

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALARIN
GASTROİNTESTİNAL SİSTEM UYUMLULUĞU VE
ENTERİK PATOJENLERE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR SEMRA TOPRAK KAVAS

TEZ DANIŞMANI: PROF DR HÜSEYİN TURGUT

DENİZLİ – 2007

İş bu çalışma jürimiz tarafından İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul
edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. Hüseyin Turgut

ÜYE

Prof. Dr. İlknur Kaleli

ÜYE

Doç. Dr. Serhan Sakarya

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Suzan Saçar

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Şerife Akalın

Yukarda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

03/07/2022
DEKAN
Prof. Dr. Zafer AYBEK
Dekan V.

İş bu çalışma jürimiz tarafından İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul
edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda onur ve kıvançla sürdürmekte olduğum uzmanlık eğitimi sürecimi tamamlamak üzereyim. Uzmanlık eğitimim boyunca en iyi şekilde yetişmem için kendi bilgi ve birikimini, uzmanlık alanım ve hekimlik mesleğimle ilgili kendimi geliştirmem konusunda, sonsuz desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof Dr Hüseyin Turgut'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu tezin tüm aşamalarında yardım sağlayan, bilgi ve deneyimlerini sonsuz bir sabırla paylaşarak bilimsel anlamda farklı bir bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli hocam Doç Dr Serhan Sakarya'ya,

Eğitimim süresince yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlanmış olduğum, beni her zaman ve her konuda dinleyip sorunlarıma anlayış ve çözüm getiren değerli hocam Yrd Doç Dr Suzan Saçar'a,

Destek ve ilgilerini esirgemeyen, tez çalışmam boyunca kolaylık ve anlayış gösteren, teorik ve pratik bilgilerini paylaşan değerli hocalarım Yrd Doç Dr Selda Sayın Kutlu ve Yrd Doç Dr Şerife Akalın'a,

Rotasyon eğitimi aldığım süre içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, başta Prof Dr İlknur Kaleli olmak üzere Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalında çalışan hocalarım, asistan ve laborant arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr Ali Asan, Dr Derya Cenger, Dr Özlem Yılmaz, Dr Demet Ökke, Dr Selmin Çaylak, Dr Berna Başkan, Dr Banu Karahasanoğlu ve Dr Ayşegül Kartal'a

Tez çalışmam süresince laboratuvar açısından bana yardımcı olan Burcu Kurt Mestav ve Engin Gülen'e,

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen annem, babam, kardeşlerim ve sevgili eşim Murat Kavas'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM FLORASI VE ÖNEMİ.....	2
2.1.1. Gastrointestinal mikrofloranın işlevleri.....	4
2.2. PROBİYOTİKLER.....	6
2.2.1. Tarihçe.....	7
2.2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar ve mikrobiyolojik özellikleri.....	7
2.2.3. Etkili probiyotik türlerin temel özellikleri.....	10
2.2.4. Probiyotiklerin etki mekanizmaları.....	11
2.2.5. Probiyotiklerin sağlığa yararları	18
2.2.6. Probiyotiklerin yan etki ve komplikasyonları.....	19
2.3. AKUT İNFLAMATUAR GASTROENTERİTLER	
2.3.1. İshal Patogenezine Etkili Faktörler.....	20
2.3.2. İshal patogenezi.....	23
2.3.3. Akut İnflamatuar Diyarelerde Tanı ve Tedavide Genel Yaklaşım İlkeleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Bakteriler ve üreme koşulları.....	26
3.2. Probiyotik mikroorganizma supernatantlarının (SCS) hazırlanması.....	26
3.3. Besiyerleri.....	27
3.4. Probiyotiklerin asit duyarlılığının tespiti.....	28
3.5. Probiyotiklerin safra duyarlılığının tespiti.....	28
3.6. Plak-diffüzyon tekniği.....	29
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR.....	54
7. ÖZET	55
8. YABANCI DİL ÖZETİ.....	57
9. KAYNAKLAR	59

TABLolar ÇİZELGESİ

	SAYFA NO
Tablo-1: Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	8
Tablo-2 : Probiyotik mikroorganizmaların asit duyarlılığı.....	31
Tablo-3: Probiyotik mikroorganizmaların safra duyarlılığı.....	33

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

SAYFA NO

Şekil-1: Gastrointestinal sistemin değişik kısımlarında bulunan mikroorganizmalar	3
Şekil-2: <i>L. acidophilus</i> 'un farklı pH'larda üreme yoğunluğu	31
Şekil-3: <i>L. casei</i> 'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu	32
Şekil-4: <i>S. cerevisiae</i> 'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu	32
Şekil-5: <i>S. boulardii</i> 'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu	32
Şekil-6: <i>L. acidophilus</i> safra duyarlılığı	33
Şekil-7: <i>L. casei</i> safra duyarlılığı	33
Şekil-8: <i>S. cerevisiae</i> safra duyarlılığı	34
Şekil-9: <i>S. boulardii</i> safra duyarlılığı	34
Şekil-10: <i>S. typhi</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları	35
Şekil-11: Probiyotik mikroorganizmaların <i>S. typhi</i> 'de inhibisyon zon çapları	35
Şekil-12: Probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının <i>S. typhi</i> 'de oluşturdukları inhibisyon zon çapları	35
Şekil-13: <i>S. typhi</i> kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları	36
Şekil-14: <i>S. typhi</i> kültüründe <i>Lactobacil</i> türleri ve süpernatantlarının inhibisyon Zonları	36
Şekil-15: <i>S. typhi</i> kültüründe <i>L. casei</i> ve süpernatantının inhibisyon zonları	37
Şekil-16: <i>S. typhi</i> kültüründe <i>S. boulardii</i> inhibisyon zonu	37
Şekil-17: <i>S. enteritidis</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları	38
Şekil-18: Probiyotik mikroorganizmaların <i>S. enteritidis</i> 'te oluşturdukları inhibisyon zon çapları	38
Şekil-19: <i>S. enteritidis</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları	38
Şekil-20: <i>S. enteritidis</i> kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları	39
Şekil-21: <i>S. enteritidis</i> kültüründe <i>Lactobacil</i> türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları	39

Şekil-22: <i>S. enteritidis</i> kültüründe <i>Lactobacil casei</i> ve süpernatatının inhibisyon zonları.....	40
Şekil-23: <i>E. coli</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları.....	40
Şekil-24: <i>E. coli</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmaların inhibisyon zon çapları.....	41
Şekil-25: <i>E. coli</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları.....	41
Şekil-26: <i>E.coli</i> kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları.....	42
Şekil-27: <i>E.coli</i> kültüründe <i>Lactobacil</i> türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları.....	42
Şekil-28: <i>E.coli</i> kültüründe <i>Lactobacil casei</i> ve süpernatatının inhibisyon zonları.....	43
Şekil-29: <i>S. sonnei</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları.....	43
Şekil-30: <i>S. sonnei</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmaların inhibisyon zon çapları.....	44
Şekil-31: <i>S. sonnei</i> kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları.....	44
Şekil-32: <i>S. sonnei</i> kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları.....	45
Şekil-33: <i>S. sonnei</i> kültüründe <i>Lactobacil</i> türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları ..	45
Şekil-34: <i>S. sonnei</i> kültüründe <i>L. acidophilus</i> ve süpernatatının inhibisyon zonları.....	46

KISALTMALAR

TLR	Toll benzeri reseptörler
NF	Nükleer faktör
AMP	Adenozin monofosfat
EIEC	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
ST	Stabil toksin
LT	Labil toksin
SCS	Spent culture supernatant
RSHM	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
MRS	De Man Rogosa Sharpe
SDA	Sabouroud Dextrose Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
SF	Serum fizyolojik
PBS	Fosfat buffer saline
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IgA	İmmunglobulin A
IgE	İmmunglobulin A
IFN-8	İnterferon 8
IL-12	İnterlökin 12
Th	T helper

I. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlarla karşılıklı yarar sağlama çerçevesinde canlılıklarını devam ettiren çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Normal mikroflora; özellikle çok yoğun ve farklı bakterinin bulunduğu gastrointestinal sistem florası, konağın birçok biyokimyasal, fizyolojik ve immunolojik özelliklerini ve ekzojen patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu etkilemektedir (1,2,3).

Probiyotikler, “yeterli miktarda alımı sonucu konağın sağlıklı kalmasını ve hastalıkların tedavisini sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır (4). Gastrointestinal sistemin normal florasında bulunmaları yanında, fermente edilmiş yiyeceklerle de alınmaktadır (5,6,7,8). Bununla birlikte uzun yıllardır gerek terapötik gerekse profilaktik olarak antibiyotikle ilişkili diyare, psödomembranöz kolit, seyahat diyaresinde adjuvan olarak kullanılmakta ve inflamatuvar barsak hastalıkları, alerjik hastalıklar, kolon kanseri önlenmesi başta olmak üzere çok çeşitli alanlarda kullanımına yönelik başarılı araştırmalar sürdürülmektedir (5,9,10).

Gelişmekte olan ülkelerde, akut gastroenteritlerin yarısından fazlasının bakteriyel orijinli olduğu bildirilmiştir. Gastroenterit etkenlerinden, dizanteri tablosu ile seyreden invaziv etkenlerin antibiyotikle tedavisi gerektiği bilinmekte; ancak bu tedavinin flora üzerine oluşturdukları baskılayıcı etki ve antibiyotik direnç sorunu yeni tedavi arayışlarını gündeme getirmektedir.

Bu çalışma ile probiyotik olarak tanımlanmış mikroorganizmaların, gastrointestinal sistem koşullarına dirençleri ve enterik patojenlere karşı etkisi araştırılmıştır. İnvazyon yolu ile akut gastroenterite neden olan ve sıklıkla izole edilen; *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei* ve *Escherichia coli*'ye karşı etki mekanizmalarını aydınlatmak adına, probiyotik mikroorganizmaların kendi canlı suşları ve canlı mikroorganizma içermeyen süpernatantları kullanılmıştır. Probiyotik olarak, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces boulardii* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşları seçilmiş ve hem fizyolojik bariyerlere dirençlerini hem de etken patojenleri inhibe etme yeteneklerini ortaya koymak hedeflenmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

GASTROİNTESTİNAL SİSTEM FLORASI VE ÖNEMİ

İnsanlarla karşılıklı yarar sağlama çerçevesinde canlılıklarını devam ettiren çok sayıda mikroorganizma olduğu, hatta yoksunluklarında çeşitli hastalıkların meydana gelmesini sağladıkları ya da kolaylaştırdıkları bilinmektedir. İnsan vücudunda ökaryotik hücre sayısının (10^{13}) 10-20 katı mikroorganizma (10^{14}) bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerin bağırsaklarındaki mikroorganizma türü sayısı yaklaşık 500'dür (2).

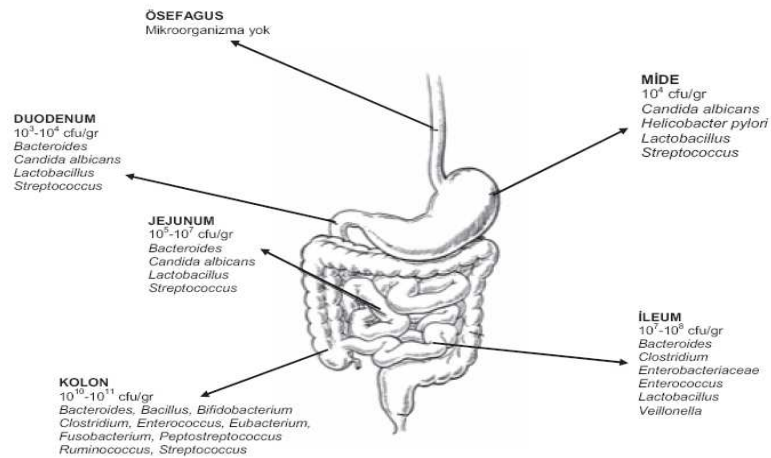
Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistem (GİS) sindirim ve boşaltım fonksiyonları yanında, oluşabilecek sistemik veya lokal enfeksiyonların en önemli giriş yollarından biridir. GİS'in anatomik, kimyasal ve biyolojik bariyerleri enfeksiyon oluşumunu engelleyen en önemli savunma mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar direkt ve indirekt yollarla enfeksiyonun gelişimini engellerler.

Normal floranın oluşumu kompleks bir süreçtir. Bu süreci etkileyen başlıca faktörler, doğum yöntemi, diyet, mikrop-mikrop ve mikrop-konak ilişkileridir (11). GİS normal florası doğumda steril iken, doğumdan hemen sonra doğum sırasında yutulan annenin vajinal ve fekal florasına bağlı olarak *Lactobacillus spp.* ve az miktarda *E. coli* ve *Streptococcus* yer almaktadır (2). Bebek anne sütü ile beslenmeye başladığında *Bifidobacteria* türleri artmaya başlar (2,3). Bebek anne sütü almaya devam ettiği süre boyunca *Bifidobacter*'ler floraya hakimdir (10^{10} - 10^{11} gr/gaita). GİS immun sistemi kullanıma hazırlayan bu bakterilerdir ve bunlar olmaksızın immun sistemin normal fonksiyon göremeyeceği kanıtlanmıştır (12). Sağlıklı bebeklerde, ikinci yılın sonuna doğru, erişkin florasının benzeri flora oluşmaya başlar.

Normal mikroflora, antimikrobiyal ajanların kullanımı başta olmak üzere, yaşlılık ve hastalık gibi etkenler ile değişikliklere uğrayabilmektedir (13). Probiyotiklerin bu değişime karşı çıktığı ve bu suretle patojenik bakterilerin kolonizasyonu riskini azalttıkları düşünülmektedir (14,15).

Flora bakterilerinin metabolizmasıyla oluşan lokal pH veya redoks potansiyeli değişiklikleri ve bazı bakterilerce oluşturulan hidrojen sülfür ve kısa zincirli yağ asitleri, patojen mikroorganizmaları inhibe edici özellik sağlamaktadır. Flora bakterileri potansiyel bağırsak patojenlerinin yerleşimini önler (kolonizasyon direnci) (16,17).

Gastrointestinal sistem, intestinal mikroflora ve konakçı arasında hassas bir dengede olan kompleks bir ekosistemdir (2). Mikroflora, başlıca fakültatif anaerob ve zorunlu anaeroblardan oluşmaktadır (3). İnsanlarda barsak bakteriyel popülasyonunun yaklaşık olarak %95'i *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* ve *Bacteroides* türlerinin içinde bulunduğu zorunlu anaeroblardan oluşmaktadır. Barsak popülasyonunun yaklaşık olarak %1-10'unda ise *Lactobacillus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* türlerinin dahil olduğu fakültatif anaeroblar bulunmaktadır (2,3). Aerobik organizmalar çok az miktarda bulunan *Pseudomonas* dışında sağlıklı bireylerin intestinal sisteminde bulunmazlar. GİS'in bölümlerine göre incelediğimizde; midede ~100 CFU/ml, ince barsakta ~10⁴- 10⁸ CFU/ml çoğunluğunu fakültatif anaerobların oluşturduğu mikroorganizma bulunurken; kolonda 10¹¹ -10¹² CFU/ml zorunlu anaerob ve daha az fakültatif anaeroblar bulunmaktadır (15,18). Gastrointestinal sistemin değişik kısımlarında bulunan mikroorganizmalar şekil 1'de gösterilmiştir. Bu bakteriler bağırsak mukozası ile stabil bir ekosistem oluşturmaktadır.



Şekil 1. Gastrointestinal sistemin değişik kısımlarında bulunan mikroorganizmalar.

Mikrobiyal florayı etkileyen faktörler; konakçının çeşitli fizyolojik durumları (yaş, stres, sağlık durumu, etnik çevre), diyet içeriği ve çevresel faktörler (patojenlerle kontaminasyon, ilaç kullanımı vb.) ile ilişkili olabilir. Diyet veya iklimde değişiklikler, yaş, ilaç kullanımı, hastalık, stres veya infeksiyon genelde ince barsakta anaerobların ve *E. coli*'nin artışına sebep olurken, kolonda barsak bakterileri ve *Streptococcus* türlerinde artış ile birlikte *Bifidobacterium* miktarında azalmaya neden olur. Florada bulunan mikroorganizmaların sayısı azaldığında çeşitli sağlık sorunları (ishal ve kolit gibi) ortaya çıkmaktadır. Geçirgenliği artan bağırsak duvarından antijenik proteinlerin geçişi artmakta ve inflamatuvar yanıt zinciri işlemeye başlamaktadır. Bağırsaklarda flora dengesinin bozulduğu bu gibi durumlarda (antibiyotik kullanımı) probiyotik desteği önem kazanmaktadır (2).

Gastrointestinal mikrofloranın işlevleri

Günümüzde, normal insan mikroflorasının ekzojen patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı bir bariyer olarak önemli olduğu bilinmektedir (1). Normal mikroflora; özellikle çok yoğun ve farklı bakterinin bulunduğu gastrointestinal sistem florası, konağın birçok biyokimyasal, fizyolojik ve immunolojik özelliklerini etkilemektedir (14).

Barsak mikroflorası, immun sistem maturasyonu, normal intestinal morfolojinin gelişmesi ve immunolojik olarak inflamatuvar yanıtı dengelemek için önemlidir. İntestinal mikrobiyal dengenin herhangi nedenle bozulması çeşitli gastrointestinal rahatsızlıklarla sonuçlanmaktadır. Sağlıklı infant mikroflorası, besin maddelerinden tam olarak yararlanmada ve zararlı çevresel etkenlere karşı defans mekanizmasında önemli bir rol oynar (3).

Flora bakterileri ile bağırsak epitel hücreleri ve intestinal lenfoid doku arasında devamlı bir etkileşim söz konusudur. Bağırsak bakterileri “Toll-like reseptörler” (TLR) ve “nucleotide-binding oligomerisation domain” (NOD) proteinleri tarafından tanınır. Bu reseptörler bakteri hücre duvarı lipopolisakkaritleri, peptidoglikanlar, bakteriyal flajellin ve metillenmemiş bakteri DNA'ları aracılığı ile ayırt edilir. Patojen bakteriler bu reseptörler aracılığı ile inflamasyon başlatırken, patojen

olmayanlar başlatmamaktadır. Bu ayırmada dendritik hücrelerin rolü olduğu düşünülmektedir. Dendritik hücreler B hücreleri tarafından IgA yapımını arttırmakta, IgA ise bağırsak hücrelerine translokasyonu azaltmaktadır (11).

İntestinal mikroflora, birbirine zıt iki görev olan, diyetle alınan antijenler ve commensal (yararlı) mikroorganizmalara karşı tolerans ve patojenik mikroorganizma ve toksinlerine karşı da immun yanıt gelişmesine katkıda bulunur. Gelişmiş toplumlarda alerjik hastalıkların insidansındaki artış, bebeklerin GİS florasının yeterince gelişmemesine bağlanmaktadır. Çevresel şartların iyileştirilmesi ve doğal fermente olmuş yiyecek maddelerinin tüketiminin azalmasının etkisi ile mikroorganizmalarla daha az karşılaşılması bu sonucu doğurmaktadır (19,20,21).

Dışarıdan gelen mikroorganizmaların eliminasyonunu sağlayan ‘kolonizasyon direnci’ mekanizmasının temel ögesi, flora elemanlarıdır. Mikroflora, intestinal mukozanın bariyer işlevini güçlendirir, patojenik mikroorganizmaların tutunmasının ve allerjenlerin girişinin engellenmesine yardımcı olur (15). Ayrıca mikroorganizmalar arası olumsuz ilişkilerden (rekabet, parazitlik) kaynaklanan direkt etki de kolonizasyon direncine katkıda bulunmaktadır (11).

Mikrofloranın bazı üyeleri, vücut için gerekli biotin, pantotenik asit, vitamin B12 gibi belirli vitaminlerin sağlanmasına katkıda bulunur.

Mikroflora, değişik besinlerin absorpsiyonu ve sindirimini kolaylaştırarak beslenme fizyolojisinde önemli bir rol oynar. Kolonda kompleks polisakkaritlerin parçalanması (ksilan, glukan, pektin, musin, glikoprotein), *Bacteriodes* türü flora elemanları ile gerçekleşir (22). Endojen ve ekzojen karbon ve enerji kaynaklarının fermentasyonundan sorumludur. Oligosakkaritlerin fermentasyonu ile ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri konakçı için yararlıdır. Bunlar arasında yer alan bütirik asit epitel hücreleri için yakıt özelliğinde olduğundan mukozanın sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalar, lipidlerin sindiriminde ya direkt olarak lipid içeren besinler üzerinde lipolitik aktiviteleriyle veya endojen

lipidler indirekt olarak safra tuzlarını ve kolesterol metabolizmasını modifiye ederek iş görürler (22).

PROBİYOTİKLER

Probiyotikler, intestinal mikrobiyal dengeyi düzenleyerek konağa yararlı etkisi olan canlı mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler. Probiyotikler günümüzde; tıp, veterinerlik, gıda mühendisliği gibi geniş bilim alanlarının dikkatini çekmekte; bu konudaki gelişmeler heyecan uyandırmaktadır.

Probiyotikler, Birleşmiş Milletler Yiyecek ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ve Dünya Sağlık Örgütü uzman heyetince; ‘yeterli ve uygun miktarda alındığında kişinin sağlığına olumlu katkıları olan canlı mikroorganizmalar’ olarak tanımlamışlardır (4). Bundan sonra çok sayıda hayvan çalışması ve sınırlı sayıda insan çalışması ile probiyotiklerin cansız bileşenlerinin etkileri gösterilmiş ve tanımlama; ‘canlı mikroorganizmalar ve onların komponentleri’ olarak genişletilmiştir (4). Bu iki kuruluş, sağlığa yarar sağlayan probiyotik türlerini, etki alanlarını ve insan tüketimi için güvenli ve gerekli miktarlarını tanımlayıcı çalışmalarda bulunmuşlardır (4).

Probiyotikler, insanların normal barsak mikroflorasının elemanlarından olup hastalık, yaşlılık, ilaç kullanma gibi normal florayı etkileyen durumlarda normal düzeyin altına inebilmekte ya da normal durumlarda da etkin olabilecek seviyenin altında bulunabilmektedirler. Bu nedenle yüzyıllar önce uzun yaşamın iksiri olarak kullanılan probiyotiklerin, günümüz tıbbında kanıtlanmış yararları doğrultusunda alınmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Günümüzde patojenik bakterilerde artan antibiyotik direnci ve tüketicilerin ilaçlar yerine doğal ürünleri talep etmeleri, probiyotiklerle daha fazla ilgilenilmesini sağlamıştır (4). Benzer şekilde, et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlerde antibiyotik ve hormon kalıntıları sonucunda bunları tüketen insanlarda toksisite, kanser gibi sorunlar görülmeye başladığı için, bu olumsuz etkileri ortadan kaldıracak alternatif kaynak olarak “probiyotikler” gündeme gelmiştir.

TARİHÇE

Probiyotik ismi, iki Yunanca kelimedden türetilmiştir; pros ve bios, yani yaşam için, yaşamı kolaylaştıran anlamlarına gelmektedir (23). Probiyotiklerin tarihi, insanlık tarihi ile başlar. Yunan ve Romalılar'ın, peynir ve süt tüketimini özellikle çocuklara ve iyileşme döneminde olan hastalara önerdikleri bilinmektedir (23). MÖ. 76 yılında Roma tarihçisi Plinius ishal tedavisinde fermente süt ürünlerinin kullanılmasını salık vermiştir.

Probiyotikler 1970'lerde hayvan yemlerinde büyümeyi destekleyici katkıları olarak kullanılmaya başlanmış olup, Fuller tarafından 'barsak mikrobiyal dengesinin düzenlenmesi yoluyla kullanılan hayvana yararlı etkileri bulunan canlı mikrobiyal yiyecek (yem) katkıları' olarak tanımlanmıştır (24). Bununla birlikte geçen yüzyılın başlarında modern immunolojinin babası ve mikrobiyolog olan Rus bilim adamı Elie Methcnihoff, fermente süt ürünleri tüketimine bağlı, etnik gruplar arasında uzun yaşam farklılığına dikkat çekmiş ve bu konudaki çalışmaları ile Nobel Ödülü'nü kazanmıştır (24). Methcnihoff, bu ürünler içinde bulunan mikroorganizmaların, karbonhidratların fermentasyonu yoluyla enerji sağlayan bakteriler olan non-patojenik mikroorganizmalar ile, konağa zararlı olan toksik son ürünleri proteinlerin yıkımıyla oluşturan patojenik mikroorganizmalar arasındaki dengeyi sağladıklarını kanıtlamaya çalışmıştır (24). Bu görüşe yönelten gözlem, fermente süt ürünlerini fazlaca tüketen Bulgar köylülerinin uzun ve sağlıklı yaşamları olmuştur.

Son yıllarda, probiyotikler, insan ve hayvan sağlığı üzerine etkilerinin ayrıntılı şekilde çalışılması yanı sıra, gıda ve ziraat sektöründe de geniş bir araştırma ve kullanım alanı bularak hayatımıza hızla girmiştir.

PROBİYOTİK OLARAK KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR VE
MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Tablo 1 : Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

<i>Lactobacillus</i> Spp.	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johsonli</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> Spp.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> Spp.	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Pediococcus</i> Spp.	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> Spp.	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes</i> Spp.	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> Spp.	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> Spp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Candida torulopsis</i>

***Bifidobacterium* genusu**

Actinomycetaceae familyası içinde bulunmaktadırlar. *Bifidobacter*'ler, insan ve bazı hayvanların kalın barsak, ağız ve vajina normal florasında bulunmaktadırlar. Yeni doğanlar, özellikle anne sütüyle doğumdan birkaç gün sonra bifidobakterler ile kolonize olurlar. *Bifidobacter*'ler anne sütüyle beslenen infantların feçeslerinden izole edilebilirler. Kolonda bu bakteri popülasyonu yaş ilerleyinceye kadar relatif olarak sabit kalırken diyet, antibiyotik kullanımı ve stres gibi faktörlerle zaman zaman değişim görülebilir. Gram pozitif, anaerob, hareketsiz, sporsuz, morfolojik olarak farklı şekillerde görülebilirler. Adlarını, genellikle Y şeklinde ya da bifid formda olmalarından alırlar (17).

Bifidobacter'lerin insan kaynaklı olanlarının çoğu optimum 36-38 °C de gelişme gösterir. *Bifidobacter*'ler pH 5-7 ortamda gelişebilen asidofillerdendir. Ancak faaliyetleri ve gelişmeleri pH 5 altı ve 8'in üstünde tamamen durur (17,22).

***Lactobacillaceae* familyası**

Lactobacillus familyası üyeleri doğada oldukça yaygındır. Hayvan ve insan barsağında, normal süt florasında bulunmaktadırlar. Basil şeklinde olan bu bakteriler, düzgün çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan basil şeklinde bulunabilirler. Çok az tür veya suşun dışında hareketsizdirler.

Gram pozitif reaksiyon veren bakteri, kültürlerin eskimesi ile gram negatif ve uzun zincir görünümüne değişebilmektedir. Spor oluşturmayan, anaerob veya mikroaerofil bakterilerdir. Üreme sıcaklıkları 5-55°C arasında değişebilir. Optimum üreme pH 5.5-5.8 aralığında görülmüştür.

Patojen özellik göstermezler. Aksine oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler ile patojen ve saprofit bakterilerin gelişmesini engelledikleri düşünülmektedir. *Lactobacillus* genusunun taksonomisi tam olarak bilinmekte ve bu genus içinde 50 tür, üç gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar, bakterinin laktozu fermente etme tiplerine göre oluşturulmuştur (17,22).

***Saccharomyces* türleri**

Saccharomyces türleri, mantar ailesine ait olup, başlıca probiyotik mantar, *S. boulardii*'dir. *S. boulardii* aynı zamanda *S. cerevisiae* Hansen CBS 5296 olarak bilinir. *S. boulardii*, normalde non-patojenik bir mantardır. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen diyare tedavisinde kullanılmaktadır.

Gram pozitif boyanma özelliği gösteren maya formunda görülmektedirler. 4-8 mm boyutlarında, oval veya sferik şekilde morfolojiye sahiptirler. Askospor oluşturmaktadırlar. Standart mantar besiyerinde 37⁰C'de üremektedirler. Karbonhidratları asimile ve fermente etme yeteneğine sahiptirler.

***Streptococcaceae* familyası**

Sferik ya da oval şekilde; tekli, ikili veya değişik uzunlukta zincir veya tetrad formunda bulunabilmektedirler. Gram pozitif, fakültatif anaerob, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif mikroorganizmalardır. Hareketsiz, sporsuz, homofermentatif özelliktedirler. Süt ve süt ürünlerinde bulunur; yoğurt yapımında kullanılmaktadırlar. Belli başlı üç genusu vardır: *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* genusu (22).

ETKİLİ PROBİYOTİK TÜRLERİN TEMEL ÖZELLİKLERİ (23,25,26,27)

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların bazı temel kriterlere uygun olması istenir (25,26). Pankreatik enzim, asid ve safraya direnç göstermesi, intestinal ekosistemde canlılığını devam ettirebilmesi, intestinal mukozaya adezyon, insan kaynaklı olması, güvenlik, kullanım ve saklama sırasında özelliklerini koruyabilme, teknolojik olarak iyi özelliklere sahip olma bunların başlıcalarıdır (10,23,25,28).

- Patojen ve toksijenik olmama
- İnsan kaynaklı olma
- Taksonomik sınıflandırmasının kesin olması
- Konakçının sağlığına olumlu katkı yapma
- Mide asidi, safra ve pankreatik enzimlere dirençli olma
- Bağırsak hücre epiteline tutunabilme
- GIS de geçici olarak kolonize olabilme

- Antimikrobiyal madde üretimi
- Patojen bakterilere karşı antagonizma
- Kanser oluşumunu teşvik eden bakterilere karşı antagonizma
- Canlılarda büyümeyi teşvik etme ve geliştirme
- Teknolojik süreçlere direnç gösterme
- İmmun sistemi stimüle etme, immün cevabı düzenleme
- Önemli metabolik aktivitelere sahip olma (vitamin sentezleme, disakkridaz ve laktaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu gibi)
- Sağlık üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülen ürünlerin üretilmesinde değişim meydana gelmemesi
- Toksik metabolitler üretmemeleri, genetik açıdan stabil olmaları,
- Probiyotik olarak seçilen bakterilerin, işlem esnasında ve depolama süresince canlılığını koruması ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmesi taşıması gereken en önemli özelliklerdendir
- Bunun yanı sıra toksik metabolitler üretmemeli, genetik açıdan stabil olmalıdır.

Çok sayıda farklı türden mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır (25). En yaygın olarak kullanılanlar *Lactobacil* ve *Bifidobacter* türleridir (1). Bu türler, yukarıda sayılan özelliklerin bir çoğunu taşımaktadır. Ancak belirli türlerin özel bazı yönleri ile diğerlerinden ayrıldığı da yapılan çalışmalarla netleşmektedir. Örneğin, *L. casei* suşu geniş spektrumlu bir inhibitör madde ürettiği ve tripsin, proteinaz K, karboksipeptidaz A gibi proteazlara dayanıklı olduğu bildirilmiştir (22).

PROBİYOTİKLERİN ETKİ MEKANİZMALARI

Bugüne kadar yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, probiyotiklerin farklı türlerinin, değişik alanlarda ve birbirinden farklı mekanizmalarla etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bir probiyotikğin gösterdiği laboratuvar ya da klinik etkiyi başka bir probiyotik türünün ya da aynı türün farklı bir suşunun göstermesi beklenmemektedir (18).

1. MİKROBİYAL ANTAGONİZMA

1.1. Antimikrobiyal maddelerin üretimi (29)

Probiyotik mikroorganizmaların ürettiği çeşitli maddeler, hem Gram negatif hem Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör özellikte olabilmektedir. Organik asitler, H₂O₂ ve bakteriosinler, kimi zaman canlı mikroorganizma sayısını azaltmasa da bakteriyel metabolizma ve toksin üretimini etkileyebilmektedir (6,18).

Sağlıklı bayanlarda vajinanın normal florasını oluşturan *Lactobacillus* türlerinden bir kısmının H₂O₂ ürettiği ve bu maddenin bakteriyel vajinozise karşı korunmada etkili olduğu bilinmektedir (21).

Laktik asit ve asetik asit gibi metabolitler, probiyotik mikroorganizmaların birçoğu tarafından üretilerek, ortam pH'sının düşürülmesini sağlamaktadırlar (30). Laktik asit, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ve diğer Gram negatif gastrointestinal sistem patojenlerinin dış membran geçirgenliğini arttırarak diğer antimikrobiyal maddeler ile birlikte bu patojenleri inhibe edilmesini kolaylaştırmaktadır (21,31,32,33).

Biosurfaktanlar, yabancı cisim yüzeyine tutunarak kolonizasyon ve infeksiyon gelişmesine neden olan mikroorganizmaları engelleyebilmektedirler. *Lactobacil*'ler türlerinden bazıları tarafından üretildikleri bilinmektedir (21)

Bakteriyosin, protein yapısında maddeler olup, duyarlı bakterilerin yüzeyindeki reseptöre bağlanarak ölümüne yol açtığı ve üreyen mikroorganizmaya yakın suşlara ve yakın türlere karşı, bakterisit etkisi olduğu bilinmektedir. Bakteriyosinler, molekül ağırlığı, biyokimyasal özelliği, aktivite spektrumu ile etki mekanizmasında değişiklikler olabilen heterojen bileşiklerdir (22).

1.2. Besin maddeleri için yarışma

Gastrointestinal sistemde patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı en temel savunma mekanizmalardan biri, patojenlerin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli temel besin maddelerinden mahrum bırakmak olacaktır. Normal barsak mikroflorasının da benzer bir işlevi olsa da bazı durumlarda yetersiz kalabilmekte ve desteklenmesi için probiyotiklere gerek olabilmektedir.

1.3. Kompetitif içeri almama yoluyla antagonizma

Özellikle GİS, GÜS infeksiyonları ve *H. pylori* infeksiyonu önlenmesinde etkili olan mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır (27). Adezinlerin bu mekanizmada rol oynadıkları düşünülmektedir (28). Bakteriyel infeksiyonlarda adezyonun engellenmesi ve/ veya mukozal tabakayı geçerek penetrasyonun engellenmesi gerekmektedir.

2. İMMUN YANITIN DÜZENLENMESİ

2.1. Doğal immunitenin güçlendirilmesi (upregulate)

İntestinal bakteriler, epitelyal hücre yüzeylerinde eksprese olan reseptörlerce tanınır ve bağlanabilmekte ve böylelikle, pro ya da anti-inflamatuar sitokinlerin üretimi gibi immunolojik defans mekanizmaları kaskadını tetikleyebilmektedir (28,29).

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, infantlar ve çocukluk çağında mikrobiyal stimülasyonun azalması, alerjik hastalıkların artması ile sonuçlanmaktadır. Azalan mikrobiyal stimülasyon, postnatal immun sistem gelişiminin eksik kalmasıyla ve Th1 ve Th2 arasındaki dengenin kurulamaması ya da gecikmesi ile ilişkilidir (34,35). *Lactobacil* türlerinden bazılarının IFN- γ ve IL-12 üretimini stimüle ederek Th1 tip yanıtı destekleyip, Th2 yanıtı inhibe ederek Th1/ Th2 dengesini sağladıkları bilinmektedir (36).

Mukozal epitel hücre münlerine patojenlerin bağlanması, konağın önemli bir savunma mekanizmasıdır. Bu bağlanma ile patojenlerin intestinal hücrelere aderansı inhibe olacağından, *L. plantarum* gibi bazı probiyotik türlerin intestinal mün ekspresyonunu arttırması sonucu barsak infeksiyonları önlenmektedir (34).

Probiyotiklerin farklı türleri, proinflamatuar ya da antiinflamatuar sitokinler arasında dengeyi sağlamaktadırlar. *L. acidophilus*, *L. delburickii*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. breve* ve *S. thermophilus*' tan oluşan probiyotik türlerin karışımı, kan ve lamina propriada bulunan dentritik hücrelerden kaynaklanan IL-10 üretiminin upregülasyonu ve IL-12 üretiminin down-regülasyonundan sorumlu tutulmuşlardır (28).

2.1.1. IgA ve sekretuar komponent yapımında artma

Laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalar, Peyer plaklarından anlamlı miktarda Ig A üretiminde artış sağladıklarını göstermiştir. Bu etkinin de diğer moleküler mekanizmalarda olduğu gibi türe özgü olduğu belirtilmektedir (15,37). *L. acidophilus*, enterik patojen olan *S. typhi*'ye, Ig A yanıtında büyük bir artış yaparak karşı koyabilmektedir (38). Çocukluk çağındaki ishallerin büyük kısmından sorumlu olan rotavirüslere karşı, IgA sekrete eden hücre sayısında artış sağlayarak etki göstermektedirler (3).

2.1.2. Peyer plaklarında T hücre aktivitesinin artması

Özellikle bazı *Lactobacil* ve *Bifidobacter* türleri, kostimülatör maddelerin üretimi ile CD4-CD8 T hücre aktivasyonunda rol alırlar. *Lactobacil* türlerinden bazıları, ilaca bağlı kolitte etkilerini; CD4-CD8 T hücre sayılarında artışa ilaveten IgA sekresyonunda artış yaparak göstermektedir (39).

2.1.3. Mukozal bariyerin sağlamlaştırılması (28)

Probiyotikler ve diğer GİS kommensal bakteriler, koruyucu bir bariyer olan mukus üretiminin stimülasyonu için intestinal epitelde mucin kodlayan genlerin up-regülasyonunu sağlamaktadırlar (40,41). Buna ilaveten mukozal sıkı bileşke (tight junction) proteinlerinin hasarını inhibe edebildikleri gösterilmiştir (37). Diğer bir grup araştırmacı da intestinal epitelin hasara karşı korunmasında intestinal kommensallerin Toll benzeri reseptörleri (TLR) uyarması ile etkili olabildiğini savunmuşlardır (18). TLR, lipopolisakkarit, flagellin gibi moleküller ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) gibi aktive transkripsiyon faktörleri olan intraselüler sinyal yolağı ile sitokinlerin üretimiyle oluşan lipoteikoik asit tarafından aktive olmaktadır (18). Bazı mikroorganizmalar için, intestinal inflamasyonun düzenlenmesinde, proinflamatuvar NF- κ B yolağının inhibe edilmesi en önemli mekanizma olabilir (18).

2.1.4. Komplemanın alternatif yoldan aktivasyonu (28)

2.1.5. Komplemana bağlı fagositozun artması

Makrofajların aktivasyonu da bütün probiyotik türleri tarafından meydana gelmemekle birlikte, *B. longum* ve *L. acidophilus*'un hücre içermeyen bileşenlerinin, *Salmonella* türü ve inert partiküllerinin fagositozunu arttırdığı gösterilmiştir (42). *L.*

casei ve *Corynebacterium parvum*'un da fagositoz aktivasyonunda artış yaptığı gösterilmiştir (34).

2.2. İnflamasyon ve alerjik yanıtın baskılanması (downregulate)

Probiyotik aktivitelerinden biri, atopik dermatit gibi alerjik hastalıkların semptomlarının Th2 aracılı immun yanıt ile baskılanmasıdır (28,34). Bu hastalıklarla birlikte inflamatuvar barsak hastalıklarında da genetik faktörler yanında intestinal florada değişim bir çok çalışmada gösterilmiştir (28,34).

Atopide T helper 2 (Th2) yolu aktivedir, IL-4 salınır ve IgE artışı ile eozinofili vardır. Normal bireylerde ise Th1 yolu çalışmaktadır, interferongama salınır, Th2 hücrelerin gelişimi baskılanır. Son çalışmalarla atopik egzema, sistemik enflamatuvar yanıt ve atopik hastalıkların önlenmesinin probiyotik mikroorganizmalar ile olası olduğu bildirilmiştir (28).

2.3. Kanser gelişiminin engellenmesi (30,43,44,45)

Kolon kanserini önleyici etkileri; mutasyon ve DNA hasarının azalması, kanser yapan maddelerin (mutajen) etkisizleştirilmesi, kanserli hücre intiharının (apoptoz) hızlanması ve daha birçok mekanizma ile açıklanmaktadır. Laktobacil ve Bifidobacterlerin bir kısmı, prekanserojenlerin kanserojenlere dönüşümünü, b-glukronidaz, azoredüktaz, nitroredüktaz gibi enzimlerin miktarında değişiklik yaparak engellemektedir (46). Ayrıca prekanseröz lezyon olan aberan kripler üzerinde etki ile kanser riskini azalttığı vurgulanmıştır.

3. METABOLİK ETKİ

3.1. Enzimatik aktivite

İntestinal enzimlerden bazılarının yapımını artırma (spermidin, spermin, putresin gibi) ve intestinal epitelde disakkaridaz aktivitesini artırma (laktaz, sükröz, maltaz gibi) sayesinde, GİS de sindirilmeden kalan poli- ve disakkaritlerin son ürünlere kadar sindirimi sağlanmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni laktaz aktivitesinde artış sağlayarak, laktoz intoleransını önleyici etkileridir (47). İrritabl barsak sendromunda eksikliği tanımlanmış sindirim enzimlerinin işlevlerini de bu mekanizma ile sağlayarak, semptomların ortadan kalkmasını sağlamaktadırlar.

3.2. Emilim kapasitesini arttırarak vitamin vs ihtiyacının sağlanması

Normal floranın yerleşmesinin, intestinal morfolojinin gelişmesine, özellikle mikrovillus yapısının işlev kazanmasına destek olduğu kanıtlanmıştır.

3.3. Safra tuzlarının dekonjugasyon ve sekresyonu

Bazı *Laktobasillerin* safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesi engellenir. Böylece safra tuzu absorbe edemeyen karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünü kullanması sonucunda serumda kolesterol miktarını azaltır.

4. ANTİTOKSİK AKTİVİTE

4.1. 120 kDa protein (proteolitik değil)

Kolera toksinine bağlı su ve elektrolit sekresyonunu, Siklik AMP, Adenilat siklaz aktivitesini azaltır. *S. boulardii* bu etkiyi gram negatif mikroorganizmaların bazılarına karşı göstererek diyare gelişmesini ya da diyare kliniğinin daha hafif geçmesini sağlamaktadır (48).

4.2. 54 kDa (proteolitik)

C. difficile toksin A'yı ve enterositler üzerindeki toksin A'ya özel reseptör alanlarını parçalar. Antitoksik aktivite ile ilgili yapılan çalışmaların, enteropatojenlerin inhibisyonunu açıklayabileceği düşünülmektedir. *S. boulardii* aracılığı ile üretilen 54 kDa protease ve 120 kDa protein olarak tanımlanan antimikrobiyal maddelerin üretiminin *C. difficile* ve *V. cholerae* ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu, *in vitro* deneylerle gösterilmiştir (48).

Son yapılan hayvan modeli çalışmalarında, *C. difficile*'ye karşı *S. boulardii*'nin etki mekanizmasının, *S. boulardii* serin proteazının insan barsak mukozasında toksin A ve B'nin patojenik etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (49).

Probiyotikler, non-kovalent bağlanma ve sekestrasyon yoluyla aflatoksin B ve *E. coli*'nin endotoksini gibi diğer bazı bakteriyel toksinlerin azaltılmasında etkilidir (31). Bu yolla, yanıklar, hemorajik şok, şiddetli pankreatit, transplantasyon gibi büyük operasyonlar gibi ciddi durumlarda etkili olabilmektedirler (34).

5. İNTESTİNAL MİKROFLORANIN DÜZENLENMESİ (3,25,50)

5.1. İntestinal mikrofloranın kurulması ve korunması

5.2. Patojen mikroorganizmaların kolonizasyon, adezyon ve translokasyonun engellenmesi

GİS florasının, yeni doğanlarda gelişmesi, ilk inokulum ve başlangıç beslenme alışkanlıklarına bağlı olmakla birlikte temeli anneden kaynaklanmaktadır (3). Diet, çevresel şartlar, doğum sırasında stres faktörleri ve annenin fekal flora kompozisyonundan etkilenen infanta ilk inokulum, doğum sırasında olmaktadır. Bunun ardından, anne sütüyle beslenme başladığında ilk olarak bifidobakterler GİS'e yerleşirler. Sütten kesme ardından katı yiyeceklerin alınmaya başlanmasıyla bir yaş civarında GİS florası daha kompleks bir hal alıp erişkin florasına benzemeye başlar.

Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsaklarda istenmeyen mikrofloranın çoğalma hızını kontrol ederler ve mikrofloranın dengede olmasını sağlarlar.

Barsak lümenindeki patojen mikroorganizmalara karşı organizmanın verdiği savaşta, en önemli defans faktörlerinin başında, barsağın doğal florası ve mukoza bütünlüğünün korunmuş olması gelmektedir. Probiyotikler, doğal flora elemanlarını destekleyici rollerinin yanında potansiyel zararlı mikroorganizmaların barınmasına da engel olmaktadır. Genellikle *Laktobacil* ve/veya *Bifidobacter*'lerin sayısını arttırarak ortamı daha sağlıklı hale getirmektedirler (25). Zararlı mikroorganizmaların dışlanmasında, adezyon bölgeleri ve besin maddeleri için yarışma ve antimikrobiyal maddelerin üretimi birlikte ya da tek başlarına etkili olabilmektedirler (25).

Probiyotik türlerin, hatta suşların her birinin farklı etkileri olduğu bilinmektedir. Örneğin *L. casei rhamnosus*'un, EPEC, ETEC ve *Klebsiella pneumoniae*'nin intestinal hücrelere tutunmasını inhibe ettiği *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (33). *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei* ve *L. plantarum* 'un dahil olduğu *Laktobacil* türleri ise, enterohemorajik *E. coli*'ye karşı inhibitör etkileri gösterilmiştir (51).

Kefirden izole edilen *L. acidophilus* ve *L. kefiranofaciens* ile yapılan bir çalışma, insan enterosit benzeri Caco-2 hücrelerine bu probiyotiklerin adere olarak enteropatojenik mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ve *S. typhimurium* tutunmasını engelleyebildiğini iddia etmektedir (52).

PROBİYOTİKLERİN SAĞLIĞA YARARLARI (53)

Kanıtlanmış yararlar

- Akut rotavirus diarezi ve gastroenteritinin önlenmesi ve tedavisi
- Antibiyotikle ilişkili yan etkilerin ve diyarenin engellenmesi

Güçlü kanıt olmasına rağmen ek kanıtların gerekli olduğu yararlar

- Yiyecek alerjisi ve atopik egzema
- *C. difficile* infeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesi
- Günlük bakım evlerindeki çocuklar arasında akut solunum sistemi infeksiyonlarının önlenmesi
- Vajinitin tedavisi ve önlenmesi (candida ve bakteriyel vajinozis)
- Turist diyaresinin önlenmesi

Umut verici alanlarda devam eden araştırmalar

- Crohn hastalığı ve ülseratif kolit
- Astım ve benzeri alerjik durumların önlenmesi
- Kistik fibrozis
- Çocuklarda dental taşıyıcılığın önlenmesi
- Tekrarlayan konstipasyon
- İrritabl barsak sendromunun tedavisi
- Yoğun bakım ünitesinde potansiyel patojenlerin kolonizasyonunun engellenmesi
- Oral aşılardan etkisini arttırıcı immunoadjuvant olarak
- *H. pylori* infeksiyonu

Gelecekte araştırılacak alanlar

- Kolon kanserinin önlenmesi

- Mesane kanserinin önlenmesi
- Romatoid artrit
- Cinsel yolla geçen hastalıklar
- Otizm

PROBİYOTİKLERİN YAN ETKİ VE KOMPLİKASYONLARI

Probiyotiklerle tedavi, oldukça yararlı ve zararsız görünmektedir. Yine de, probiyotik ürünlerin üretilmesi ve kullanılmasında dikkate alınması gereken faktörlerin bulunduğu bilinmektedir. Üretim aşamasında; kültürlerin endüstriyel ölçekte geliştirilmesinde standartların oturtulmaması ve yeterli kontrollerin yapılamaması bunlardan biridir (15). Tüketim aşamasında ise, ürünün sağlıklı kullanım miktarının ve süresinin tam netleşmemesi, kullanım endikasyonları ve kontrendikasyonlarının kesin olarak sınıflandırılmaması, henüz sorun olmaya devam etmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların kullanımları sırasında ortaya çıkabilecek yan etki ve komplikasyonlara, kuramsal olarak değinilmiştir:

- Sistemik infeksiyonlar (Translokasyon riski);

Bakteriyel translokasyon; intestinal mukozadan geçerek mezenterik lenf nodları ya da portal ven yoluyla invazyon olup; septisemi ve diğer organların infeksiyonlarına ilerleyebilen baktereminin gelişmesinde önemli rol oynar (54). Probiyotiklerin kullanımını sınırlandırabilecek en önemli yan etki olarak belirtilmektedir. Bununla birlikte konağın komensal (doğal) mikroflorası ile oral olarak uygulanan laktik asit bakterileri arasında bu risk açısından farklı bir mekanizma tanımlanmamıştır (54). *Laktobasil* ve *Bifidobacter*'ler ile oluşan klinik infeksiyon vakalarının çoğunda kaynağın oral yolla alınan probiyotik mikroorganizmalar değil, barsak ya da oral kavitenin komensal mikroflorası olduğu düşünülmektedir (54). İntestinal bariyerin azalmasına neden olan bazı durumlarda translokasyon artmaktadır: barsak mukozasında hasarlanma, barsak infeksiyon ve inflamatuvar hastalıkları, abdominal cerrahi, intestinal bakteriyel aşırı çoğalma, yoğun antibiyotik tedavisi, kemoterapi-radyasyon ya da HIV'le infekte olma sonrasında immun yetmezlik gelişmesi gibi.

1962 yılından bu yana yaklaşık 100 ülkede binlerce hastada kullanılmış, yedi hastada *S. boulardii* fungemisi geliştiği rapor edilmiştir.

Özellikle santral kateteri olan, immun düşük hastalarda ekzojen kontaminasyon riski en kesin tehlike olarak belirtilmiş ve bundan dolayı saşelerin hasta odası dışında hazırlanması önerilmiştir.

• Teorik olarak probiyotiklerden diğer mikroorganizmalara direnç geni aktarımı: Probiyotik bakteriler için sorun olabileceği teorik olarak düşünülse de, bu konuda kanıt yoktur. Ancak maya mantarlarının direnci doğal direnç olduğu için böyle bir riskin olmayacağı kesinlikle söylenebilir.

- Duyarlı kişilerde bağışıklığın aşırı uyarılması
- Zararlı metabolik aktiviteler

Belirtilen son üç kuramsal yan etki ya da komplikasyona ait somut bir kanıt bulunmamakta ve kullanım kısıtlaması gerektirmeyeceği savunulmaktadır.

AKUT İNFLAMATUAR GASTROENTERİTLER

İSHAL PATOGENEZİNE ETKİLİ FAKTÖRLER

Gastrointestinal sistem, ağızdan başlayıp anüse kadar devam etmekte ve bu alanlarda patojenlere karşı birçok farklı savunma mekanizması bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde, gaita mitar ve formunu, başlıca günlük sıvı ve gıda alımı olmak üzere fiziksel aktivite, iklim koşulları belirler. Yetişkin bir insanın gastrointestinal sistemi hergün yaklaşık 7 litre endojen salgı, 2 litre dışarıdan alınan sıvı ile denge kurmaktadır.

İshalin patogenezinde değişik mekanizmalar rol alır. İnfeksiyöz ishallerde etken mikroorganizmalar, değişik virulans faktörleriyle konak savunma mekanizmalarını aşmaya çalışır. İnfeksiyöz ishallere karşı savunmada en önemli konak faktörleri şunlardır:

Mide asidi: Midenin asit pH'da olması, pek çok patojene karşı ilk savunma basamağını oluşturur. *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* ve bazı helmintlere karşı ilk engel, midenin asit pH'dır (55). Mide ameliyatı geçirenler, aklorhidrisi olanlar (H2

reseptör blokeri ve diğer anti-asit maddelerin kullanımı) infeksiyöz ishallere daha eğilimlidir. rotavirus, *Giardia lamblia* ve *Entamoeba histolytica* kistleri gibi bazı etkenler mide asidine dayanıklıdır. Ancak bu engel, antiasitler ya da gıda ve sıvı alımı ile nötralize edilirse, enterik bakteriyel ve paraziter infeksiyonlar oluşabilir. Mide asidi yanında sindirim enzimleri de mikroorganizma kolonizasyonuna engel olabilirler.

Safra tuzları: Duodenumda safra tuzları mikroorganizmaların yüzeyini bozarak çoğunu inhibe eder. *E. coli* gibi *Enterobacteriaceae* üyeleri safra tuzlarına dayanıklıdır.

Normal flora: Gastrointestinal sistemin farklı anatomik bölgelerinin floraları birbirinden farklıdır. En yoğun mikroorganizma, ince barsak distali ve kalın barsakta bulunmaktadır. Normalde kalın bağırsakta, 10^{10} /ml yoğunlukta ve %99'u anaerop ağırlıklı bakteri florası vardır (11,16). Normal flora, patojen mikroorganizmaların GİS'e yerleşmesine, inhibisyon ya da kompetisyon yolu ile engel olan önemli bir faktördür (56).

Bağırsak hareketleri: Normal peristaltik hareketler ile sıvı absorpsiyonu düzenli şekilde sağlanır, mikrofloranın düzenli dağılımı gerçekleşir ve patojen mikroorganizmaların yerleşip kolonize olması engellenir. Opiatlar, atropin, difenoksilat gibi hareket azaltıcı ilaçlar, bazı yapı anormallikleri, şeker hastalığı, skleroderma gibi değişik hastalıklarda oluşan hareket azlığı üst ince bağırsakta aşırı bakteri üremesine ve emilim bozukluğuna neden olur. Motilitenin azaldığı durumlarda bakterilerin enfeksiyon yapma olasılığı artmaktadır, bazı bakteriler ise toksik maddeler salgılayarak motiliteyi bozarlar. Ayrıca motilitenin durması, *Shigella* ve *Salmonella* infeksiyonlarında patojenlerin kana geçmesine zemin hazırlayabilmektedir (16,55,57,58).

Mukus salgısı: Patojen mikroorganizmaların barsak epitel hücrelerine yapışmalarına engel olmaktadır (57).

Bağışıklık: Barsağa lokalize başlıca immunolojik savunma mekanizmaları, mukozal lenfoid doku hücreleri (mucosa associated lymphoid tissue/ MALT) ve salgısal IgA' dır. Mukozal immün sistemin başlıca bileşeni olan lenfoid doku, GİS dışında, diğer tüm mukozal alanlarda da bulunmaktadır. İmmunojenlerin ilk kez algılanıp, mukozal yanıtın başlamasından sorumludur (16,59,60).

Yaş: Yenidoğan, süt çocukluğu ve yaşlılık dönemlerinde mide asidi azlığı, koruyucu floranın ve bağışıklık sisteminin yetersizliği sonucu infeksiyöz ishaller daha kolay gelişir.

Mikroorganizma İle İlişkili Faktörler

Bağırsağı hastalandıran mikroorganizmalar konak savunma mekanizmalarını aderens, invazyon, enterotoksin ve sitotoksinlerin etkileriyle aşır hastalandırıcı etki yaparlar:

1. İnokülüm miktarı: Hastalık tablosuna neden olabilecek mikroorganizma miktarı türden türe değişir. Örneğin *Salmonella* ve *V. cholerae* için bu rakam 10^5 - 10^8 iken, *Shigella*, *Giardia* ve *E. histolytica* için 10-100 mikroorganizmadır. Bu nedenle *Shigella*, *Giardia* ve *E. histolytica* kişiler arası temas yoluyla bulaşabilirken, *Salmonella* bakterileri normal konağı hastalandırabilecek etkin infeksiyöz doza ulaşmak için bir gıda içinde bir kaç saat üremeye ihtiyaç gösterir (16,61).

2. Tutunma: Mikroorganizmaların patogenezdaki ilk basamakları, özgül bir alana tutunabilmeleridir. Flora bakterileri gibi patojen bakteriler de değişik yüzey yapı maddeleriyle barsak duvarına tutunabilmektedir. *V. cholerae* ince barsak enterositleri fırçasmsı kenarına pilusları ve diğer özgül yüzey protein yapılarıyla tutunur. ETEC kökenleri, toksin yapmadan önce kolonizasyon faktörü antijeni ile ince barsak üst kısmına tutunup kolonize olur (62).

3. Toksin yapımı: Bağırsak mukozasında sekretuar mekanizmaları doğrudan etkileyip ishal yapan enterotoksinler (*V. cholerae* ve ETEC: ısıya duyarlı toksin, LT) adenilat siklazı aktive edip bağırsak mukozasında cAMP'i artırır (63).

Bu durum klor sekresyonunu artırır, sodyum absorpsiyonunu azaltır; sonuçta barsak boşluğuna aşırı miktarda salınan sıvı nedeniyle miktarca aşırı sekretuar ishal

meydana gelir. ETEC kökenlerinin ısıya dirençli (ST) toksinleri ise guanilat siklazı aktifleyip hücre içi cGMP miktarını artırıp ishale neden olur. *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *C. difficile* (toksin A) ve *C. perfringens* tip A'nın sulu ishale neden olan enterotoksinleri vardır (64).

İSHAL PATOGENEZİ

İnfeksiyöz ishaller patogenez ve patolojilerine göre iki grup altında incelenebilirler:

1. Noninflamatuar diyareler

İnce barsak epiteline tutunarak (adezyonla) veya enterotoksin salgılayarak sulu ishale yol açarlar. *V. cholerae*, ETEC, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (enterotoksin) yanında epitele kolonize olup kısmen harabiyete yol açan EPEC ve EHEC gibi etkenler bu tip diyareye neden olmaktadır (65).

2. İnflamatuar (invaziv) diyareler

Shigella, EIEC, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* gibi bazı bakteriler sahip oldukları virulans faktörleriyle barsak duvarı engelini aşır dokuya ve ardından dolaşıma geçebilme özelliği gösterirler. Barsak duvarına invazyon sonucu oluşan inflamasyonla motilite artışı olur. Bu etkenler dizanteri kliniği ile seyreden ishallere neden olmaktadır (16,65,66,67).

İnfeksiyöz ishalleri, yukarıda tanımlandığı şekilde ayırmak tam olarak mümkün değildir. Örneğin, sitotoksin aracılığı ile hastalık oluşturan *C. difficile*, gaitada lökosit bulunmasa da patofizyolojik olarak inflammatuar diyare yaptığı bilinmektedir. Bununla birlikte, EPEC ve *Cryptosporidium* gibi bazı patojenler de farklı derecelerde olsa da villus harabiyeti ve inflamasyona neden olabilmektedirler (59,64).

Akut İnflamatuar Diyarelerde Tanı ve Tedavide Genel Yaklaşım İlkeleri

Hastadan alınan ayrıntılı bir anamnez ve iyi bir klinik muayene, ishalin nedenini saptamak ve tedavi yaklaşımını belirlemek için zorunludur. Bununla birlikte, antibiyotik tedavisine karar vermede en önemli bulguların; invaziv diyareyi

destekleyici bulgular olan ateş yüksekliği ve dışkıının mikroskopik incelemesinde lökosit saptanması olduğu vurgulanmalıdır.

Enterotoksinler aracılığı ile oluşan saf sekretuar bir ishalde ateş, myalji gibi sistemik belirtiler veya tenesmus gibi barsak duvarının irritasyonuna bağlı semptomlar yoktur (68). Dışkı çok sulu ve miktarı fazladır; kan hücreleri içermez. Hâlbuki etkenin barsak duvarını invazyonla ishale yol açtığı durumlarda ateş, kas ve eklem ağrıları, istahsızlık ve irritabilite gibi sistemik semptomlar ile kramp şeklinde karın ağrıları ve tenesmus görülebilir. Dışkıda az veya çok kan hücreleri vardır; bundan ötürü kanlı-mukuslu bir dışkı söz konusudur.

Akut gastroenterit, çoğu kez kendi kendine sınırlanan bir tablodur. Tedavi ile dehidratasyon, metabolik asidoz ve elektrolit bozukluklarını önlemek başlıca amaçtır. Hafif ve orta şiddette ishali olan, komplikasyon gelişmeyen ve klinik olarak düzelme olan hastalarda antibiyotik tedavisi önerilmez. Ancak akut ishaller, üst solunum yolu infeksiyonlarından sonra en fazla gereksiz antibiyotik kullanımının olduğu hastalık grubudur (69,70).

Antimikrobiyal tedavi; *Shigella*, *Salmonella spp.* (antimikrobikler taşıyıcılık ve nüksü artırır, ancak uygun endikasyon durumunda kullanılırlar), *V. cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *C. difficile* türleri, ETEC suşları, *Giardia intestinalis*, *E. histolytica*'ya bağlı akut ishallerde fayda sağlayabilir. Bu etkenlerden biriyle hastalanmış her olgu için antimikrobiyal tedavi gerekmez; olgular seçilerek tedavi edilirler (16).

Akut gastroenterit tedavisinin temel hedefleri şunlardır:

- Sıvı elektrolit dengesinin sağlanması
- Özellikle çocuk ve yaşlılarda beslenmenin sürdürülmesi
- Antiemetik- antidiareik ilaçların kullanılmaması
- Antibiyotiklerin sınırlı kullanılması

Tedavide tercih edilebilecek antibiyotikler, antibiyotik dirençleri nedeniyle bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. İnfeksiyonun tedavi seçenekleri arasında ampicilin, tetrasiklin, kloramfenikol, trimetoprim- sulfometaksazol ve kinolonlar sayılabilir. Bununla birlikte infeksiyonun genellikle kendini sınırlaması ve

antibiyotik kullanımı sonrasında direnç gelişme riskinin bulunması gibi nedenlerle antibiyotik kullanımı konusunda çekinceler olması mümkündür.

Tüm bu tedavi yaklaşımlarının yanı sıra, akut ishallerin önlenmesi, tedavisi ve bireylerin hızla normal barsak fonksiyonlarına dönmeleri için son yıllarda yararları çok sayıda çalışma ile gösterilen probiyotikler de önemli bir yer bulmuştur. İshalli hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde probiyotik kullanımının gerekçesi, bunların barsak mikroflorasını destekledikleri ve enterik patojenlere karşı etki gösterdikleri varsayımına dayanır. Ancak belki bu etkilerden de önemli olarak, intestinal sistemde IgA seviyesini arttırmak gibi yollarla immun bariyeri güçlendirmektedirler (15). Akut ishallerden özellikle çocuklarda rotavirus ishallerinde, antibiyotiğe bağlı ishallerde ve seyahatle ilişkili ishallerde; probiyotik mikroorganizmaların kullanımının fayda sağladığı kanıtlanmıştır (2).

Günümüzde hala önemini koruyan, ister normal, ister altta yatan ağırlaştırıcı faktörü bulunan birey olsun, invazyon ile hastalığa neden olan GİS etkenlerinin tedavisidir. Dünyada ve ülkemizde, bu etkenlere karşı sıklıkla kullanılan antimikrobiyal ajanlara direnç her geçen gün artmaktadır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, Ocak 2006- Ocak 2007 tarihleri arasında yürütüldü.

BAKTERİLER VE ÜREME KOŞULLARI

Refik Saydam Hıfzıssıha Merkezi'nden (RSHM) *L. acidophilus* RSHM 593, *L. casei* RSHM 731, *S. cerevisiae* RSHM 251 standart şuşları ve *S. boulardii* Sanofi-Synthelabo firmasından kuru toz şeklinde sağlandı.

Liyofilize şekilde sağlanan *L. acidophilus* ve *L. casei*, deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere De Man Rogosa Sharpe (MRS) agarda (Oxoid) arka arkaya iki kez üretildi. Mikroaerofilik ortamda, 37⁰ C'de, 48 saat inkübasyon sağlandı. *Lactobacil* türleri, -80⁰ C'ye kaldırılarak uzun süre depolamak için, %15 gliserol ilave edilmiş MRS broth'a ekildi.

Saccharomyces türleri (*S. boulardii*, *S. cerevisiae*), Sabouroud dextroz agar (SDA)'da (Oxoid), aerop ortamda üretildi. Ekim yapılan plaklar aerobik ortamda, 37⁰ C'de 48 saat inkübe edildi. *S. boulardii* ve *S. cerevisia*, %15 gliserollü SD broth'a ekilerek, -80⁰ C'de uzun süre saklanabildi.

Enterobacteriaceae ailesinden, *S. typhi* RSHM 6, *S. enteritidis* RSHM 91, *S. sonnei* RSHM 04049 ve *E. coli* RSHM 232 standart şuşları kullanıldı. Çalışma için *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhi* ve *S. sonnei* türleri, kanlı agar besiyeri (Oxoid) kullanılarak aerobik koşullarda, 37⁰ C'de 24 saat inkübe edildi.

Probiyotik mikroorganizma supernatantlarının (SCS) hazırlanması

Probiyotik türlerine uygun şekilde, MRS broth ya da SD broth'ta spektrofotometrede (Lab-system) 640 nm dalga boyunda optik dansite 0.1'e ayarlandı ve 1x10⁸ CFU/ml yoğunlukta hazırlanan probiyotik süspansiyonu 48 saat uygun şartlarda inkübe edildi (32,71). İnkübasyon sonrası +4⁰ C'de, 10000g devirde 10 dakika soğutmalı santirfüje koyuldu. Bu işlemin ardından üstteki sıvı kısım 0.22 µm- delik çaplı filtreden (Millex GS; Millipore, Molsheim,France/ Millipore,

Bedford, MA) geçirilerek steril olması sağlandı. Filtre edilmiş SCS'nin sterilliği, MRS agar ya da SDA'ya ekilerek doğrulandı.

BESİYERLERİ

Kanlı Agar

Enterobacteriaceae türlerini üretmek için kanlı agar kullanıldı. Bu amaçla, 40 gr kanlı agar tozu (Oxoid, England) ile 1 litre distile su karıştırılarak otoklavda 121⁰ C de 20 dakika steril edildi. Besiyerinin 45⁰ C' ye soğuması beklendi ve %7 olacak şekilde tam insan kanı ilave edildi. Dispencer yardımı ile steril plaklara döküldü.

De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar

Lactobacil suşları De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (LAB M, UK) kullanılarak üretildi. MRS agar hazırlanması: 55 gr MRS broth tozu 14 gr bakteriyolojik agar tozu (Oxoid, England) ve 1 lt distile su ile karıştırıldı. Manyetik-ısıtmalı karıştırıcıda eriyene kadar 20-30 dakika bekletildi. Otoklavda 121⁰ C de 20 dakika kalacak şekilde ayarlandı. Steril plastik plaklara dispenser yardımıyla 0.3 cm kalınlıkta döküldü. Hazırlanan besiyeri plakları +4⁰ C' de saklandı.

Sabouroud Dextrose Agar (SDA)

Saccharomyces türleri SDA besiyerinde üretildi. SDA hazırlanması; 30 gr Sabouroud dextroz broth tozu (Merck, Germany), 14 gr bakteriyolojik agar tozu (Oxoid, England) ve 1 lt distile su kullanılarak hazırlanan çözelti, ısıtmalı karıştırıcıda tamamen eriyene kadar karıştırıldı. Steril edilmek amacıyla otoklavda 121⁰ C de 20 dakika bekletildi. Besiyeri, hazırlandığı şişe içinde donmayacak ısıya kadar soğuması beklenecek şekilde steril plaklara 0.3 cm kalınlıkta döküldü. Kullanıma hazır halde +4⁰ C' de bekletildi.

Sabouroud Dextrose Broth

Sabouroud dextroz broth tozundan 30 gr, 1 lt distile su ile iyice karıştırılıp otoklavda 121⁰ C de 20 dakikada steril edildi. Steril koşullarda, +4⁰ C' de bekletildi. *Saccharomyces* türlerinin -80⁰ C de uzun süre tutulabilmesi için SD broth'a %15 gliserol ilavesi yapılarak kullanıldı.

De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth

MRS'nin 30 gr kuru tozu, 1 lt distile su ile karıştırıldı. Otoklavda 121 °C de 20 dakika kalacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan sıvı besiyeri steril şartlar korunarak +4 °C' de saklandı. *Lactobacil* türlerini -80° C'de uzun süre kalabilmesi için bu besiyeri, depolama için kullanılacağı zaman %15 gliserol ilavesi yapıldı.

Tryptic Soy Broth (TSB)

Enterik patojenleri sıvı besiyerinde üretmek ve ekim işlemi için hazırlanan bakteri süspansiyonları için kullanılan TSB, 30 gr TSB tozu (Fluka Chemie, İndia) ve 1 lt distile su ile hazırlandı. Otoklavda 121 °C de 20 dakika bırakılarak steril olması sağlandı. Steril koşullarda +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

PROBİYOTİKLERİN ASİT DUYARLILIĞININ TESPİTİ

Probiyotiklerin pH duyarlılıkları için, HCl ve NaOH kullanılarak farklı pH'larda (pH 2.0, 3.2, 4.6, 7.6) PBS ve kontrol SF hazırlandı. Kullanımdan önce her biri ayrı ayrı, 0.22 µm- delik çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Probiyotiklerin 48 saatlik kültürlerinden PBS içine birkaç koloni alınarak çözelti spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda optik dansite 0.1'e ayarlandı ve 10⁸- 10⁹ CFU/ml probiyotik içerecek şekilde PBS solüsyonları hazırlanmış oldu.

Steril cam tüplere 100 µl probiyotik mikroorganizma solüsyonu koyuldu. Her bir probiyotiğe 4 farklı pH'taki PBS ve kontrol SF'ten 1 ml ilave edildi ve ortam pH farklılığı yaratıldı (31). Tüpler 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler, +14° C'de, 3000 rpm'de 10 dakika santirfüj edildi. Üstteki süpernatant döküldü. Dipte kalan pelete 1 ml steril SF eklenerek vortekslendi. Probiyotikler, steril şartlarda SF kullanılarak 1/100 ve 1/1000 dilüsyon oluşturuldu. Peletten, SDA ve MRS agar plaklarına ekim yapıldı. *Lactobacil*'ler anaerob, *Saccharomyces*'ler aerob koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı (31).

PROBİYOTİKLERİN SAFRA DUYARLILIĞININ TESPİTİ

Probiyotik mikroorganizmaların safra direncine bakmak için MRS broth ile hazırlanan %1.0, 1.5, 2.0 konsantrasyonlarda safra kullanıldı. Safra (Bile bovine), Sigma Aldrich'ten (Germany) sağlandı.

Probiyotiklerin 48 saatlik kültürlerinden PBS içine birkaç koloni alınarak çözelti spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda optik dansite 0.1'e ayarlandı ve 10^8 - 10^9 CFU/ml probiyotik içerecek şekilde PBS ile solüsyonları hazırlandı.

İşaretlenen steril cam tüplere, farklı konsantrasyondaki safra eriyiği ve kontrol serum fizyolojikten 1'er ml koyulduktan sonra, hazırlanan mikroorganizma solüsyonlarından 100'er µl belirli tüplere ilave edildi. Tüpler 37^0 C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler, $+14^0$ C'de, 3000 rpm'de 10 dakika santirfüj edildi. Üstteki süpernatant döküldü. Dipte kalan pelete 1 ml steril SF eklenerek vortekslendi. Probiyotikler, steril şartlarda SF kullanılarak 1/100 ve 1/1000 dilüsyon oluşturuldu. SDA ve MRS agar plaklarına peletten ekim yapıldı. *Lactobacil*'ler anaerob, *Saccharomyces*'ler aerob koşullarda 37^0 C'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı.

Her bir probiyotik mikroorganizma için deney 3 kez tekrarlandı.

PLAK-DİFÜZYON TEKNİĞİ

Bu çalışma ile probiyotik mikroorganizmaların ve onların süpernatantlarının gastrointestinal sistemde patojen olan mikroorganizmaların üremesine etkisi araştırıldı. Plak difüzyon tekniği için; kanlı agarda enterik patojenler (*S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *E. coli*) pasajlanarak hazırlandı.

Çalışma için probiyotik mikroorganizmaların hem kendileri hem de süpernatantları kullanılmak üzere hazırlık yapıldı. Mikroorganizmaların uygun koşullarda üretilen 48 saatlik pasajlarından çalışma günü uygun sıvı besiyeri içinde, spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda optik dansite 0.1'de, 10^8 - 10^9 CFU/ml yoğunlukta süspansiyonlar hazırlandı. Probiyotik mikroorganizmalardan süpernatant oluşturulmak üzere; SDA ve MRS agar besiyerlerindeki pasajlarından 48 önce SD broth ve MRS broth besiyerlerine 10^8 - 10^9 CFU/ml yoğunlukta olacak şekilde ekim yapıldı. Probiyotik içeren bu tüpler mikroaerofilik ortamda, 37^0 C'de, 48 saat inkübe edildi (10,29,32,72).

Plak difüzyon tekniği uygulamasında, kanlı agar plaklarının her birine spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda optik dansite 0.1'e ayarlanan, 10^8 - 10^9 CFU/ml, enterik patojenlerden birinin ekimi yapıldı. Plakların herbirine steril cam tüplerin ağız kısımlarının yardımı ile, 1 cm çaplı kuyucuklar oluşturularak özel besiyeri hazırlandı (71,73,74). Kuyucuklara, test edilecek probiyotik mikroorganizma solüsyonları ve probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarından belirli miktarlarda koyuldu. Plaklar anaerob koşullarda 37^0 C'de, 48 saat inkübe edildikten sonra kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları değerlendirildi (73,74). İnhibisyon zon çapları milimetre cinsinden kayıt edildi ve plakların fotoğrafları çekildi.

Çalışmada yer alan enterik patojenlerin her biri ile probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantları arasındaki plak diffüzyon deneyi, aynı koşullar sağlanarak üç kez tekrar edildi.

Plak difüzyon tekniği ile kültürde elde edilen plakların fotoğrafları çekildi (Nikon).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmanın sonuçları Graph Pad Prism istatistik programında, One way Anova-Tukey yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Tablo ve şekiller çizildi. Çalışmada istatistiksel anlamlılık kriteri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

IV. BULGULAR

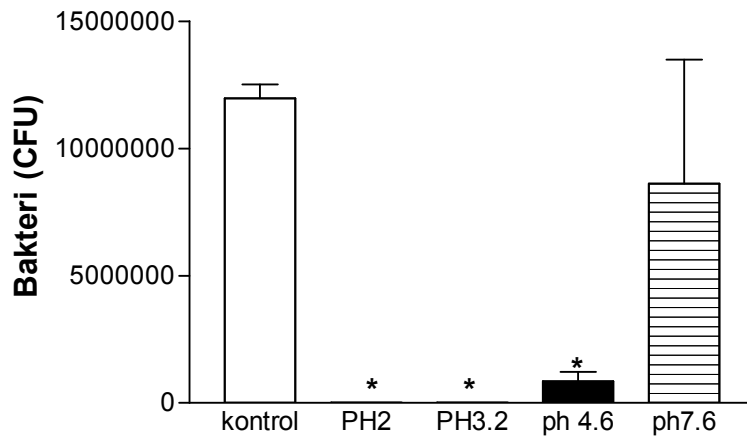
Probiyotik Mikroorganizmaların Asit Duyarlılığı

Probiyotik mikroorganizma'ların farklı konsantrasyonlarda asit ortamlarda canlılığını devam ettirmeleri incelendiğinde; farklı türden mikroorganizma'ların ortam pH'ından farklı şekilde etkilendiği tespit edilmiştir (Tablo 2).

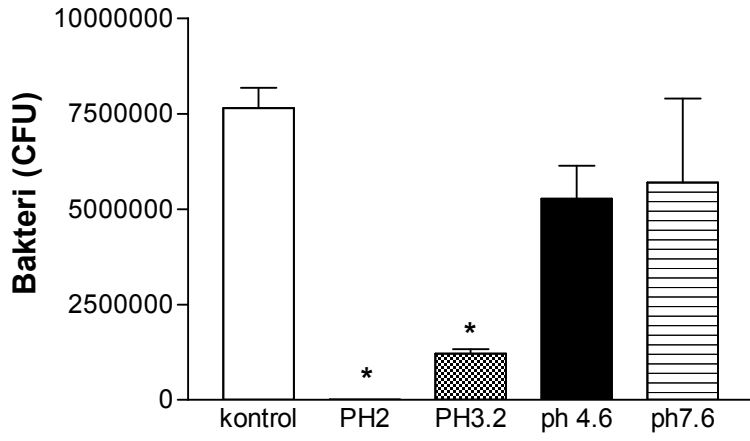
S. boulardii her pH değerinde üremesine karşın ($p>0.05$), diğer üç mikroorganizmanın pH 3.2 ve altında asite duyarlılığı ($p<0.05$); bunun dışında *L. acidophilus*'un pH 4.6'da asite duyarlılığı görüldü ($p>0.05$) (Şekil 2-5).

Tablo 2. Probiyotik mikroorganizmaların asit duyarlılığı

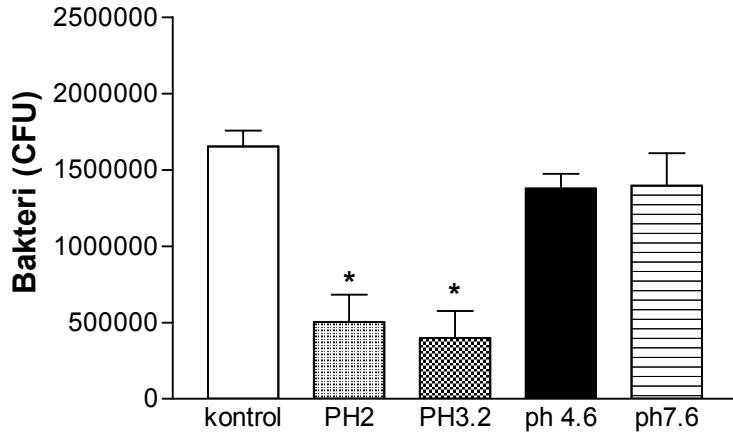
pH	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. cerevisia</i>	<i>S. boulardii</i>
2.0	0	833	502500	6134167
3.2	0	1209167	398750	4622292
4.6	840000	5267500	1378750	7152292
7.6	8620833	5691667	1397500	6228750
SF	11965833	7645833	1653750	6226250



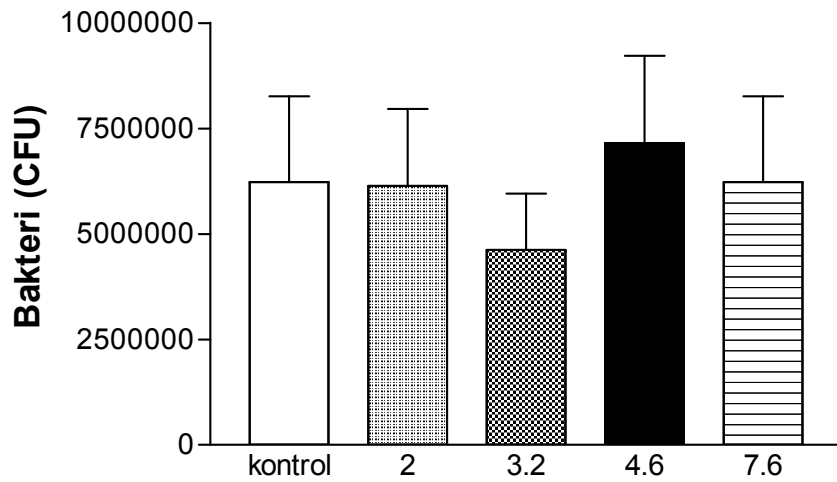
Şekil-2: *L. acidophilus*'un farklı pH'larda üreme yoğunluğu



Şekil-3: *L. casei*'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu



Şekil-4: *S. cerevisiae*'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu



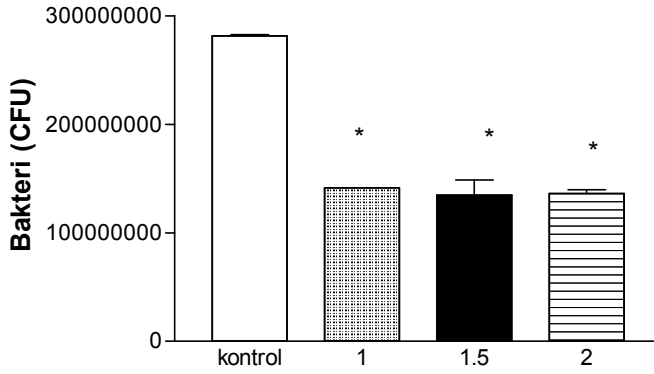
Şekil-5: *S. boulardii*'nin farklı pH'larda üreme yoğunluğu

Probiyotik Mikroorganizmaların Safra Duyarlılıkları

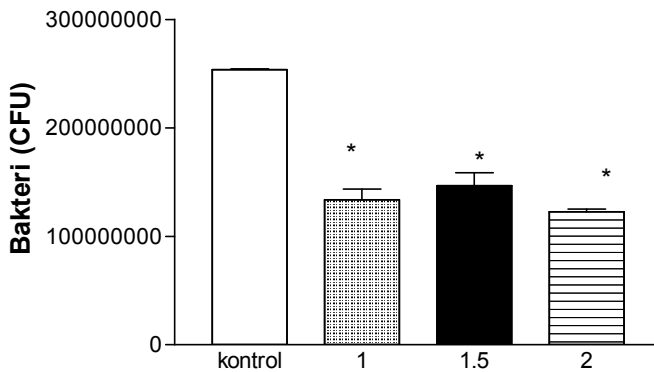
Çalışmada yer alan probiyotik mikroorganizmaların safra duyarlılıklarına bakıldığında, hepsinin de %1, 1.5 ve 2 safra konsantrasyonlarının tümünde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe oldukları görüldü ($P<0.05$) (Tablo-3, Şekil 6-9). Safraya en duyarlı probiyotik mikroorganizmanın *S. cerevisiae* olduğu tespit edildi (şekil 8).

Tablo-3: Probiyotik mikroorganizmaların farklı safra konsantrasyonlarına duyarlılıkları

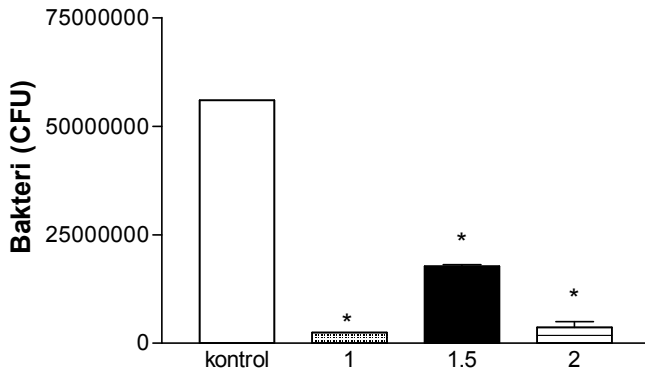
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
%1.0	2238333	2016666	133583333	141333333
%1.5	1535833	5679166	146500000	134666666
%2.0	2973333	6759166	122500000	114000000
KONTROL	5598333	12183333	227500000	281333333



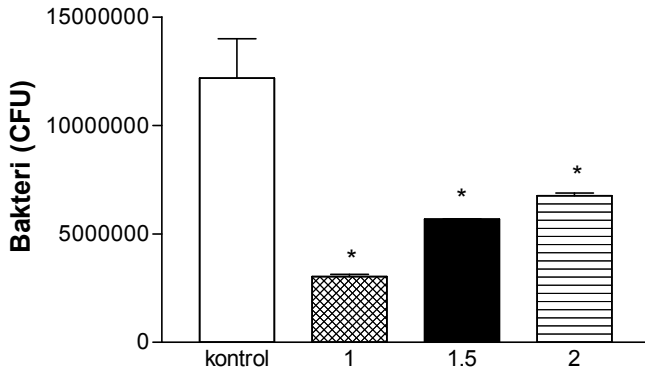
Şekil-6: *L. acidophilus* safra duyarlılığı



Şekil-7: *L. casei* safra duyarlılığı



Şekil-8: *S. cerevisiae* safra duyarlılığı



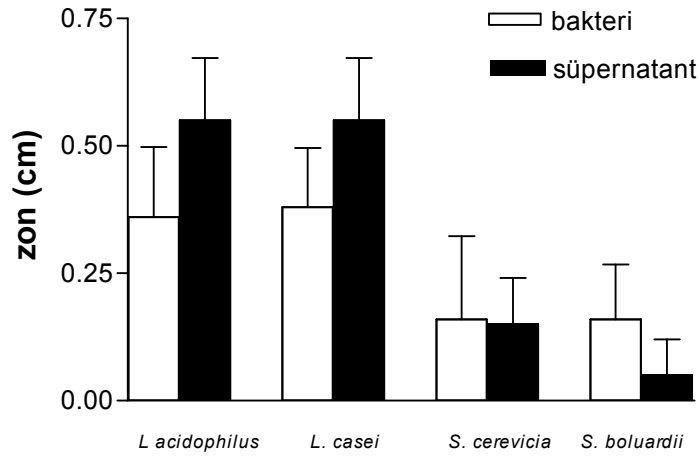
Şekil-9: *S. boulardii* safra duyarlılığı

Enterik patojenlerin probiyotik mikroorganizmalar ile inhibisyonu

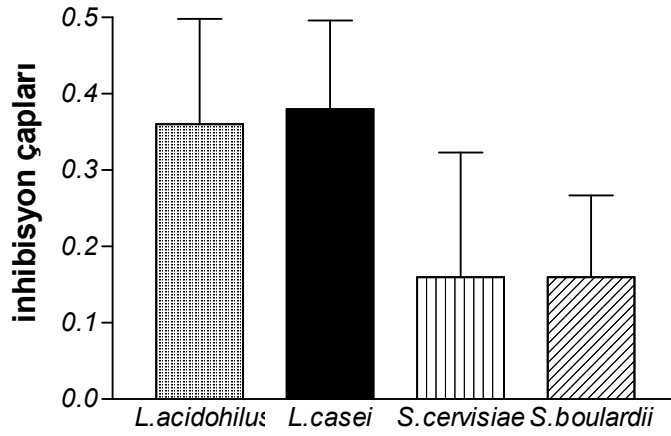
S. typhi

S. typhi kültüründe plak diffüzyon tekniği kullanılarak, probiyotik mikroorganizma ve süpernatant kuyucukları çevresindeki zon çapları değerlendirildi (Şekil 10,13-16).

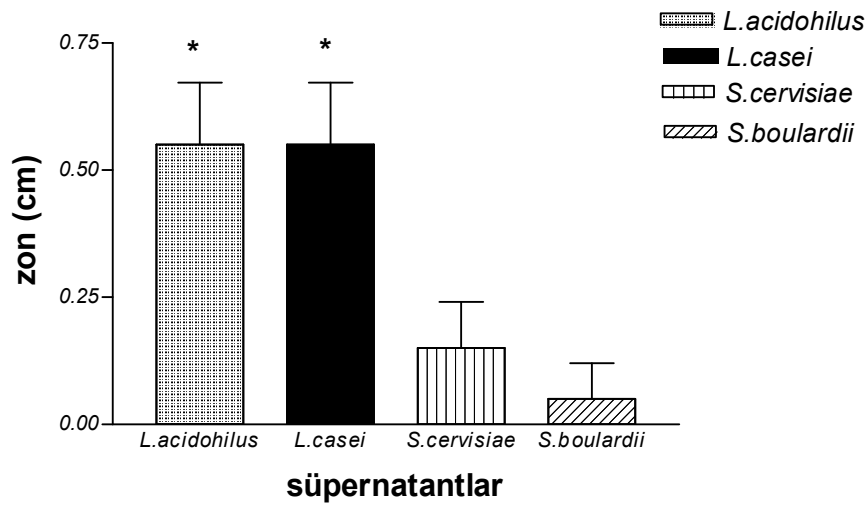
Her bir probiyotiğin mikroorganizma ve süpernatant grupları arasında, *S. typhi* inhibisyonunda, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$) (Şekil 11). Probiyotik mikroorganizma grupları karşılaştırıldığında, 4 probiyotiğin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaz iken (Şekil 12); süpernatant gruplarında, *Lactobacil*'ler, *S. boulardii*'den istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla inhibisyon gösterdi ($P<0.05$) (Şekil 13).



Şekil-10: *S. typhi* kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları

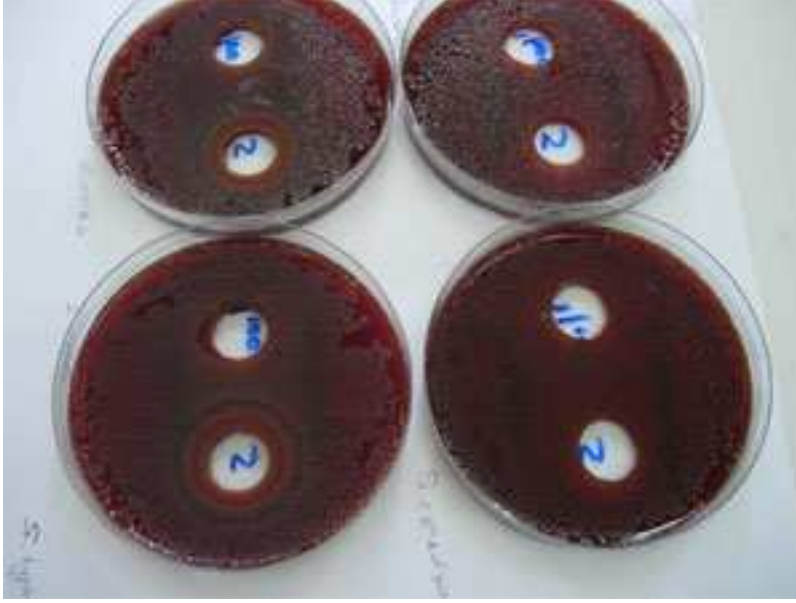


Şekil-11: Probiyotik mikroorganizmaların *S. typhi*'de inhibisyon zon çapları

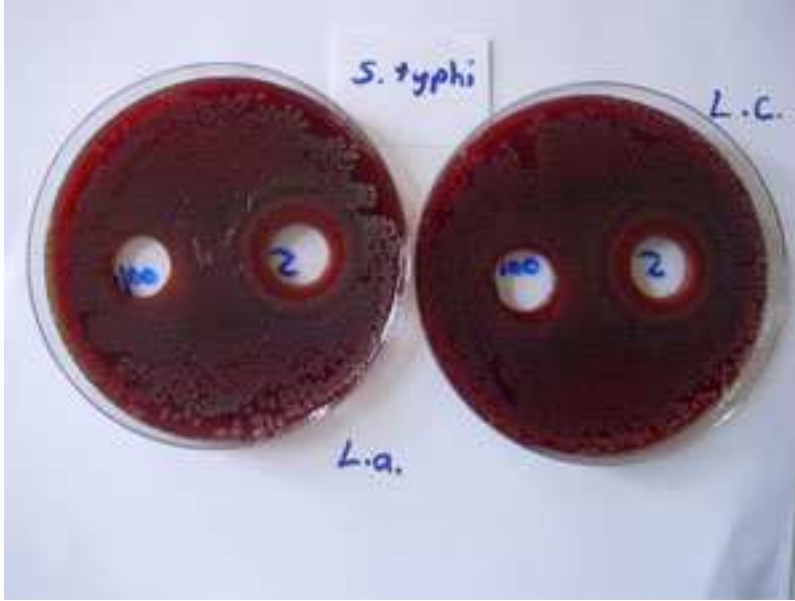


Şekil-12: Probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının *S. typhi*'de oluşturdukları inhibisyon zon çapları

S. typhi'nin plak diffüzyon tekniği ile inhibisyon görünümüleri



Şekil-13: *S. typhi* kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil-14: *S. typhi* kültüründe *Lactobacil* türleri ve süpernatantlarının inhibisyon zonları (her iki plağın sağında süpernatantlar yer alıyor)



Şekil-15: *S. typhi* kültüründe *L. casei* ve süpernatantının inhibisyon zonları



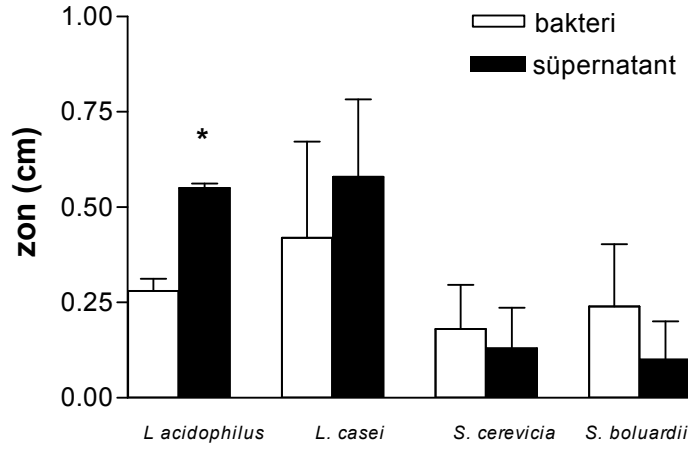
Şekil-16: *S. typhi* kültüründe *S. boulardii* inhibisyon zonu

S. enteritidis

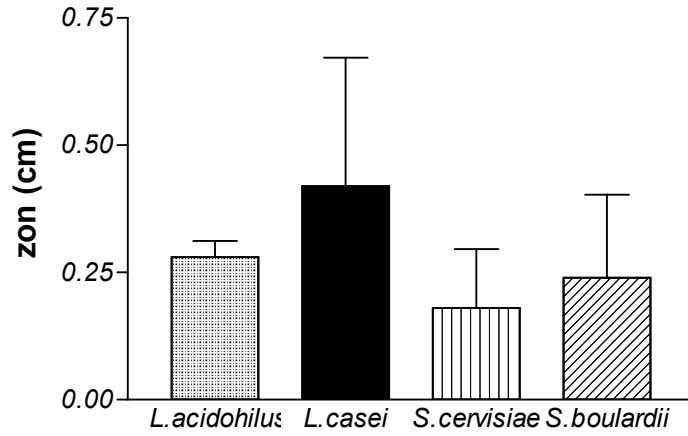
S. enteritidis kültüründe, plak diffüzyon tekniği ile, probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının çevresindeki zon çapları karşılaştırıldı (Şekil17,20-22). Probiyotik grupları kendi aralarında mikroorganizma ve süpernatantlarına göre analiz edildiğinde sadece *L. acidophilus* grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P < 0.0001$) (Şekil 18).

Çalışmada yer alan probiyotiklerin, mikroorganizma grupları arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın ($P > 0.05$), *Lactobacil*'lerin

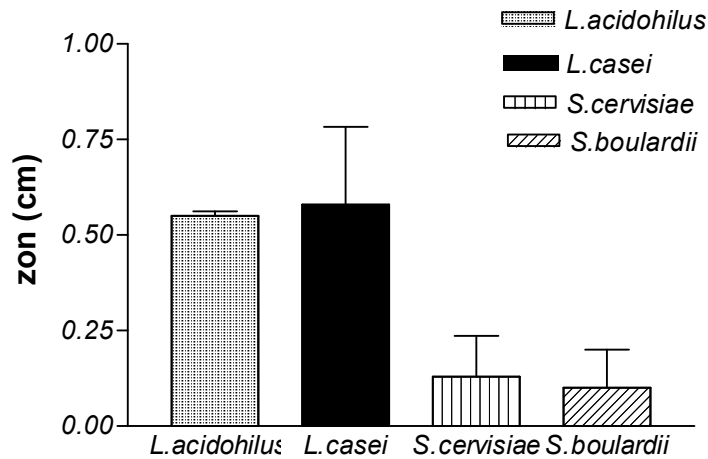
süpernatant gruplarının *Saccharomyces* süpernatantlarına göre anlamlı şekilde fazla inhibisyon yaptığı görüldü ($P < 0.001$) (Şekil 19).



Şekil-17: *S. enteritidis* kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları

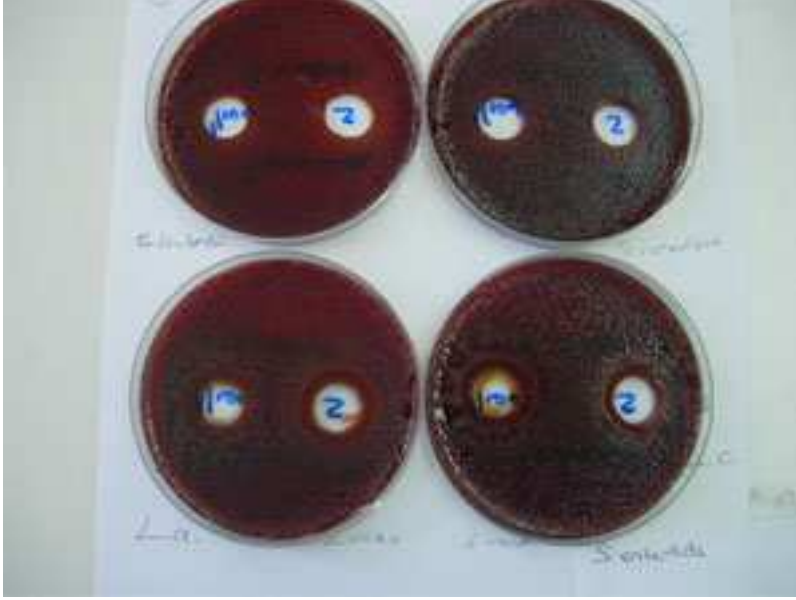


Şekil-18: Probiyotik mikroorganizmaların *S. enteritidis*'te oluşturdukları inhibisyon zon çapları



Şekil-19: *S. enteritidis* kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları

S. enteritidis'nin plak diffüzyon tekniği ile inhibisyon görünümüleri



Şekil-20: *S. enteritidis* kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları



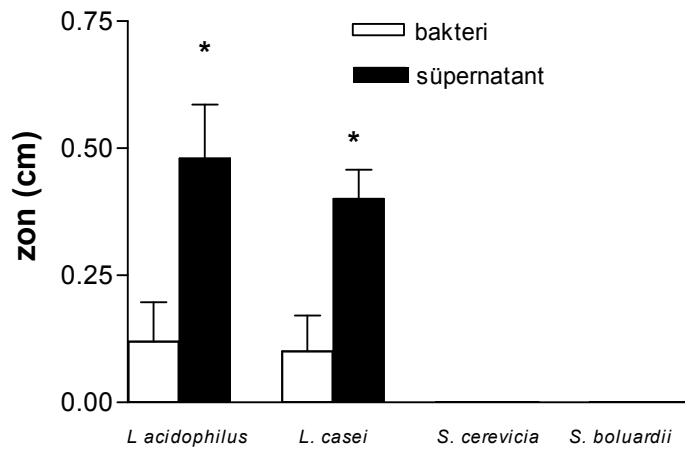
Şekil-21: *S. enteritidis* kültüründe *Lactobacil* türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları (her iki plağın sağında süpernatantlar yer alıyor)



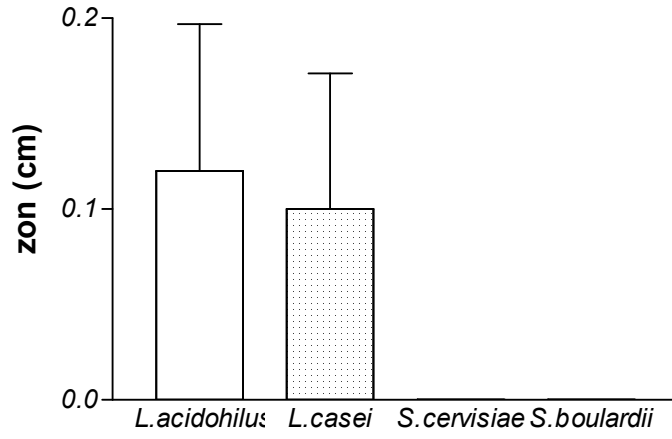
Şekil-22: *S. enteritidis* kültüründe *L. casei* ve süpernatatının inhibisyon zonları
E.coli

E. coli kültüründe plak diffüzyon tekniği kullanılarak, probiyotik mikroorganizma ve süpernatant kuyucukları çevresindeki zon çapları değerlendirildi (Şekil 26-28). Probiyotik grupları kendi aralarında mikroorganizma ve süpernatantlarına göre incelendiğinde *L. acidophilus* ($P < 0.01$) ve *L. casei* ($P < 0.008$) süpernatantlarının istatistiksel olarak daha fazla inhibisyon oluşturduğu görüldü (Şekil 23).

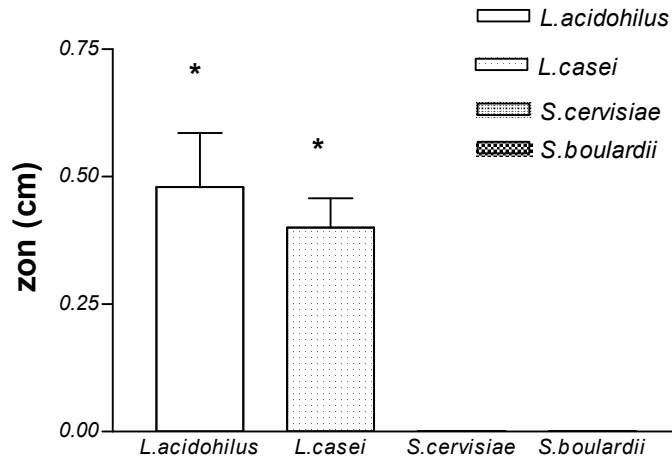
Tüm probiyotiklerin mikroorganizma grupları arasında istatistiksel anlamlılık bulunmazken, süpernatant gruplarında *Lactobacil* gruplarının *Saccharomyces* gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonu tespit edildi ($P < 0.01$) (Şekil 24,25).



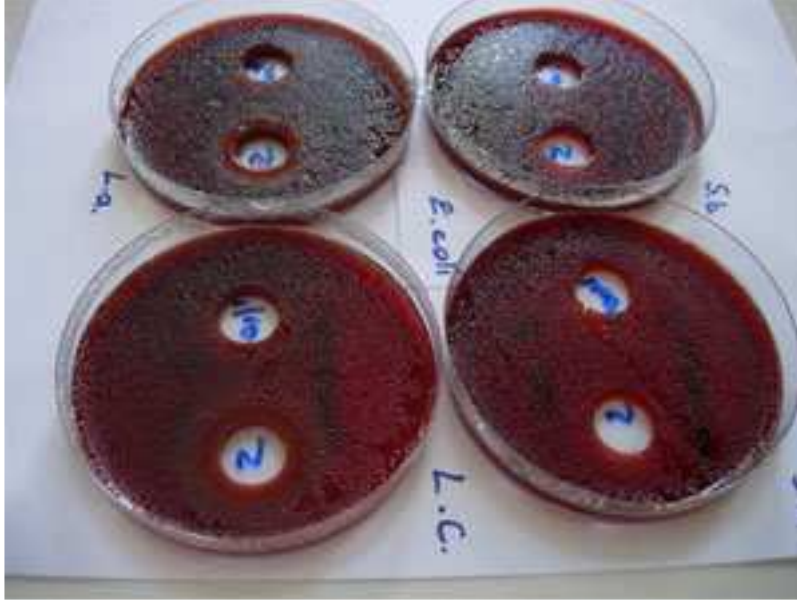
Şekil-23: *E. coli* kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları



Şekil-24: *E. coli* kültüründe probiyotik mikroorganizmaların inhibisyon zon çapları



Şekil-25: *E. coli* kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları
E. coli'nin plak diffüzyon tekniği ile inhibisyon görünümleri



Şekil-26: *E.coli* kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları



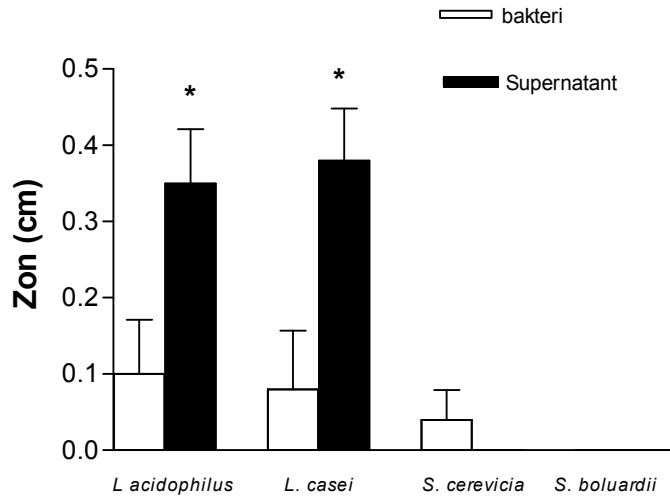
Şekil-27: *E.coli* kültüründe *Lactobacil* türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil-28: *E. coli* kültüründe *Lactobacil casei* ve süpernatatının inhibisyon zonları

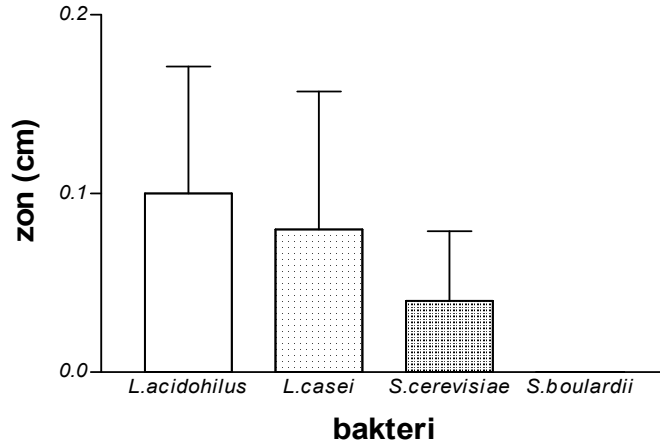
S. sonnei

Probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının, *S. sonnei*'yi inhibisyonunu araştırmak üzere, plak difüzyon tekniği kullanılarak kuyucaklar etrafında oluşan zon çapları ölçüldü (Şekil32-34). Probiyotik mikroorganizma grupları kendi aralarında, mikroorganizma ve süpernatantlarına göre incelendiğinde *L. acidophilus* ($P < 0.001$) ve *L. casei* ($P < 0.02$) süpernatantlarının istatistiksel olarak daha fazla inhibisyon oluşturduğu görüldü (Şekil 29).

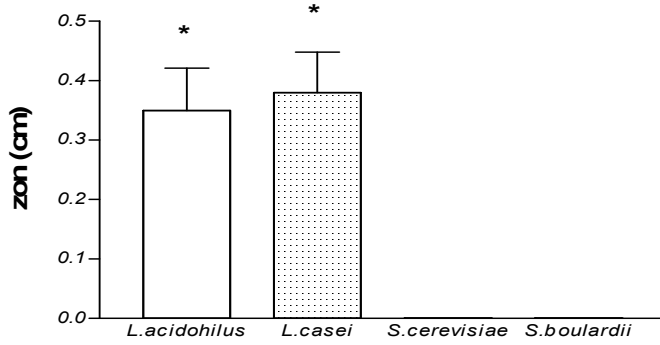


Şekil-29: *S. sonnei* kültüründe probiyotik mikroorganizmalar ve süpernatantlarının inhibisyon zon çapları

Tüm probiyotiklerin mikroorganizma grupları arasında istatistiksel anlamlılık bulunmazken, süpernatant gruplarında *Lactobacil* gruplarının *Saccharomyces* gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonu tespit edildi ($P<0.0001$) (Şekil 30,31).

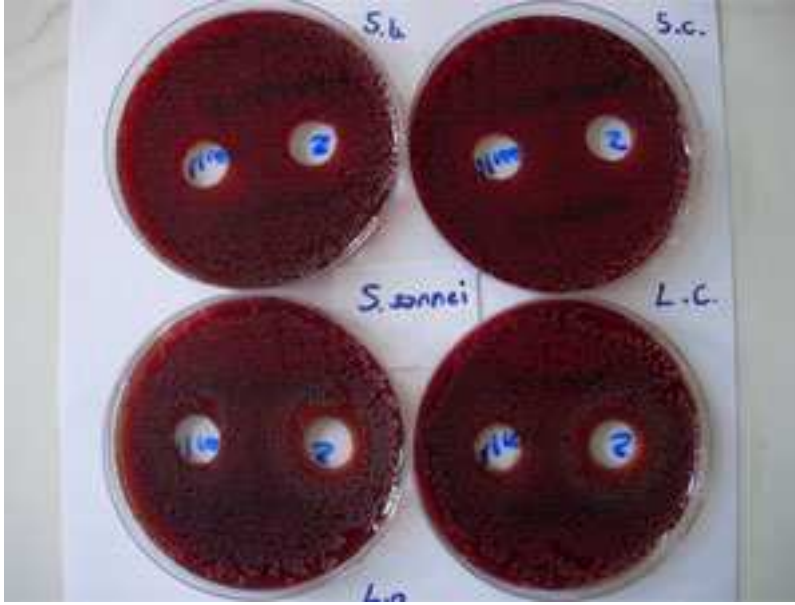


Şekil-30: *S. sonnei* kültüründe probiyotik mikroorganizmaların inhibisyon zon çapları



Şekil-31: *S. sonnei* kültüründe probiyotik mikroorganizmaların süpernatantlarının inhibisyon zon çapları

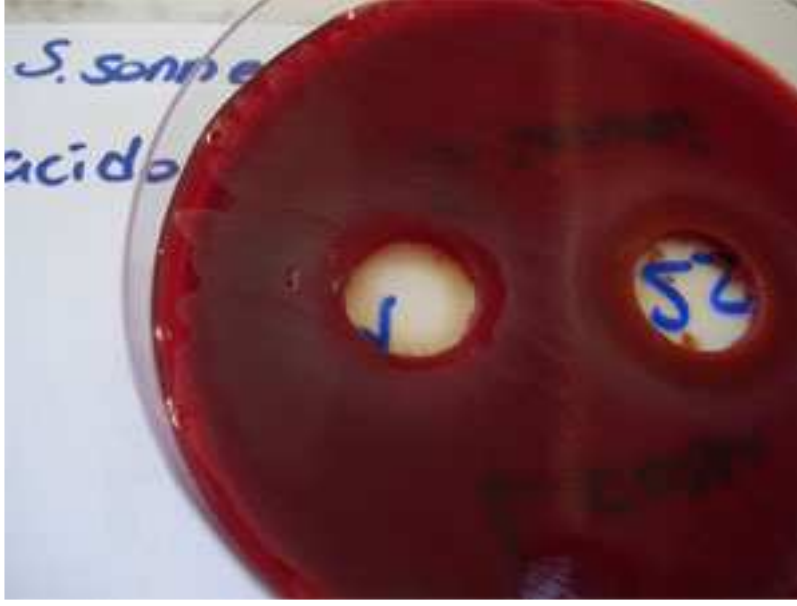
S. sonnei'nin plak diffüzyon tekniği ile inhibisyon görünümüleri



Şekil-32: *S. sonnei* kültüründe her bir probiyotik mikroorganizma ve süpernatantların oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil-33: *S. sonnei* kültüründe *Lactobacil* türlerin oluşturduğu inhibisyon zonları (her iki plağın sağında süpernatantlar yer alıyor)



Şekil-34: *S. sonnei* kültüründe *L. acidophilus* ve süpernatatının inhibisyon zonları

V. TARTIŞMA

Probiyotik mikroorganizmalar, ilk ve en yaygın olarak, gastrointestinal sistem hastalıklarında; özellikle akut gastroenteritlerde kullanım alanı bulmuştur. Ancak akut gastroenteritlerden, rotavirus diyaresi ve antibiyotikle ilişkili diyare dışındakilerde etkisi kesin olarak kanıtlanmamıştır (47,75-77). Ülkemizde sıklıkla karşılaştığımız ve özellikle riskli gruplarda uzun süren, dehidratasyon, akut böbrek yetmezliği, bakteremi, lokal organ infeksiyonları gibi ciddi komplikasyonlara yol açması yanı sıra, iş gücü ve ekonomik kayıplara neden olan invaziv akut gastroenterit etkenleri sorun oluşturmaktadır. Bu etkenlerin tedavisi için kullanılan antibiyotiklere her geçen gün direnç geliştiği, ayrıca antibiyotik kullanımı ile ilgili yan etkilere maruz kalındığı gözlenmiştir. Tedavi için yakın zamanda yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulacağı düşünülerek probiyotik mikroorganizmalar ve onların ürünleri araştırılmıştır.

Günümüzde giderek önemi artan ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılan probiyotik mikroorganizmaların patojen mikroorganizmalara karşı değişik etki mekanizmaları ile öldürücü veya patojenitesini yok edici özelliklerinin var olduğu gösterilmiştir (5,7,73,74). Probiyotiklerin etkileri endojen flora ve immun sistem üzerine direkt ya da indirekt yoldan olabilir (4). Probiyotiklerin etki alanlarına bakıldığında gastrointestinal sistemle ilgili yararların ön planda olduğu görülmekte olup bağırsakta kolonizasyon direncinin desteklenmesi, metabolik süreçlerin gelişmesi ve immünomodülatör etki bu alandaki başlıca etkilerdir (26). Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizmaları arasında mikrobiyal antagonizma, antitoksik aktivite, lokal ve genel immun sistemi uyarma gibi fonksiyonlarının bulunması patojen mikroorganizmalara karşı kullanmada probiyotiklerin önemini arttırmaktadır (8,54,78).

Probiyotiklerle ilgili son yıllarda yapılan gerek *in vitro* gerekse *in vivo* deneysel çalışmalar, bakteriyel patojenlere karşı antibakteriyel etkilerinin, probiyotik türlerine göre değiştiğine işaret etmektedir (32).

Probiyotiklerin gastrointestinal hastalıklar üzerine etkilerini araştıran az sayıda randomize kontrollü, çift kör- plasebo kontrollü insan çalışması mevcut olup, bunlarda denek sayısı azdır (4). Bu çalışmalar, probiyotiklerin gastrointestinal hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki rolünü desteklemektedir (23). Ancak kullanılan probiyotik türlerin farklı olması, doz ve formülasyon farkı, karşılaştırma yapmayı güçleştirebilmektedir (4).

Lactobaciller'in süpernatantları ile yapılan çalışmalar, çok sayıda Gram negatif enterik patojenin (*Enterotoxigenic E. coli (ETEC)*, *enteropathogenic E. coli (EPEC)*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* ve *C. difficile*) üremesinin laktik asit etkisi ile inhibe olduğuna işaret etmektedir (33). *L. acidophilus*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, ve *B. bifidus* türlerinin *in vitro* deneylerle ürettikleri laktik asit, asetik asit ve hidroklorik asit etkisi ile *H. pylori* üremesini inhibe edebildikleri gösterilmiştir (72,79).

Son yıllarda değişen dünya koşulları ile birlikte çalışan kesimin artması, olumsuz çevre koşulları, kontrolsüz ve sağlıksız gıdaların kullanımı ile insanların yaşamları da riske girmiştir. Özellikle kontrolsüz kullanılan ilaçlar ve antibiyotikler, sindirim sisteminde mevcut mikrofloradaki dengeyi bozmakta, ayrıca birçok organda uzun sürede onarılamayacak farklı hastalıklara sebep olmaktadır. Oysa gerek hastalıkların önlenmesi gerekse tedavi edilmesi amacıyla antibiyotiklerin yerine ya da beraberinde, biyolojik mekanizmaları destekleyen probiyotikler, bir alternatif olarak kullanılabilir. Böylelikle intestinal mikroflora stabilitesi sağlanır, uygun şekilde yönlendirilir ve antibiyotiklerin zararlı etkileri de engellenmiş olur.

Çok sayıda farklı türden mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır (25). Fonksiyonel probiyotiklerin seçimi için bilinen pek çok özellik vardır. Bu özellikleri içinden mikrobiyal antagonizma, immunmodülasyon, antitoksik ve enzimatik aktivite, enfeksiyöz ajanlarla savaşta en etkili olanlardır (25,26,28,29,48). Bunun yanında mikroorganizma olması nedeniyle probiyotiklerin fizyolojik bariyerlerdeki stabilitesi de kullanım ve etki için önemli bir faktördür (47).

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar, ağız yoluyla alınıp sindirim sisteminin bariyerleri ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Probiyotik olarak sınıflandırılabilmesi ve etkilerini gösterebilmeleri için gerekli faktörler arasında en önemlilerinden biri, GİS’de varlıklarını devam ettirebilmeleridir (6,80,81). Probiyotiklerin proteolitik enzimlere, midede düşük pH değerlerine (1.8-3.2), safra konsantrasyonlarına ve pankreatik sıvıya karşı direnç göstermeleri beklenmektedir (6,80,81,82). Bunun da mide asidi ve safraya kararlılıklarına bağlı olduğu bilinmektedir (6,80).

GİS’in doğal bariyer elemanlarından olan mide asidi sayesinde midede, yalnızca az miktarda aside dirençli flora bakterisi (*Lactobacil* türlerinden) ve patojen mikroorganizma olan *H. pylori* yaşamını devam ettirebilmektedir (83). Birçok patojen mikroorganizmanın mide asidi ve proteolitik enzimlerin etkisi ile öldürüldüğü bilinmektedir. Ancak probiyotik mikroorganizmaların GİS’de canlı kalarak ya da antimikrobiyal maddeleri üretinceye kadar canlılıklarını devam ettirmeleri gerektiği düşünülmektedir.

In vitro ortamda yapılan çalışmalarda, GİS savunma sistemi göz önüne alınmadığı takdirde, çalışılan probiyotik mikroorganizma’nın *in vivo* kolonizasyonu ve olumlu etkilerinin yeterli olabileceği yönünde yanlış sonuçlara varılabileceği düşünülmüştür. *In vivo* insan ve hayvan çalışmalarında ise, probiyotik mikroorganizma türüne bağlı olarak etkinliğin değişmesinde, asit ve safra direnç durumlarının en önemli belirleyicilerden biri olduğu ve diğer özelliklerini belirlemede sınırlayıcı faktör olduğu sanılmaktadır.

Laktik asit bakterileri olarak adlandırılan *Lactobacil* ve *Bifidobacter* türlerinin gastrik asit, safra tuzları ve pankreatik enzimlere dirençli oldukları, ancak yine de türler arasında farklılıklar bulunabileceği belirtilmektedir (6). İntestinal floranın elemanı olan *L. acidophilus*’un gastrik sağ kalımında rol oynayan çok sayıda gen bulunmuştur (84).

Midede canlılığını devam ettirebilme ve safra tuzlarına direnç yeteneklerini araştıran *in vitro* çalışmalar ile, *in vivo* sonuçların uyumlu bulunduğu; ancak bununla

birlikte, *Lactobaciller*'le yapılmış bir çalışmanın sonucuna göre, *in vitro* çalışma sırasında HCl ile asidifiye edilmiş distile suya göre, mideden elde edilen asit salgısına mikroorganizmaların daha dirençli olduğu gösterilmiştir (83).

Günümüzde, antibiyotikle ilişkili diyare ve çocuklarda akut rotavirus diyaresinde kullanımı önerilmiş olan *S. boulardii*, probiyotik olarak kullanılan bir mayadır. Bu çalışmada, *S. boulardii*'nin, *in vitro* ortamda, pH 2'de dahil olmak üzere, farklı pH değerlerinde canlılığını devam ettirdiği ve kontrol grubu ile hiç fark olmadığı görülmüştür. Midenin asit pH'sına dirençli bulunan *S. boulardii*'nin, rahatlıkla canlı olarak, ince ve kalın barsaklara geçebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte aynı tür içerisinde yer alan *S. cerevisiae* ise, pH 3.2 ve 2 değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış üreme göstermiştir. *S. cerevisiae*, mide de düşük pH'lı ortamda canlılığını sürdüremeyeceği sonucuna varılmıştır.

Bu *in vitro* çalışmada *L. acidophilus*'un pH 4.6'da canlılığını önemli miktarda kaybettiği ve daha düşük pH değerlerine sahip ortamda ise hiç mikroorganizma kalmadığı görülmüştür. *L. casei*, ortam pH 4.6'da iken üremesinin baskılanmamış ancak 3.2 ve 2 gibi düşük pH'larda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde canlılığını yitirmiştir. Asiditesi farklı MRS sıvı besiyerleri içinde 3 saat inkübasyon ile bu sonuçlar elde edilmiştir. Burada asit dirençleri test edilen iki *Lactobacil* suşu ve *S. cerevisiae*'nin *in vivo* ortamda mide asidinden daha az etkilenmesi beklense de, *S. boulardii*'ye göre asit ortama daha duyarlı oldukları görüldü. Bu sonuçlara göre, *S. boulardii*'nin canlılığını devam ettirerek mideden geçişinde *in vivo* şartlarda sorun yaşanmayacağı öngörülmüştür. Bugüne kadar *S. boulardii* ile yapılan çalışmalar bizi desteklerken (85), *Lactobacil*'lerle ilgili daha önce yapılan çalışmaların bir kısmı uyumsuz bulunmuştur (82). Buna karşın, Conway'ın çalışmasında HCl ile mide asidi arasında sağ kalımlarındaki önemli farklılık, bakterinin fizyolojik ortamda aside direncini sağlayan intrensek ve/veya ekstrensek faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir (83).

Safra asitlerinin antibakteriyel özellikleri, uzun zamandır bilinmektedir (83). Bu özellik yardımı ile, Mc Conkey agar besiyerine deoksikolik asit eklenmesi

yoluyla, diğerk bakterilerin üremeleri inhibe edilerek *Salmonella- Shigella* izolasyonu sağlanmaktadır. Ancak flora elemanı da olan probiyotik bakteri türlerinin önemli derecede safra toleransı varlığı da bildirilmiştir. Tolerans mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve çalışılan örnek probiyotiklerde kabul edilebilir minimum değer bilinmemektedir. Hidrofobik safra tuzlarının bakterileri inhibisyon kapasitesinin, hidrofilik durumdan daha fazla olduğu kanıtlanmıştır (81,86-88). *In vitro* şartlarda safra tuzlarına lesitin eklendiğinde, *in vivo* ortamı taklit ettiği ve bakteriyostatik etkinin azaldığı *E. coli* ve *Enterococcus faecalis* ile yapılan çalışmada gösterilmiştir (88). Bu durum, bizim çalışmamızda, safra tuzlarının antimikrobiyal etkisinin probiyotik mikroorganizmalar üzerine beklenenden fazla bulunmasını da açıklayabilir.

Bu çalışmada, safraya maruz bırakılan tüm probiyotik mikroorganizmaların üremelerinin, üç farklı konsantrasyondan da etkilendiği tespit edilmiştir. Çalışılan probiyotikler içinde safraya en duyarlı bulunan ise *S. cerevisiae* olmuştur.

Farklı *probiyotik* suşlarının özelliklerinin farklı olduğu bilinmektedir. Gönüllülerle yapılan bir çalışmada *Lactobacillus GG*'nin oral alımı sonrasında feçes örneğinden ekim yapılmış ve gönüllülerin ilk 4 gün boyunca %86'sında aynı mikroorganizma izole edilebilmiştir (89). Mide asiditesi ve safranın antimikrobiyal etkilerinin, patojen mikroorganizmalarda olduğu gibi probiyotiklerin de yiyeceklerle ve özellikle sütle alınması durumunda daha az görüleceği bildirilmiştir (22,83). Safra asitlerinin etki mekanizması hakkında *in vitro* bir çalışmada, safra tuzlarının membran lipidlerinde yapısal değişiklik yaparak permeabilitede artışı sonucu mikroorganizmanın ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kullanılan dört farklı *Lactobacil* suşundan (*L. reuteri*, *L. delbrueeckii*, *L. acidophilus* ve *L. casei*) yalnız *L. reuteri* serbest ve konjuge safra asitlerine dirençli bulunmuştur (81).

Bu bulgular, probiyotikler içinde *S. boulardii* daha az olmak üzere hepsinin fizyolojik bariyerlerden etkilenebileceğini göstermektedir. Bu bariyerlerin nötralizasyonunu sağlayan uygulamalarla (yiyeceklerle alınması, antiasit vs) ya da enterik açılımlı preparatların kullanılması ile bariyerlerden kaçış sağlanabilir.

Probiyotikler, diyarenin önlenmesi ve tedavisinde, çok farklı mekanizmaları ya tek tek ya da kombine şekilde kullanılmaktadırlar (47). Akut infeksiyöz diyarede probiyotikler, immunolojik mekanizmalar ve intestinal mucus üretiminde artış yaparak enteropatojenlerin tutunmasını engellemek gibi konakçı üzerinden etki gösteren mekanizmalar (patojenlerle epitel hücrelerindeki bağlanma alanları için yarışma) ve intestinal lümeneye salınan enzimler, bakteriyosin, organik asitler ve H₂O₂ üretimi ve antitoksik mekanizmalardan biri veya birkaçı ile patojen mikroorganizmaya karşı etkin olabilmektedir. Bu *in vitro* çalışmada, konakçı üzerinden etkiler bir yana bırakılarak, enteropatojen ile probiyotik mikroorganizma ve metabolitlerinin direkt etkileşimlerinin sonucu araştırılmıştır.

Akut diyare tedavisinde probiyotiklerin yerini ortaya koymak için 2006 yılında yapılan meta-analizde, placebo kontrollü 34 klinik çalışma değerlendirilmiştir (90). Çalışmalardan 33'ü gelişmiş ülkelerden gönderilmiş ve tanı olarak antibiyotikle ilişkili diyare, turist diyaresi ve çocuklarda infeksiyöz diyare yer almıştır. Değerlendirme, akut diyarede probiyotik mikroorganizmaların yararlı olacağı sonucunu çıkarmakla birlikte (90); etkenlere ve etkin probiyotik türlerine ait ayrıntı belirtilmemiştir.

Probiyotik etkinlik için, mikroorganizmanın canlı olması gerekliliğini savunan birçok görüşe rağmen, özellikle GİS infeksiyonlarına etki mekanizmasına bakıldığında, metabolitlerin de önemli bir kısmı oluşturduğu düşünülmektedir (32,48). İlk yıllarda probiyotik tanımındaki 'canlı mikroorganizmalar' ifadesinin 'canlı mikroorganizmalar ve onların komponentleri' olarak genişletildiği hatırlanmalıdır (4).

Probiyotik mikroorganizmaların süpernatantları, santirfügasyon ve süzme işlemleri ile hazırlanarak, canlı mikroorganizma içermemekte, ancak probiyotiğin metabolik ürünlerinden oluşmaktadır (32,91). Bu çalışmada kullanılan probiyotik süpernatantlarının, canlı mikroorganizma içermediklerini doğrulamak üzere uygun koşullarda ekim yapılmış ve hiçbir denemede üreme tespit edilmemiştir.

Çalışılan her iki *Lactobacil* türünün, enterik patojenlere etkili olabilmesi için canlı olması gerekmediği, metabolitlerinden oluşan preparatlar ile inhibisyon etkilerinin oluşabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmada yer alan iki *Saccharomyces* türünün de, fizyolojik bariyerlerden daha az etkilendikleri görüldü. Enterik patojenleri inhibe edebilmeleri için çalışmamız kapsamında gösteremediğimiz fakat diğer çalışmalarda belirtilen mekanizmalar ile mutlak canlı mikroorganizma kullanılması gerektiği anlaşıldı.

L. acidophilus'un süpernatantının antibakteriyel aktivitesinin bulunduğu kanıtlanmıştır. Antibakteriyel etkisinin *in vitro* ortamda Gram + ve Gram – olmak üzere, geniş bir spektruma sahip olduğu gösterilmiştir (91). *Lactobacil* süpernatantı, asit ortamda iken, nötral ya da bazik ortama göre daha etkili olduğu iddia edilmektedir. Laktik asit fermentasyonunun son ürünleri; laktik ve asetik asit ve hidrojen peroksitin, patojenlerin üremesine engel olma yeteneğinde oldukları bilinmektedir (91).

VI. SONUÇLAR

1. Probiyotik mikroorganizmaların asit duyarlılığı değerlendirildiğinde; *S. boulardii* her pH değerinde üremesine karşın, diğer üç probiyotik mikroorganizmanın (*L. acidophilus*, *L. casei*, *S. cerevisiae*) pH 3.2 ve altında; bunun dışında *L. acidophilus* 'un pH 4.6 da aside duyarlılığı tespit edildi.
2. Safra duyarlılıklarına bakıldığında, tüm probiyotiklerin safraya duyarlı olduğu, en duyarlı probiyotiğin *S. cerevisiae* olduğu görüldü.
3. Çalışılan enterik patojenlere *Lactobacil*'lerin süpernatantlarının, probiyotik bakterinin kendisinden daha etkili olduğu ve metabolitleri aracılığı ile etkinin ön planda olduğu tespit edildi. *Lactobacil*'lerin fonksiyonel probiyotik olarak kullanılması için canlı olmaları gerekmediği sonucuna varıldı.
4. *Saccharomyces* türlerinin özellikle *S. typhi* ve *S. enteritidis*'e karşı inhibitör etkisi görüldü ve canlı mikroorganizmanın, süpernatantlardan daha etkili olduğu tespit edildi. *Saccharomyces* türlerinin, enterik patojenlere karşı etkin şekilde kullanabilmek için mikroorganizmanın canlı preparatlarına gerek olduğu saptandı.

VII. ÖZET

Probiyotikler, sağlığa yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar ya da onların bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin çoğu, sağlıklı insan intestinal sistem florasından kaynaklanmaktadır. Yüzyıllar önce uzun yaşamın iksiri olarak kullanılan probiyotiklerin akut gastroenteritlerden intestinal neoplaziye kadar farklı alanlardaki hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde rolünü destekleyen çalışmalar bulunmaktadır.

Gelişmekte olan ülkelerde, önlenebilir morbidite ve mortaliteye sahip olan gastroenteritler ayrıca iş gücü ve ekonomik kayba da neden olmaktadır. Gastroenterit etkenlerinden dizanteri tablosu ile seyreden invaziv etkenlerin antibiyotikle tedavisi gerektiği bilinmekte, flora üzerine oluşturdukları baskılayıcı etki ve antibiyotik direnç sorunu yeni tedavi arayışlarını gündeme getirmektedir.

Bu çalışma ile, probiyotik mikroorganizmalardan *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* standart suşları seçilerek, hem gastrointestinal sistem asit ve safra konsantrasyonlarına dirençleri hem de etken patojenleri inhibe etme yeteneklerini ortaya koymak hedeflenmiştir. İnvazyon yoluyla akut gastroenterite neden olan; *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. sonnei* ve *E. coli*'ye karşı etki mekanizmalarını aydınlatmak adına, probiyotik mikroorganizmaların kendi canlı suşları ve canlı mikroorganizma içermeyen süpernatantları kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda, *S. boulardii*'nin asit pH'ta canlı kalabildiği, diğer üç probiyotik mikroorganizmanın pH 3.2 ve daha düşük pH'da canlı kalamadıkları; hepsininde safra konsantrasyonlarına duyarlı olduğu görüldü.

Çalışılan enterik patojenlere *Lactobacil*'lerin süpernatantlarının, probiyotik bakterinin kendisinden daha etkili olduğu ve metabolitleri aracılığı ile etkinin ön planda olduğu tespit edildi. *Lactobacil*'lerin fonksiyonel probiyotik olarak kullanılması için canlı olmaları gerektiği sonucuna varıldı.

Saccharomyces türlerinin özellikle *S. typhi* ve *S. enteritidis*'e karşı inhibitör etkisi görüldü ve canlı mikroorganizmanın, süpernatantlardan daha etkili olduğu tespit edildi. Saccharomyces türlerinin, enterik patojenlere karşı etkin şekilde kullanabilmek için mikroorganizmanın canlı preparatlarına gerek olduğu görüldü.

VIII. YABANCI DİL ÖZETİ

Probiotics can be defined as ‘ microbial cell preparations or components of microbial cell that have a beneficial effect on health and well-being of host’. Many are derived from the intestinal microbiota of healthy humans. The probiotics are used centuries ago as elixir of long life and advocating it for the prevention and treatment of a diverse range of disorders; from acute gastroenteritis to intestinal neoplasia.

In the developing countries gastroenteritis has preventable mortality and morbidity; moreover they are taking place a reason of productive effort and economic loss. It is known that there is a requirement of a treatment with antibiotics in case of invasive agent causing gastroenteritis progressing with dysentery table. New treatment searches are occurred due to inhibiting effects of antibiotics on flora and antibiotic resistance problems.

In this study, by selecting standard species from probiotic microorganisms *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. boulardii* ve *S. cerevisiae*, it was aimed to exhibit the resistance to gastrointestinal system acid and their properties to inhibit the agent pathogens. In order to clarify the action mechanisms against *S. enteritidis*, *S. typhi*, *E. coli*, *S. sonnei* were causing gastroenteritis by invasion pathway, both the viable species of probiotic microorganisms and supernatants not containing a viable microorganism were used.

At the end of the study, it was found that *S. boulardii* was able to tolerate low pH, the other three probiotic microorganisms did not stand alive at pH 3.2 and below it, and all of them are sensitive to bile acid.

It was demonstrated that the supernatants of *Lactobacillus* were more effective against the evaluated enteric pathogens and the effect mediated by metabolites was in the foreground. It was resulted that *Lactobacillus* were not necessary to be alive in order to be used as a functional probiotic.

An inhibitor effect of Saccharomyces species was seen especially to *S. typhi* and *S. enteritidis* and was found that living microorganisms were more effective than supernatants. It was demonstrated that in order Saccharomyces species to be used in an effective way the living preparations of the microorganism were needed.

IX. KAYNAKLAR

1. Vollard EJ, Clasener HAL. Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:409-414.
2. İnanç N, Şahin H, Çiçek B. Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri. Erciyes Tıp Derg 2005; 27:122-127.
3. Salminen S, Isolauri E. Intestinal colonization, microbiota and probiotics. J Pediatr 2006; 149:115-120.
4. Bergonzelli GE, Blum S, Brussow H, Corthesy-Theulaz I. Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? Digestion 2005; 72:57-68.
5. Felley C, Michetti P. Probiotics and *Helicobacter pylori*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 2003; 17:785-791.
6. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. symposium: probiotic bacteria: Implications for Human Health. J Nutr 2000; 130:396-402.
7. Hamilton-Miller JMT. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. Int J Antimicrob Agents 2003; 22:360-366.
8. Saxelin M., Tynkkynen S, Sandholm TM, Vos W. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr Opin Biotechnol. 2005; 16:204-211.
9. Bergonzelli GE, Blum S, Brüssow H, Theulaz IC. Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases. Digestion 2005; 72:57-68.
10. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Appl Environ Microbiol 1998; 64:4573-80.
11. Küçüker MA. Barsak florası ve patojen mikroorganizmalarla etkileşimi. Aktüel Tıp Dergisi 2003; 8:6-8.
12. Vanderhoof A, Rosemary Y. Probiotics in pediatrics. Pediatrics 2002; 109:956-958.
13. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Lancet Infect Dis 2001; 1:101-114.

14. Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002; 32:105-110.
15. Vural T, Çelen E. Probiyotikler. Aktüel Tıp Derg 2003; 8:71-74.
16. Öztürk R. Akut infeksiyöz ishaller. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi 2002:195-224.
17. Winn W, Allen s, Janda W, Koneman E, Procop G. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philedelphia: WW Lippincot, 2006.
18. Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. J Nutr 2004; 134:2022-2026.
19. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic bacteria Gut 1998; 42:2-7.
20. Bjorksten B. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. Allergy 1994; 49:400-7.
21. Bjorksten B. Environmental influence on the development of childhood immunity. Nutr. Rev 1998; 56:106-12.
22. Kılıç S. Probiyotik özelliğindeki laktik asit bakterileri. In: Kılıç S, eds. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 2001:363-423.
23. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int J Antimicrobial Agents 1999; 12:287–292.
24. Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, et al. Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16:1669-75.
25. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek 2002; 82:279–289.
26. Gürsoy Ö, Akalın AS. Antibiyotik kullanımına bağlı diyarenin tedavisinde ve önlenmesinde probiyotikler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2004; 34:131-134.
27. Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. Current Pharmaceutical Design 2002; 8:99-110.

28. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* 2005; 16:204–211.
29. Servin AL. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:405-40.
30. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 2002; 88:39-49.
31. Aiba Y, Suzuki N, Kabir MA, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2097-2101.
32. Messaoudi DM, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Le Moal VL, Servin AL. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6008–6013.
33. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* 2001; 152:167–173.
34. Bengmark S, García de Lorenzo A, Culebras. Use of pro-, pre- and synbiotics in the ICU - future options. *Nutr. Hosp* 2001; 16:239-256.
35. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infections, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:532-62.
36. Murosaki S, Yamamoto Y, Ito K, Inokuchi T, Kusaka H, Ikeda H, Yoshikai Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J Allerg Clin Immunol* 1998; 102:57-64.
37. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Nicuolo F, Vecchio FM, Gasbarrini A, Gasbarrini G. *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004; 69:225-228.
38. Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:521-25.

39. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B y cols.: The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111:334-344.
40. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291:881–4.
41. Buts JP, Bernasconi P, Vaerman JP, Dive C. Stimulation of secretory Ig A and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *S. boulardii*. *Dig Dis Sci* 1990; 35:251-6.
42. Yağcı R. Prebiyotikler ve probiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg* 2002; 45:337-344.
43. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today* 2003; 8:692-700.
44. Ster T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr Res Revs* 2000; 13:229-254.
45. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; 276:941-950.
46. Goldin BR. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Ann Med* 1990; 22:43-48.
47. Parvez S, Malik KA, Kang SA, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J App Microbiol* 2006; 100: 1171-1185.
48. Czerucka D, Patrick R. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection* 2002; 4:733–739.
49. Bergogne BE. Treatment and prevention of AAD. *Int J Antimicrobial Agents* 2000 16:521
50. İşler M. İnflamatuvar barsak hastalığı ve probiyotikler. *Güncel Gastroenteroloji* 2000; 9:134-140.
51. Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbiol Immunol* 2003; 47:405–409.

52. Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Syst Appl Microbiol* 2003; 26:434–437.
53. Gorbach SL. Probiotics in the third millennium. *Digest Liver Dis* 2002; 34:2-7.
54. Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Br J Nutr* 2002; 88:59-66.
55. Erdem B. *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* gastroenteriteleri. *Aktüel Tıp Derg* 2003; 8:9-15.
56. Çullu F. Çocukluk çağında akut ishaller ve antibiyotik tedavisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri* 2002: 59-76.
57. Turgut M. İshalli hastaya yaklaşım. 4. Ulusal Sindirim Yolu İle Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu Tutanaklar 2005; 320-330.
58. Aysev AD. *Shigella* Türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1597-1601.
59. Tülek N. İnflamatuar enteritler. In: Uzun Ö, Ünal S, eds. *Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları*, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınları, 2001:481-493.
60. Badur S. Gastrointestinal sistem ve bağışıklık. *Aktüel Tıp Derg* 2003; 8:1-5.
61. Erdem B. *Salmonella* türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1586-1597.
62. Erdem B. *Enterobacteriaceae*. In: Ustaçelebi Ş, eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 471-515.
63. Töreci K. *Escherichia* türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1564-1574.
64. *Medical Microbiology*. Murray Fifth Edition. <http://pathmicro.med.sc.edu/2006-bacpdf/Enterics06-3738.pdf> adresinden 1 Haziran 2007 tarihinde ulaşılmıştır.
65. Wilke A. Enflamatuar Diyarelerde Patogenez. 4. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını* 2005; 50:36-42.

66. Ertem E. *Shigella* türleri. In: Serter D, Ertem E, Gökengin D, eds. Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 248-252.
67. Gökengin D. *Salmonella typhi* (Tifo) ve Diğer *Salmonella* türleri. In: Serter D, Ertem E, Gökengin D, eds. Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000:239-247.
68. Graman PS, Betts RF. Gastrointestinal ve karın içi enfeksiyonlar. In: Betts RF, Chapman SW, Penn RL, eds. İnfeksiyon hastalıklarına pratik yaklaşımlar. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2005:386-456.
69. Wilke A. Bakteriyel gastroenteritler: Tedavi. Aktüel Tıp Derg 2003; 8:26-29.
70. Akçam ZF, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Akut ishallerimizin güncel tedavi yaklaşımları ışığında irdelenmesi. Türkiye Klinikleri Mikrobiyoloji- İnfeksiyon Dergisi 2004; 3:47-51.
71. Coconnier MH, Lıevın V, Hemery E, Servın AL. Antagonistic Activity Against *Helicobacter* Infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. Appl Environ Microbiol 1998; 64:4573–4580.
72. Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, Nair NG, Mehta AP. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* *in vitro*. J Clin Microbiol 1989; 27:2328–30.
73. Collado MC, Gonz'alez A, Gonz'alez R, Hern'andez M, Ferr'us MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrobial Agents 2005; 25:385–391.
74. Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Me'Graud F, Urdacı MC. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3156–3161.
75. Surawicz CM, Emler GW, Speelman P, Mac Farland LV et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: prospective study. Gastroenterology 1989; 89:981-988.
76. Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I et al. Double-blind report on the efficacy of lactic-acid producing *Enterococcus* SF68 in prevention of antibiotic-

- associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhea. *J Int Med Res* 1989; 17:333-338.
77. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T et al. A human *Lactobacillus* strain (*L. casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991; 88:90-97.
 78. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82:279-289.
 79. Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Grayson ML. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol* 1995; 79:475-479.
 80. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Akut İshalli Çocuklarda Probiyotiklerin kullanımı. *Güncel Tıp* 2005; 13:16-28.
 81. Taranto MP, Perez-Martinez G, Valdez GF. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology* 2006; 157:720-725.
 82. Azcarate-Peril MA, Altermann E, Hoover –Fitzula RL et al. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:5315-22.
 83. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987; 70:1-12.
 84. Azcarate-Peril MA, Altermann E, Hoover–Fitzula RL et al. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:5315-22.
 85. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992; 37:121-128.
 86. Klaenhammer RT, Kulen JM. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol* 1999; 50:45-57.
 87. Binder HJ, Filburn B, Floch M. Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organisms. *Am J Clin Nutri* 1975; 28:119-125.
 88. Sung YJ, Shaffer EA, Costerton JW. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens. *Digestive Diseases and Sciences* 1993; 38:2104-2112.

89. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992; 37:121-128.
90. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb saikat, Black RE. Efficacy of Probiotics in prevention of acute diarrhoea:a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:374-82.
91. Coconier MH, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin A. Antibacterial effect of adhering human *Lactobacillus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1046-1052.