process control, in 36THAnnual meeting and exposition of the controlled release society, Copenhagen Denmark, July 18-22, 2009.

Prevost, H. and Divies, C. 1992. Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. Biotechnol Lett. 14: 583-588.

Rembacken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M. and Axon, A.T. 1999. Nonpathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. Lancet. 354(9179): 635-639.

Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci. 83: 894-907.

Sheu, T.Y. and Marshall, R.T. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J Food Sci. 58: 557-561.

Sodini, I., Boquien, C.Y., Corrieu, G., and Lacroix, C. 1997. Use of an immobilised cell bioreactor for the continuous inoculation of milk in fresh cheese manufacturing. J. Industrial Biotechnol. 18: 56-61.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L. and Lakhdari, O. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:16731–16736.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. 1998. Probiotic cheese. Int Dairy J. 8 (5–6): 491–496.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F. and Falk, W. 2000.

Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science. 289(5483): 1352-1355.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R. and Peiris, P. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. Int J Food Microbiol. 62 (1–2): 47–55.

Tamime, A.Y. 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications a review. Eur J Clin Nutr. 56 Suppl 4: 2-15.

Targan, S.R., Hanauer, S.B., Van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H. and Braakman, T. 1997. A short- term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's disease cA2 Study group. NEJM. 337: 1029-1035.

Van Deventer, S.J., Elson, C.O. and Fedorak, R.N. 1997. Multiple doses of intravenous interleukin-10 in steroid-refractory Crohn's disease. Gastroenterology. 113: 383-389.

Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M. and Christakis, D.A. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics. 109(4): 678-684.

Yoo, I.K., Seong, G.H., Chang, H.N. and Park, J.K. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. Enzyme Microbial Technol. 19: 428-433.

Zuidam, N.J. and Shimoni, E. 2009. Overview of microencapsulates for use in food

products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer-Verlag, New York Inc., pp. 3–29.

Zwolińska-Wcisło, M., Brzozowski, T., Budak, A., Sliwowski, Z., Drozdowicz, D. and Kwiecień, S. 2007. Studies on the influence of *Candida* fungal colonization on the healing process of inflammatory lesions in the colon in rat animal model. Przegl Lek. 64(3):124-129.

EKLER

EK 1 Etik kurul kararı ve deney hayvanları kullanım sertifikası 79

EK 2 Bakteri gelişimi için kullanılan besiyeri içeriği 82

EK 3 Tampon ve çözeltiler 83

EK 4 cDNA sentez protokolü 87

EK 1

ETİK KURUL KARARI ve

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/168-24525 10../12../**2012**
KONU :

Sayın
Prof.Dr.Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Özlem OSMANAĞAOĞLU, ZHANATGUL SAKYP, Harun ÖNLÜ'den oluşan, G.Ü.ET-12.097 kod numaralı ve ***"Sıçanlarda Kolit Tedavisinde Ağızdan Verilen Canlı ve Enkapsüle Edilmiş*** *Pediococcus Pentosaceus* ***OZF Suşunun Etkisinin Araştırılması"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-12.097 and entitled ***"Investigation the Effect of Oral Administrations of Live and Encapsulated*** *Pediococcus Pentosaceus* ***OZF Strain on Treatment of Colitis in Rats"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

L. AÇIK

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : **66332047**-604.01.02/ 102-12322 **29/05/2013**
KONU :

Sayın
Prof.Dr.Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Öğretim Üyesi

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-12.097 kod numaralı "***Sıçanlarda Kolit Tedavisinde Ağızdan Verilen Canlı ve Enkapsüle Edilmiş*** *Pediococcus Pentosaceus* ***OZF Suşunun Etkisinin Araştırılması"*** adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 03.05.2013 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup,

Araştırmanızda kullanılacak hayvan sayısına ilave olarak 12 adet daha hayvan talebiniz Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

L. AÇIK

Prof.Dr.Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

T.C.Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, 06500 Teknikokullar, Ankara
Tel : 0 312 202 20 57 Faks: 0 312 202 20 63

XI. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

02-10 Mayıs 2012

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Zhanatgul SAKYP

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 02-10 Mayıs 2012 tarihleri arasında düzenlenen *"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XI "* e katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
REKTÖR

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
ETİK KURUL BAŞKANI

Prof. Dr. Sacit TURANLI
MERKEZ MÜDÜRÜ

2012/111-56

EK 2 BAKTERİ GELİŞİMİ İÇİN KULLANILAN BESİYERİ İÇERİĞİ

TGE BESİYERİ

(Tripton Glucose Yeast Extract):

İçerik	**% gr**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstraktı	1.0
Tween-80	0.1
$MnSO_4$	0.005
$MgSO_4$	0.005

Besiyeri içerikleri 100ml distile su içerisinde çözülmüştür. Sterilizasyonu otoklavda 121ºC'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

EK 3 TAMPON ve ÇÖZELTİLER

$CaCl_2$ TAMPON	**%gr**
$CaCl_2$ (1M)	16.5

FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS) (pH=7,4)	**% gr**
NaCl	2
Na_2HPO_4	0.144
KH_2PO_4	0.024

1X TBE (Tris- Borik asitEDTA)(pH 8.3)	**% gr**
Tris	10.8
Borik Asit	5.5
EDTA	0.94
Distile su	1000 mL

YÜKLEME BOYASI	**% gr**
Brom fenol blue	0,25
Sakkaroz	40
Distile su	100 mL

İçerik 100ml'de çözüldükten sonra 0.22 μm çapındaki membran filtreden geçirilerek buzdolabında saklanmıştır.

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTISI **% gr**

Etidyum Bromit	1
Distile su	100 mL

İçerikler 100ml de çözüldükten sonra 0.22 μm çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve buzdolabı ısısında karanlık bir şişede saklanmıştır.

AGAROZ JEL (%1) **% gr**

Agaroz	1
1X TBE	100 mL
EtBr	4 μL

Çalışmada kullanılan diğer jeller ise belirtilen konsantrasyonlarda agaroz eklenere hazırlanmıştır.

LOWRY YÖNTEMİ ve ENZİM AKTİVİTELERİNİN TEPİTİ İÇİN KULLANILAN REAKTİFLER

A Reaktif **% gr**

$CuSO_4.5H_2O$	0,5
Sodyum sitrat	1
Distile su	100ml

B Reaktif **% gr**

Na_2CO_3	20
NaOH (1L)	0,1 N

C Reaktif	**Ml**
B Reaktif	50ml
A Reaktif	1

50ml B reaktifine 1ml A reaktifi eklenerek hazırlanır.

D Reaktif	**Ml**
Folin-Ciocelta u	10ml
Distile su	10ml

Folin-Ciocelta u Fenol Reaktifi	**%gr**
Sodyum Tungstat (Na_2WO_4-$2H_2O$)	100
Sodyum Molibdat (Na_2MoO_4-$2H_2O$)	25
Distile su	700 ml
o-fosforik asit	50 ml
HCl	100 ml

10 saat süreyle hafif ateş altında kaynatılıp, 150 gr litryum sülfat (Li_2SO_4) ve 50 ml H_2O eklendikten sonra 3 damla brom damlatılmıştır. Karışım 15 dakika süreyle yoğunlaştırıcı olmadan kaynatılmış, soğuyunca distile suyla 1 litreye tamamlanmıştır.

Fosfat Tamponu (pH=6, 100mM)	**%gr**
Na_2HPO_4	2,13
KH_2PO4	11,56
Distile su	1 litre

TBA (%2 w/v)	**%gr**
TBA	0,02
Distile su	10 ml

Trikloroasetik Asit (TCA)	**%gr**
TCA	100
0,6 N HCl	500 ml

Reaktif 1 (toplam hacim 490 ml)	**%gr**
Ksantin	0,091
Distile su	200 ml

Birkaç damla 1N NaOH ile çözülür. NBT 12,3 mg alınır, distile su ile 100 ml haceme tamamlanır, EDTA 25 mg alınıp distile su ile 100 ml haceme tamamlanır. Bovin albumin 30 mg alınıp distile su ile 30 ml haceme tamamlanarak çözülür. Ksantin oksidaz (XO) çözeltisi hazırlamak için 10 µl XO, 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta çözülür. $CaCl_2$ çözeltisi 108 mg tartılır 100 ml distile suda çözülür.

Fosfat Tamponu	**%gr**
(pH=7; 50mM EDTA)	
Na_2HPO_4	4,2
KH_2PO_4	2,72
EDTA	2,08
Distile su	1 litre

GSH çözeltisi, 250mg GSH'nin 5ml fosfat tamponunda çözülmesi ile elde edilmektedir. 15 mg NADPH tartılarak 2,5ml fosfat tamponunda çözülür.

EK 4 cDNA SENTEZ PROTOKOLÜ

Procedure A: cDNA Synthesis with anchored-oligo(dT)$_{18}$ primer **OR** random **OR** sequence-specific primer

The following conditions describe a first-strand cDNA synthesis for a two-step RT-PCR. Fig.1 shows the standard procedure for cDNA synthesis used for single reactions and the simplified one if multiple reactions should be performed.

Single reactions

Preparation

RNA + primer + water
Optional: Denaturation
10 min 65°C

saf total RNA :2 µg
Anchored- oligo(dT)$_{18}$ primer:10 µM
Son hacim 6.5 µl olacak şekilde PCR suyu eklenir

↓

Place on ice
Add buffer, RNase Inhibitor, dNTPs, and Transcriptor RT

1X Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer : 2 µl
20 U Protector Rnase Inhibitor: 0.25 µl
1 mM deoksinükleotid karışımı: 1 µl
10 U Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase: 0.25 µl

↓

cDNA synthesis

Anchored-oligo(dT)$_{18}$ primer/gene-specific primer
30 min 55°C or 1 h 50°C

↓

65°C 10 dk; 55°C 30 dk; 85°C 5 dk
Sentez sonrası elde edilen cDNA'larda saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spectrometre aracılığı ile belirlenmiştir.

Inactivation at 85°C for 5 min

↓

Add 1-5 µl to a PCR or real-time PCR

Fig. 1: Overview of cDNA synthesis procedures in single and multiple reactions

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zhanatgul SAKYP

Doğum Yeri : Çin

Doğum Tarihi : 31.12.1984

Yabancı Dili : İngilizce, Çince

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çin Halık Cuhuryeti Sıncan, №1 Kazak okulu. 1999-2004

Lisans : Kazakistan, Gumilev Adındaki Avrasya Milli Üniversitesi. 2005-2009

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı- (Eylül 2011-Ağstos 2013)