

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN DNA-BİYOKORUYUCU
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ŞEBNEM KURHAN

BOLU, KASIM - 2017

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN DNA-BİYOKORUYUCU
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ŞEBNEM KURHAN

BOLU, KASIM - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şebnem KURHAN tarafından hazırlanan “Endüstriyel Önemi Olan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin DNA-Biyokoruyucu Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda** 13.11.2017 tarihinde **ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü** Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Fadime KIRAN

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI

Sakarya Üniversitesi

Mezuniyet tarihi:

...../...../20....

Prof. Dr. Duran KARAKAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Aileme,

ETİK BEYAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

1. Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 2. Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 3. Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 4. Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 5. Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şebnem KURHAN

ÖZET

ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN DNA-BİYOKORUYUCU ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ŞEBNEM KURHAN

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

BOLU, KASIM - 2017

Bu çalışma kapsamında, gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan ve probiyotik özellik taşıyan yerel *Lactobacillus plantarum* ve referans *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 suşlarının, gıdalara sıklıkla bulaşan kontaminantlar olan aflatoksin B₁ (AFB₁) ve polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) süreye bağlı olarak bağlama özellikleri araştırılmıştır. Bağlama işleminin etkinliği yüksek performanli sıvı kromatografisi (HPLC) ile laktik asit bakterilerinin DNA-biyokoruyucu etkisi ise *in vitro* olarak HT-29 insan kolon adenokarsinoma hücre hattı kullanılarak comet testi ile gösterilmiştir. AFB₁, PAH ve laktik asit bakterilerinin, HT-29 kolon adenokarsinom hücre hattına apoptotik etkileri ise hem akım sitometri hem de akrinin oranj-etidyum bromür ikili boyama yöntemi ile tespit edilmiştir. Araştırma bulgularına göre *L. plantarum* tarafından en yüksek miktarda AFB₁ 12. saatte %75,93±3,42 oranında bağlanmıştır. PAH karışımı içerisinde en kanserojen bileşen olan benzo[a]piren'in (B[a]P) *L. plantarum* tarafından en yüksek miktarda bağlandığı süre ise PAH karışımının etkisizleştirilmesinde optimum süre olarak seçilmiştir. *L. plantarum* tarafından bağlanan B[a]P'nin en yüksek miktara ulaştığı (%100) zaman dilimi, bileşenlerin karıştırıldığı an (0. saat) olarak belirlenmiştir. *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından AFB₁ en yüksek 0. saatte %78,10±7,24'i; PAH karışımı ise yine B[a]P cinsinden en yüksek 0. saatte %100'ünün bağlandığı belirlenmiştir. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 suşlarının tek başlarına HT-29 hücrelerine genotoksik etki göstermediği; AFB₁ ve PAH karışımı tarafından indüklenen genetik hasarı da istatistiksel olarak önemli miktarda önlediği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca, kullanılan toksinlerin ve laktik asit bakterilerinin insan kolon adenokarsinom hücre hattı olan HT-29 hücrelerine apoptotik etkili olduğu, hem lazer taramalı konfokal mikroskopta akrinin oranj-etidyum bromür ikili boyama yöntemi hem de akım sitometrisinde Annexin V-FITC-propidyum iyodür apoptoz testi ile belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, Comet Testi, Apoptoz, Akım Sitometri, Genotoksisite

ABSTRACT

DETERMINATION OF DNA-BIOPROTECTIVE PROPERTIES OF SOME INDUSTRIAL IMPORTANT LACTIC ACID BACTERIA

PHD THESIS

SEBNEM KURHAN

ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
(SUPERVISOR: PROF. DR. IBRAHIM CAKIR)

BOLU, NOVEMBER 2017

In this study, an indigenous *L. plantarum* and the reference *L. rhamnosus* NRRL B-442 strains which have probiotic properties and used as starter culture in the food industry, were subjected to research for their aflatoxin B₁ (AFB₁) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which are typical food contaminants, in terms of time dependant binding properties. The efficacy of binding was determined with high performance liquid chromatography (HPLC). DNA-bioprotective properties of lactic acid bacteria against AFB₁ and PAH's was showed as *in vitro* using HT-29 human colon adenocarcinoma cell line with comet assay. Apoptotic effects of lactic acid bacteria, AFB₁ and PAH's were confirmed both flow cytometer and acridine orange-ethidium bromide dye assay. According to the research findings; the highest retention of AFB₁ by *L. plantarum* was 75,93±3,42% at 12th hour. Due to the most carcinogenic compound of PAH mixture was benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) was specified as indicator compound. So the time for the highest binding of B[*a*]P by *L. plantarum* was chosen for the optimum time. The optimum time for binding B[*a*]P by *L. plantarum* at the rate 100% a was assigned as the beginning of the mixture at 0th hour. Inactivation of AFB₁ by *L. thamnusus* NRRL B-442 was optimum at the time of zero when AFB₁-*L. rhamnosus* were mixed at the rate of 78,10±7,24%; similarly PAH mixture as B[*a*]P was binded 100% at 0th hour. No genotoxic effects were observed in HT-29 cells by *L. plantarum* and *L. rhamnosus* NRRL B-442, but they avoided the genotoxic damage statistically important manner induced by AFB₁ and PAH mixture. Also used toxins and lactic acid bacteria showed apoptotic effect on human colon adenocarcinoma cell line HT-29 and determined by acridine orange-ethidium bromide tandem dye assay using laser scanning confocal microscope and by Annexin V-FITC-propidium iodide apoptosis assay at flow cytometry.

KEYWORDS: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, Comet Assay, Apoptosis, Flow Cytometry, Genotoxicity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	5
2.1 İnsan Mikrobiyotası.....	6
2.2 Laktik Asit Bakterileri	6
2.2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
2.2.2 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12
2.3 Ksenobiyotik Biyotransformasyonu ve Genotoksinler	13
2.3.1 Mikotoksinler.....	15
2.3.1.1 Aflatoksin B ₁	16
2.3.1.2 Aflatoksin B ₁ 'in Detoksifikasyonu	18
2.3.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)	20
2.3.2.1 PAH'ların Detoksifikasyonu.....	21
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin DNA-Biyokoruyucu Özellikleri.....	23
2.5 Hücre Kültürü.....	31
2.5.1 HT-29 ve Caco-2 Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı	32
2.6 Apoptoz	34
2.7 Apoptoz-Kanser İlişkisi.....	35
2.8 Hücre Döngüsü.....	38
2.8.1 Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyaması ile Apoptoz Tespiti	39
2.8.2 Akım Sitometrisi ile Apoptozun Belirlenmesi.....	40
2.9 Comet Testi	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1 Kullanılan Kültürler	46
3.2 Kullanılan Kimyasallar.....	46
3.3 Laktobasil Kültürlerinin Hazırlanması	46
3.4 Genotoksinlerin Hazırlanması	47
3.4.1 Aflatoksin B ₁ 'in Hazırlanması.....	47
3.4.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Karışımının Hazırlanması	48
3.5 Laktik Asit Bakterisi-Genotoksin Ko-İnkübasyonu.....	49

3.6	Laktik Asit Bakterilerinin Genotoksinleri Bağlama Miktarının Belirlenmesi.....	49
3.6.1	Aflatoksin B ₁ 'in Bağlanması	50
3.6.1.1	HPLC Analizi.....	50
3.6.2	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Bağlanması	50
3.6.2.1	HPLC analizi İçin Örneklerin Hazırlanması	51
3.6.2.2	HPLC Analizi.....	51
3.7	Hücre Kültürü.....	52
3.8	Hücre Senkronizasyonu ve Genotoksin Uygulaması	53
3.9	Comet Testi ile Genotoksisitenin Tespiti	53
3.9.1	Örneklerin Hazırlanışı.....	53
3.9.2	Tripan Mavisini ile Canlılık Testi.....	54
3.9.3	Comet Testi.....	55
3.10	Apoptotik Hücrelerin Tespiti için Akridin Turuncusu Boyama Testi	56
3.11	Akım Sitometrisi ile Apoptoz Tespiti	57
3.12	İstatistiksel Değerlendirme.....	58
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1	AFB ₁ ve PAH İçeren Ortamda Laktik Asit Bakterilerinin Zamana Bağlı Hücre Sayısı Değişimi	59
4.2	AFB ₁ 'in laktik asit bakterileri tarafından bağlanma miktarları	61
4.3	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Bağlanması	68
4.4	Apoptoz Testleri	76
4.4.1	Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama	77
4.4.1.1	AFB ₁ 'in Yol Açtığı Apoptoz	77
4.4.1.2	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Yol Açtığı Apoptoz....	86
4.4.2	Akım Sitometri-Apoptoz Testi	93
4.5	Comet Testi	96
4.5.1	Tripan Mavisini Testi.....	97
4.5.2	Comet Testi.....	98
4.5.2.1	AFB ₁ Genotoksisite Sonuçları	100
4.5.2.2	PAH Genotoksisite Sonuçları	102
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	105
6.	KAYNAKLAR.....	108
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	129

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Farklı etmenlerin oluşturduğu DNA hasarı ve bu hasara göre hücrenin durumu.....	3
Şekil 2.1. Sağlıklı ve apoptotik hücreler.....	40
Şekil 4.1. <i>L. plantarum</i> ile AFB ₁ ko-inkübasyonunda zamana bağlı AFB ₁ konsantrasyonu % azalış miktarı.....	62
Şekil 4.2. <i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442 ile AFB ₁ ko-inkübasyonunda zamana bağlı AFB ₁ konsantrasyonu % azalış miktarı.....	62
Şekil 4.3. Bağlanan AFB ₁ 'e ait kromatogram (0. saat)	65
Şekil 4.4. Bağlanan AFB ₁ 'e ait kromatogram (12. saat).....	66
Şekil 4.5. Onaltı Bileşenden oluşan PAH karışımına ait kromatogram.....	68
Şekil 4.6. Laktik asit bakterileri tarafından bağlanan PAH karışımına ait 0. saat kromatogramı.....	69
Şekil 4.7. <i>L. plantarum</i> ile PAH karışımı ko-inkübasyonunda zamana bağlı bileşenlerin % bağlanma oranı.....	70
Şekil 4.8. <i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442 ile PAH karışımı ko-inkübasyonunda zamana bağlı bileşenlerin % bağlanma oranı.....	73
Şekil 4.9. Negatif kontrol (PBS).....	78
Şekil 4.10. AFB ₁ (100 µM) uygulanan HT-29 hücreleri.....	79
Şekil 4.11. <i>L. plantarum</i> uygulanan HT-29 hücreleri.....	82
Şekil 4.12. <i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442 uygulanan HT-29 hücreleri.....	83
Şekil 4.13. <i>L. plantarum</i> +AFB ₁ karışımı uygulanan HT-29 hücreleri.....	85
Şekil 4.14. <i>L. rhamnosus</i> +AFB ₁ karışımı uygulanan HT-29 hücreleri.....	86
Şekil 4.15. Negatif kontrol (PBS içinde %0,5 DMSO).....	87
Şekil 4.16. PAH (0,250 ppm) uygulanan HT-29 hücreleri.....	88
Şekil 4.17. <i>L. plantarum</i> uygulanan HT-29 hücreleri.....	89
Şekil 4.18. <i>L. rhamnosus</i> uygulanan HT-29 hücreleri.....	90
Şekil 4.19. <i>L. plantarum</i> +PAH karışımı uygulanmış HT-29 hücreleri.....	91
Şekil 4.20. <i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442+PAH karışımı uygulanan HT-29 hücreleri.....	92
Şekil 4.21. Kontrol, AFB ₁ ve PAH uygulanan HT-29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları.....	94
Şekil 4.22. <i>L. plantarum</i> , <i>L. plantarum</i> +AFB ₁ ve <i>L. plantarum</i> +PAH uygulanan HT- 29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları.....	94
Şekil 4.23. <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. rhamnosus</i> +AFB ₁ , <i>L. rhamnosus</i> +PAH uygulanan HT- 29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları.....	95
Şekil 4.24. Comet testi öncesi HT-29 hücrelerinin tripan mavisi testi canlılık yüzdeleri.....	97
Şekil 4.25. Genotoksin uygulaması sonucu elde edilen comet skorları.....	99

Şekil 4.26. AFB ₁ , AFB ₁ +laktik asit bakterisi ve PBS'e ait comet testi görüntüleri.....	100
Şekil 4.27. PAH, PAH+laktik asit bakterisi ve negatif kontrole ait comet testi sonuçları.....	102
Şekil 4.28. Yalnızca laktik asit bakterilerinin uygulandığı comet testi görselleri.....	103



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Antigenotoksik özelliği araştırılan bakteri ve mayalar.....	30
Çizelge 2.2. Laktik asit bakterilerinin çeşitli kanser hücre hatları üzerine etki mekanizmaları.....	42
Çizelge 3.1. Gradiyent program.....	52
Çizelge 4.1. Genotoksin-laktobasil ko-inkübasyonu süresince <i>L. plantarum</i> ve <i>L. rhamnosus</i> canlı hücre sayısı değişimi.....	59
Çizelge 4.2. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. rhamnosus</i> 'un zamana bağlı AFB ₁ bağlama miktarları.....	63
Çizelge 4.3. Kromatogramda görülen PAH bileşenlerinin isimleri.....	69
Çizelge 4.4. <i>L. plantarum</i> 'un zamana bağlı olarak PAH bileşenlerini bağlama miktarı.....	71
Çizelge 4.5. <i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442'nin zamana bağlı PAH bileşenlerini bağlama miktarı.....	74
Çizelge 4.6. Comet testi skorları.....	98

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

4-NQO	: 4-Nitrokinolin
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AFM₁	: Aflatoksin M ₁
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
ATP	: Adenozin Trifostat
CAD	: Kaspaz Tarafından Etkinleştirilen DNAz (Caspase Activated DNAse)
Casp	: Kaspaz
cdk-2	: Siklin-Bağımlı Kinaz-2 (Cyclin-dependant kinase 2)
CYP	: Sitokrom P
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FLD	: Floresans Dedektör
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LMA	: Düşük Erime Noktalı Agaroz
MNNG	: N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-Guanidine
MUC2	: Mukus 2 Geni
NHGRI	: Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health)
Ota	: Okratoksin Alfa
p21	: Protein 21
p53	: Protein 53

PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (Phosphate Buffer Saline)
PDA	: Foto Diyot Dizilim
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
α-ZOL	: Alfa Zearalenol



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her an bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a, tez çalışmalarım sırasında yönlendirmeleri ile bu çalışmaya katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyeleri Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a ve Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya, hücre kültürü çalışmalarının başlangıcında bilgi birikimleri ve laboratuvar olanakları ile destek olan ve bu konuda yol kat etmemi sağlayan Dr. M. Zeynep YAVUZ ve Arş. Gör. Ezgi BOZKURT'a, comet testi için çok büyük katkıda bulunan Pelin ERTÜRK ARI'ya

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan Arş. Gör. Derya ATALAY'a, mesai arkadaşım Uzm. Dr. Melike Büşra BAYRAMOĞLU KARŞI'ya, aynı laboratuvarında çalıştığım ve hep desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Uzm. İsmail İŞÇİ'ye ve Pınar YALÇINKAYA'ya

Bugüne gelmemi sağlayan, her yaptığım ile arkamda olan, desteklerini bir gün bile esirgemeyen, karşılaştığım her olumsuzlukta derdime derman olan, maddi ve manevi tüm olanaklarını önüme sunan, düştüğümde kaldıran ve güç veren canım ailem; annem, babam ve kardeşime,

Sedat'a,

Bu tez çalışmasını 2015.09.04.843 numaralı proje ile destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve çalışanlarına,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Şebnem KURHAN

Kasım 2017, Bolu

1. GİRİŞ

Genetik toksisite, fiziksel ve kimyasal ajanların kromozom ve DNA yapısında meydana getirdiği hasara verilen isimdir (Kramer 1998, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemezse; sekans değişiklikleri, kromozom anomalileri, bir veya birden fazla nükleotid değişikliğinden kaynaklanan rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşmaktadır (Kramer 1998).

Genotoksisite, sıklıkla mutajenite ile karıştırılan bir kavramdır. Mutajenler, DNA yapısını veya dizisini değiştirebilen, mutasyona neden olan fiziksel ya da kimyasal maddelerdir. Kansere neden olan maddeler ise kanserojen olarak adlandırılır ve bunlar da mutajen grup içerisinde yer alır. Tüm mutajenler genotoksik olduğu halde, tüm genotoksik maddeler mutajen değildir. Bunun nedeni, maruz kalınan genotoksinin yol açtığı hasarın, DNA tamir mekanizması veya apoptoz yoluyla mutasyon oluşmadan tamir edilebilmesidir (Wikipedia, 2015).

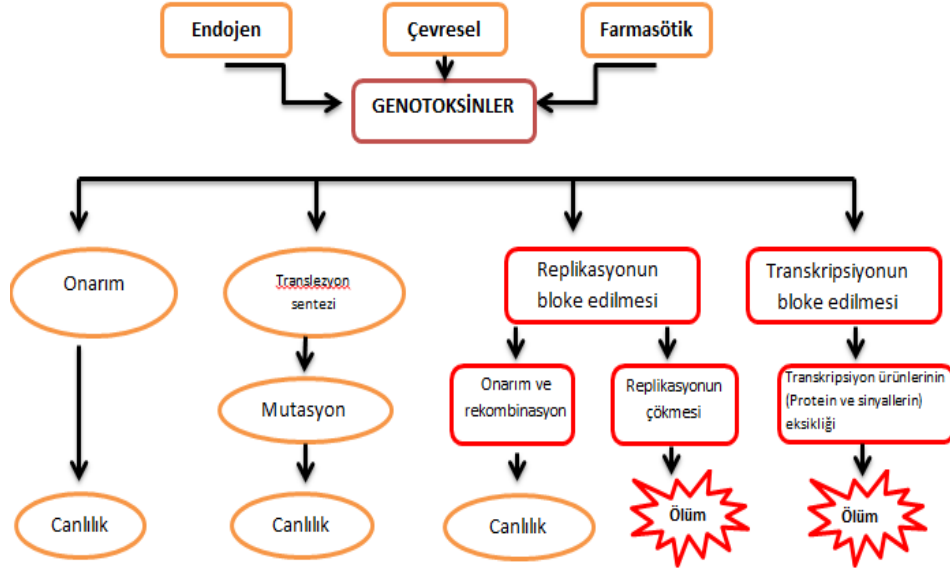
Endojen metabolitler, çevresel ve beslenme kaynaklı kanserojenler, bazı anti-inflamatuvar ilaçlar ve genotoksik kanser ilaçları; oldukça kırılgan yapıdaki DNA'nın hasar görmesine yol açmaktadır (Roos vd., 2016). Yapılan çalışmalar tümörlerin büyük çoğunluğunun beslenme alışkanlıklarından kaynaklandığını göstermektedir. Geçmişten günümüze insan beslenmesinde mikotoksinler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), ağır metaller ve nitrozaminler gibi birçok kanserojen madde yer almaktadır ve bu maddelerin bazıları çevresel kontaminasyon, bazıları ise pişirme sırasında oluşan maddelerdir (Hernandez-Mendoza vd., 2009; Zhao vd., 2013). Sigara içmeyen bir yetişkinin maruz kaldığı PAH'ların %96,2'si gıda, %1,6'sı hava, %0,2'si su ve %0,4'ünün toprak kaynaklı olduğu belirtilmektedir (WHO, 2000). Bu durumda gıdaların yalnızca besleyici olması yeterli olmamaktadır. Besleyiciliğin yanı sıra maruz kalınan toksinlerden koruyucu faktörlerin de alınması gerekmektedir (Pool-Zobel vd., 1993).

Gıdalarda sıklıkla bulunan genotoksik bileşikler; (i) mikotoksinler ve bitki glikozidleri (birincil gıda mutajenleri), (ii) PAH'lar ve aromatik heterosiklik aminler

(ikincil gıda mutajenleri) (iii) ikincil safra asitleri ve nitrozaminler (endojen bileşikler) olarak sınıflandırılabilir (Corsetti vd., 2008). Gıdaya kontamine olan veya yapısında bulunan bu genotoksinlerin yanı sıra işlenmiş ürünlerde, üretim esnasında bileşime ilave edilen katkı maddelerinin kendisi (nitrit vb.) doğrudan ya da reaksiyon sonucu oluşturduğu bileşikler de (nitrozamin) genotoksik özellik taşımaktadır (Zengin vd., 2011).

Somatik hücre mutasyon teorisinde, kansere mutasyonların neden olabileceği ifade edilmektedir. Günümüz moleküler kanser genetik çalışmalarında ise, kansere onkogenlerde ve anti-onkogenlerde (tümör baskılayıcı genler) meydana gelen mutasyonların neden olduğu belirtilmektedir (Kramer, 1998). p53, diğer ismiyle tümör protein 53; 17. kromozomda kodlanmış, hücre döngüsünü düzenleyen ve tümör oluşumunun durdurulmasını sağlayan, tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörüdür (Wikipedia, 2017; NCBI, 1998). Tüm insan kanser vakalarının %50'den fazlasında p53 geninin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir (Elmore 2007; Liu ve Bodmer, 2006). Bu genin en önemli fonksiyonu; farklı türlerdeki DNA hasarlarında hasarın ciddiyetine göre hücre döngüsünü G1 veya G2 fazında tutuklamak ve hasarın önemli olduğu durumlarda ise hücreyi apoptoza yönlendirmektir (Liu ve Bodmer 2006).

Kramer'e (1998) göre, anti-onkogenler ve onkogenlerde meydana gelen mutasyonlara endojen ve ekzojen kaynaklar neden olmaktadır. DNA'yı etkileyen ekzojen etmenler; iyonize radyasyon (X-, γ - ya da kozmik ışınlar), radon bozunması ile açığa çıkan α -parçacıkları, yükseltgeyici kimyasallar ve UV-A güneş ışığı iken, endojen etmenler ise hücreler arası haberleşme ve metabolik süreç aracılığıyla gerçekleşmektedir (Kryston vd., 2011). Birçok laboratuvar çalışmasında bu hasarlar yapay olarak oluşturulmaktadır. Ancak hücre döngüsünde herhangi bir aşamada da; -dinlenme evresi, DNA replikasyonu, kardeş kromatidlerin dizilimi- bu spontan çift zincir kırıkları oluşabilmektedir (Pfeiffer vd., 2000). Hücrenin maruz kaldığı genotoksinler ve bu maruziyete bağlı olarak oluşan hücre davranışı Şekil 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Farklı etmenlerin oluşturduğu DNA hasarı ve bu hasara göre hücrenin durumu (Roos vd., 2016)

Günümüzde görülme sıklığı artan kanser türlerinden kolorektal kanserlerin %5-10'unun kalıtsal kökenli olduğu ifade edilmektedir. Geri kalan kısım, beslenme alışkanlıkları ile doğrudan ilişkilidir. Uygulanan diyet, yüksek kalorili beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı, hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadır (dos Reis vd., 2017)

Bir insan vücudu dünyada yaşayan tüm insanların sayısından daha fazla bakteriye sahiptir. Bağırsakta bulunan baskın türler *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* ve *Bifidobacterium* olduğu belirtilmektedir. İkincil grup ise *Escherichia coli*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* türlerinden oluşmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasında yer alan bu bakteriler; patojenler ve faydalı olanlar olarak sınıflandırılabilirler (Vinderola ve Ritieni, 2014).

Anaerob bakteriler, bağırsak kanserlerinin önemli nedenlerindendir. Bu bakteriler ürettikleri enzimler ile pro-kanserojenleri aktif kanserojenlere dönüştürerek veya mukolitik aktivite gibi risk etmenleri oluşturarak bağırsak kanserlerine yol açmaktadırlar. Diğer taraftan laktik asit bakterileri ve probiyotikler de bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek konakçı bağışıklık sistemini kanserojenlere karşı

güçlendirmektedirler (Cenci vd., 2002). Sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri sağlığın korunmasına katkı sağlamaktadır (Vinderola ve Ritieni, 2014).

Çalışmalar incelendiğinde laktik asit bakterileri ve basillusların biyolojik olarak aktif bir şekilde gıda kaynaklı bir çok mutajeni (heterosiklik aromatik aminler, protein pirolizatlari, nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve mikotoksinler) ve bunların yanı sıra DNA'ya etki eden nitroarenler ile alkilleyici ajanları etkisiz hale getirebildikleri belirtilmektedir (Caldini vd., 2005; Cenci vd., 2008; Corsetti vd., 2008; Tavan vd., 2002; Trotta vd., 2012).

Bu çalışma kapsamında, sıklıkla maruz kalınan genotoksinler olan aflatoksin B₁ ve polisiklik aromatik hidrokarbonların; hem ticari probiyotik ürünlerde hem doğal fermentasyon ile üretilen gıda maddelerinde yaygın olarak bulunan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus* NRRL-B 442 türleri tarafından uzaklaştırılma miktarları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiş; bu uzaklaştırmanın DNA biyokoruyucu özelliği ise comet testi ile gösterilmiştir. Hem kullanılan genotoksinlerin hem de laktik asit bakterilerinin insan kolon adenokarsinoma hücresi olan HT-29 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri ise hem lazer taramalı konfokal mikroskop (etidyum bromür-akridin oranj ikili boyama yöntemi) hem akım sitometrisi ile tespit edilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Kolon kanseri 90'lı yıllarda sanayileşmiş Batı ülkelerinde en sık görülen ikinci kanser çeşidi iken (Wollowski vd., 1998), günümüzde, bu ülkelerde kolon kanseri görülme sıklığı yine yüksek olmakla birlikte üçüncü sıraya gerilemiştir (dos Reis vd., 2017). Özellikle Batı toplumlarında yaygın olan kolon kanseri, son yıllarda “modern beslenme” olarak adlandırılan; protein ağırlıklı beslenme, alkol tüketimi ve fiziksel aktivitelerin oldukça sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır (Hirayama ve Rafter, 2000; Radhakrishnan vd., 2016; Kuppusamy vd., 2014).

İnsan bağırsak mikrobiyotası kolorektal kanserlerinin gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Bu risk faktörleri probiyotiklerin tüketilmesi ile azalmakta ve bu kanser tipinin görülme sıklığının düşmesini sağlamaktadır (dos Reis vd., 2017).

İnsanlar beslenme ve çevresel koşullar nedeniyle mikotoksinler, PAH'lar, *n*-nitrozo bileşenleri ile akrilamid gibi genotoksinlere maruz kalmaktadırlar (Kurhan ve Cakir 2016; Raman vd., 2013). Pre-klinik ve klinik çalışmalarda belirlenmiş bu bileşenler kolorektal, meme ve prostat kanserlerine neden olan gıda kanserojenleridir (Raman vd., 2013). Protein bakımından zengin gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan heterosiklik aminler grubunda, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine en yüksek mutajeniteye sahip olanıdır (Hirayama ve Rafter, 2000). Gıdaların işlenmesi (kurutma, tütsüleme vb.), ızgara, yağda ve fırında kızartılması PAH'ların temel kaynağı olup (Science Committee on Food, 2002), hava kirliliği ve sanayi bölgelerinde yaşama ise PAH'lar bakımından çevresel kontaminasyonlar arasında yer almaktadır (Plaza-Bolaños vd., 2010). Düzenli olarak yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş gıdaların tüketilmesi ile kolorektal kanserlerin görülme sıklığı arasında ise güçlü korelasyon bulunmaktadır (Raman vd., 2013). Gıdaların hatalı depolanması, iklimsel değişiklikler, özellikle ürünün işleme aşamasında ve depolanmasında, gıda ve yemlerde mikotoksinlerin kaynağını oluşturmaktadırlar (Tunail, 2000).

2.1 İnsan Mikrobiyotası

İnsan vücudu, sahip olduğu hücre sayısından en az 10 kat daha fazla bakteriye (10^{14}) ev sahipliği yapmaktadır. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu kalın bağırsakta olmak üzere gastrointestinal sistemde bulunmaktadır (NIH HMP Working Group vd., 2009; Hair ve Sharpe, 2014). İnsan mikrobiyomu ilk olarak Lederberg (2001) tarafından “Vücut boşluğunda yaşayan, sağlık ve hastalık bakımından belirteç olarak kabul edilmeyen komensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizma ekolojik topluluğu” şeklinde tanımlanmıştır (Hemarajata ve Versalovic 2013). Bir diğer deyişle mikrobiyom; insan vücudunda bulunan canlı tüm mikroorganizmaların (bakteri, fungi, protozoa ve virüsler) genetik materyalleridir (Hair ve Sharpe 2014). Bu kapsamda yapılan mikrobiyolojik çalışmalar genellikle “hastalığa yol açanlar” üzerinde yoğunlaşmıştır (NIH HMP Working Group vd., 2009). İnsan genom projesinin tamamlanmasının ardından Relman ve Falkow (2001), ikinci genom projesi olarak adlandırdıkları; ağız, bağırsak sistemi, vajina ve deride kolonize olmuş mikroorganizmaların, mikrobiyal gen ve genomlarının kapsamlı bir şekilde belirlenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Bu kapsamda 2008 yılında, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) alt birimi Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü (NHGRI) insan mikrobiyom projesi (Human Microbiome Project, HMP) çalışma grubu oluşturulmuştur (Hair ve Sharp 2014, NIH HMP Working Group vd., 2009). İnsan mikrobiyomunun populasyon, genotip, hastalık, yaş, beslenme, ilaç kullanımı ve çevre koşullarına göre gösterdiği çeşitlilik ile hastalıklara etkisinin belirlenmesinde hem standart verilerin eldesi hem de bilimsel birikime katkı sağlamak üzere teknolojik gelişmelerin sağlanması hedeflenmiştir.

2.2 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri çoğunluğu uzun, kısa çubuk veya kok formunda, tamamı Gram-pozitif, çoğunluğu mikroaerofilik fakat mutlak anaerobları da bulunduran, katalaz negatif ve sitokrom içermeyen mikroorganizma topluluğudur (Çakmakçı vd., 2011). *Sporolactobacillus inulinus* hariç hiçbiri spor oluşturmaz. *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* türleri laktik asit bakterileri olarak tanımlanmaktadır

(Adams ve Marteau, 1995; Tunail 2009). *Bifidobacterium* türleri ise her ne kadar filogenetik olarak bu türlerden bağımsız olsalar da biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik olarak benzerliklerinden dolayı laktik asit bakterileri olarak kabul edilmektedir (Adams ve Marteau, 1995).

Laktik asit bakterileri glikoz katabolizmaları sonucu baskın ürün olarak laktik asit üretmeleri ile bilinen mikroorganizmalardır (König vd., 2009). Hekzos fermentasyonları sonucunda %90'ın üzerinde laktik asit oluşturan grup homofermentatif laktik asit bakterileri; laktik asidin yanında (%50) etil alkol ve/veya asetat ile CO₂ de oluşuyorsa heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmektedir (Tunail 2009).

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde oldukça fazla kullanım alanı bulmaktadır. Bunun yanı sıra sağlıklı bir insan bağırsak mikrobiyotasının da doğal üyeleridirler (Coconnier vd., 1997). *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* ve *L. salivarius* ağızdan rektuma kadar tüm mukozada yaygın olarak bulunan türlerdir. Gıdalarda, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* daha çok süt ürünleri ile ilişkiliyken; *L. plantarum* daha çok bitki orijinli fermente gıda ürünlerinde bulunmaktadır (Molin 2001).

Süt dışındaki bitki kökenli salamura zeytin, sauerkraut ve turşu gibi geleneksel birçok fermente ürün fazla sayıda laktik asit bakterisi taşımasına rağmen, bu ürünler nadiren probiyotik bakteri içerirler (Cebeci ve Gürakan 2003). Avrupa Birliği tarafından desteklenen proje kapsamında, 5 ülke ortaklığında yürütülen probiyotik zeytin projesi kapsamında (Probiolives), 597 laktik asit bakterisi suşu taranmış ve probiyotik özelliğe sahip *L. pentosus* ve *L. plantarum* suşları ile deneme ölçeğinden, büyük ölçekli üretime geçilmiştir ve probiyotik zeytin üretiminde başarı sağlanmıştır (Tassou, 2014). Bir diğer geleneksel, bitkisel fermente ürün olan ekşi hamur, tüketimden önce pişirildiği için laktobasiller canlılıklarını yitirmektedirler (Molin, 2001). Ancak yapılan çalışmalarla, ölü laktik asit bakterilerinin de önem arzettiği bilinmektedir (Haskard vd., 2000).

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar (WHO, 2000). Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri, sindirim sistemi boyunca farklı

ortam koşullarına dayanım sağlayarak canlılıklarını koruyabilmeleridir. pH değerinin zaman zaman 1,5 seviyesine düştüğü mide ortamında ve safra tuzlarının varlığında canlı kalmalıdır (Cebeci ve Gürakan, 2003).

Probiyotik türler içinde yer alan laktobasil ve bifidobakterler, gıda ile ilişkili ve güvenli olarak kabul edilen türlerdir. Memeli mikrobiyotasında da bu bakteriler komensal olarak bulunmaktadır. (Adams ve Marteau, 1995). Son zamanlarda probiyotik mikroorganizmalar arasına, *Enterococcus* ve algler de katılmıştır (Riaz Rajoka vd., 2017). Fakat enterokoklar, tıpkı diğer laktik asit bakterileri gibi, insan mikrobiyotasında bulunan komensal bakteriler olmalarına ve gıdalardan sıklıkla izole edilebilmelerine rağmen insanlarda sıklıkla enfeksiyon vakalarına yol açmaktadır (Adams ve Marteau, 1995). Bifidobakterler tarafından oluşturulan hiçbir enfeksiyon raporu bulunmazken, *Enterococcus* türleri ise hastane (nosokomial) enfeksiyonlarına neden olmaları ve vankomisine direnç göstermeleri nedeniyle dikkat edilmesi gereken türler olduğu bildirilmektedir (FAO/WHO, 2002).

Probiyotik bakteriler, bağırsak epitellerine tutunarak, ürettikleri antimikrobiyal maddeler (bakteriyosin) ve metabolik bileşenler ile diğer mikroorganizmaların gelişimini baskırlar (Cebeci ve Gürakan, 2003; Hemarajata ve Versalovic, 2013). Ayrıca, intestinal mukozadaki reseptör ve bağlanma bölgeleri için diğer intestinal mikroorganizmalarla rekabet halindedirler (Hemarajata ve Versalovic, 2013).

Bağırsak mikrobiyotası ve epitel hücreler aktif etkileşim halindedir (Zhu vd., 2011). Yapılan birçok çalışmada bağırsak mikrobiyotasının, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde alternatif olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. Komensal bakteriler, bağırsak epitellerinin gelişimini teşvik ederek, besinlerin daha kolay sindirilmesini ve inflamasyona karşı korunmasını sağlamaktadır (Yan vd., 2007). Probiyotiklerin en iyi bilinen faydası; antibiyotik kullanımı nedeniyle bozulan mikrobiyotayı yeniden düzenleme özellikleridir (Gamallat vd. 2016). Probiyotikler, inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisi için de alternatif ve güvenli bir tedavi yöntemi olup (Chiu vd., 2010), bazıları patojen mikroorganizmaların bağlanmalarına karşı, ortamda rekabet oluşturarak patojenlerin invazyonunu önlemektedir (Zhu vd., 2011). Probiyotikler, bağırsak mukozasında bağışıklık sistemini kontrol eden protein grubu olan sitokinler ve immünoglobulin A salgılanmasını teşvik ederek, hücre

ortamını pro-inflamatuar konumundan, anti-inflamatuar duruma dönüştürerek gastrointestinal bağışıklığı düzenlemekte (Contreras-Govea vd., 2013; Ducrotté vd., 2012) ve bariyer fonksiyonunun sürekliliğini sağlamaktadır (Yan vd., 2007). Probiyotikler ayrıca sindirilemeyen karbonhidratları, kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürerek kolonositler için besin oluşturmakta ve bağırsak hareketini düzenlemektedir (Ducrotté vd., 2012). Kısa zincirli yağ asitlerden olan sodyum bütiratın; kolon kanser hücrelerinin gelişimini kısıtlayıp, fenotip farklılaşmasını ve apoptozu tetikleyerek kansere yol açan risk faktörlerini azalttığı bildirilmiştir (Longoria-garcía vd., 2016).

Probiyotiklerin bu faydaları türe ve hatta bazen suşa özel olabilmektedir (So vd., 2017). Son yıllarda özellikle probiyotik laktobasiller üzerine yoğunlaşan çalışmalar; bu gruptaki bakterilerin ülseratif kolit, inflamatuvar bağırsak hastalığı ile kolon kanserine karşı koruyucu etkileri olduğu ve hatta ileri safha kolon kanserlerinde metastazın önlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Escamilla vd., 2012; Yan vd., 2007). Tümör hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan probiyotik mikroorganizmaların anti-proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. Probiyotiklerin bu etkilerinin, hücre yüzeylerine tutunma özellikleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Zhu vd., 2011). *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis* ve *B. breven*'in kolonda tümör görülme sıklığını düşürdüğü belirtilmektedir (Sadeghi-Aliabadi vd., 2014).

Laktik asit bakterileri veya ürettikleri çözünür bileşenler, kültür ortamında tümör hücrelerini doğrudan etkileyerek çoğalmalarını inhibe etmektedir (Hirayama ve Rafter, 2000). Chen vd. (2017) tarafından da *Lactobacillus*'ların kolorektal kanser hücrelerinin gelişimini engelleyici etkisi; tümör oluşumunu teşvik eden enzimlerinin aktivitelerini düşürmeleri, mutajenleri bağlama, kısa zincirli yağ asitlerinin sentezi ile ortam pH'sını düşürmeleri yoluyla olduğu belirtilmektedir. Ayrıca laktobasiller nitrat ve nitriti kullanarak oluşturdukları nitrik oksit (NO), bağışıklığı düzenleme özelliği de olan iyi bir antibakteriyeldir. Üretilen NO, kanser hücresinin hem DNA'sına zarar vererek hücre ölümüne yol açmakta hem de apoptozu tetikleme işlevini görmektedir. Probiyotikler, pH düşüşüne neden oldukları için *E. coli* ve *Clostridia* grubuna ait bakterilerin gelişimini inhibe ederek, pro-kanserojenlerin kanserojen maddelere

dönüşümüne neden olan β -glukoronidaz gibi bakteriyel enzimlerin miktarını azaltmaktadır (Longoria-garcia vd., 2016).

Farklı laktobasiller ile yapılan çalışmada, *Lactobacillus* süpernatant ve hücrelerinin; HT-29 hücre membranına verdiği hasar ölçülmüş ve düşük sayıda bakteri içeren kültürlerin daha uzun sürede zarara yol açtığı; yüksek sayıda bakteri içeren kültürlerin ise hücre membranında daha hızlı hasar oluşmasına neden olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 2017). Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakterilerden bazılarının ileri safha kanserde metastazın önüne geçebilme etkisinin araştırıldığı çalışmada ise metastatik kolon kanser hücresine (HCT-116) *L. casei*, *L. rhamnosus* GG ve bağırsak komensal bakterilerinden biri olan *Bacteroides thetaiotaomicron*'un hücresiz süpernatantları uygulanmıştır. Her iki laktobasil türünün hücresiz süpernatantlarının kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı, fakat *Bacteroides thetaiotaomicron*'un hücresiz süpernatantının kanser hücrelerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Escamilla vd., 2012).

2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, gıda endüstrisinde oldukça farklı alanlarda hem starter kültür hem de probiyotik olarak kullanılan çubuk şeklindeki Gram-pozitif bir laktik asit bakterisidir (Arena vd., 2016). İnsan ve diğer memeli hayvanların gastrointestinal sistemlerinde, tükürük ve çeşitli besinlerde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır (Slonczewski, 2013). Süt ürünleri ve çevreden kolaylıkla izole edilebilen bu bakteri türü ayrıca silaj, sauerkraut, fermente sebzeler, ekşi hamur, inek gübresi, insan ağız-bağırsak mikrobiyotası ile dışkılarından ve kanalizasyon sularından da elde edilebilmektedir (Vos vd., 2011). *L. plantarum* hem Embden-Meyerhoff-Parnas hem de fosfoketolaz metabolik yolu enzimlerine sahip olduğundan, homolaktik ve heterolaktik fermentasyon gerçekleştirebilir. Oksijensiz ortamda, *L. plantarum* homolaktik fermentasyon ile kullandığı karbon kaynağını, laktat dehidrogenaz enzimi ile D- ve L-laktata ve alkollere dönüştürmektedir. Aerobik koşullarda ise laktat, asetata dönüştürmekte; laktat dehidrogenaz, piruvat oksidaz ve asetat kinaz aracılığıyla ise 1 ATP oluşturmaktadır. Bu metabolik süreçte asetatın yanı sıra hidrojen peroksit ve karbondioksit gibi yan ürünler de oluşmaktadır

(Slonczewski, 2013). Ürettiği organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil ile bakteriyosin ve antimikrobiyal peptitler, *L. plantarum*'un oldukça farklı alanlarda kullanılabilmesini sağlamaktadır (Arena vd., 2016).

L. plantarum bitki kökenli ürünlerin fermentasyonunda önemli bir türdür. (Cebeci ve Gürakan 2003). Turşu ve zeytin üretiminde, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* ve *L. plantarum*, oluşan asitlikten sorumlu temel mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Daeschel vd., 1987).

L. plantarum, kolay gelişme özellikleri ve insan orijinli olmaları nedeniyle sağlık alanında pek çok araştırmaya konu olmuştur. İnsan kalınbağırsağı, *E. coli* için temel ekolojik niş konumundadır. Bağırsak epitellerine tutunması, *E. coli* mannoz-duyarlı adhezin Tip 1 yoluyla gerçekleşmektedir (Friman vd., 1996). *L. plantarum* da benzer şekilde, mannoz-spesifik adezyon yoluyla gastrointestinal sistemde epitellere tutunmaktadır (Slonczewski, 2013). Bu nedenle *L. plantarum* ve *E. coli* rekabetinde öngörülen muhtemel mekanizmalardan biri mannoz spesifik bağlanma bölgelerinde yaşanan yarıştan kaynaklandığı yönündedir. Bir diğer yaklaşım da *in vitro* çalışmada elde edilen sonuca göre; HT-29 hücrelerinde MUC2 ve MUC3 genlerinin ekspresyonunun indüklenmesi ve artan musin üretimi ile *E. coli* adezyonunun önlenmesi şeklinde açıklanmaktadır (Johansson vd., 1998; Mack vd., 1999). Yapılan çalışmada, musinin salgılanması, ortama ilave edilen hücresiz *L. plantarum* 299v süpernatantının ilave edilmesi ile indüklenmiştir (Johansson vd., 1998; Mack vd., 1999; de Vries vd., 2006). Son zamanlarda yapılan bir diğer çalışmada, yine aynı suşun (*L. plantarum* 299v) goblet hücrelerinde MUC2 ve MUC3 transkripsiyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Ducrotté vd., 2012).

L. plantarum, anti-tümör, anti-koagulan, anti-viral, bağışıklık düzenleyici, anti-inflamatuar, anti-diabetik ve serbest radikalleri uzaklaştırma gibi birçok biyolojik aktivite sergilemektedir. Çalışmalar, farklı türlerdeki laktobasillerin, anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-12 ve IL-10) üretimini arttırdığını göstermektedir (Song vd., 2015).

Yüksek miktarda tüketilen canlı *L. plantarum* hücreleri, sağlıklı deneklerde önemli değişimlerin görülmesini sağlamıştır. Günlük tüketilen *L. plantarum* 299v suşunun 3 hafta boyunca feçeste bulunan karboksilik, asetik ve propiyonik asit

miktarlarında önemli artışa; kolonda bulunan anaerobik florada (~4 kat) ve Gram-negatif anaerobik bakteri sayısında da önemli azalışa (~2 log) yol açtığı belirlenmiştir (Johansson vd., 1998). Gram-negatif anaerobik bakterilerin sayısındaki azalma; tıbbi açıdan bakıldığında, bu bakterilerin genellikle bağırsak ameliyatlarının ardından enfekte bölgelerden izole edilmeleri nedeniyle önem arz etmektedir (de Vries vd., 2006).

Bir diğer çalışmada, bebek feçesinden izole edilen, düşük pH değerlerinde canlılığını koruyabilen *L. plantarum* L67 suşundan izole edilen proteinin, kolon adenokarsinom hücresi olan HT-29 hücrelerinde programlı hücre ölümü olan apoptoza yol açıp açmadığı araştırılmıştır. Sıcaklık uygulaması ile inaktive edilmiş ya da canlı *L. plantarum*, HT-29 hücreleri ile birlikte inkübe edildiklerinde; inaktif *L. plantarum* L67'nin HT-29 hücrelerine sitotoksik etki yaptığı; ancak canlı hücrelerin sitotoksik etki yaratmadığı tespit edilmiştir. Bu duruma, sıcaklık uygulaması ile üç boyutlu yapısı bozulan proteinin hücre membranı üzerinde yer alan reseptör ile interaksyona girmesinin yol açtığı; böylece protein-reseptör interaksyonu sonucu apoptoz yolağının aktifleştiği belirtilmektedir (Song vd., 2015).

2.2.2 *Lactobacillus rhamnosus*

L. casei subsp. *rhamnosus* bilinen adıyla *L. rhamnosus*, ramnoz ile ilişkilendirilen, Gram-pozitif, hareketsiz çubuk şeklinde (0,8-1,0 x 2,0-4,0 µm), tek tek ya da zincir halinde bulunabilen laktik asit bakterisidir. Süt ürünleri, kanalizasyon atık suları, insan ve klinik kaynaklı olabilmektedirler (Vos vd., 2011).

L. rhamnosus ve suşları, anti-genotoksik ve anti-kanserojen etkileri en sık çalışılan probiyotik laktik asit bakterileridir. Bugüne kadar hem çocuk hem de yetişkinlerde yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır (Reid ve Reid, 1999). Özellikle 1983 yılında Barry R. Goldin ve Sherwood L. Gorbach tarafından izole edilen *L. rhamnosus* GG, probiyotik olması ve patojenite göstermemesi nedeniyle farklı alanlarda üzerinde en çok çalışılan laktik asit bakterilerinden biri olmuştur (Whittemore, 2013).

L. rhamnosus GG ve *L. rhamnosus* LC-705 suşları aflatoksin bağlama yetenekleri yüksek, muhtemel biyolojik detoksifikasyon ajanları olarak tanımlanmaktadır (Ahlberg vd., 2013). *L. rhamnosus* GG tarafından üretilen çözünür proteinlerin, sağlıklı bağırsak epitellerinin çoğalmasını düzenleyip, sinyal yollarını kontrol ederek sitokinlerce tetiklenen apoptozu önlediği ve hücre canlılığının korunmasını sağladığı belirtilmektedir (Chiu vd., 2010; Yan vd., 2007).

Farklı sınıflandırılmış kolon kanseri hücreleri olan Caco-2, HT-29 ve SW480 hücre hatlarına K vitamini ve canlı *L. rhamnosus* GG ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmış, 72 saat sonunda test edilen tüm hücre hatlarına ayrı ayrı uygulanan K vitamini ve *L. rhamnosus* GG'nin çoğalmayı durdurduğu, apoptozun tetiklendiği ve hücre döngüsünün tutuklandığı belirlenmiştir. K vitamini ve *L. rhamnosus* GG birlikte uygulandığında ise, artan dozlarda ortama ilave edilen K vitamininin, probiyotiğe bağlı anti-proliferatif etkiyi güçlendirdiği tespit edilmiştir (Orlando vd., 2016).

Kanser risk faktörlerinden biri de kronik inflamasyondur. İnflamatuar bağırsak hastalığı ise kolon kanseri risk faktörlerindendir. *L. rhamnosus* GG, inflamatuara yol açan nekroz faktör- κ -B yolağını -bu yolak inflamatuvar bağırsak hastalığı ve kolon kanseri ile ilişkili olan yolaktır- baskılayarak kolon kanserojenliğini önlediği rapor edilmiştir (So vd., 2017).

2.3 Ksenobiyotik Biyotransformasyonu ve Genotoksinler

Tüm organizmalar sürekli ve engellenemez şekilde “yabancı kimyasallara” yani ksenobiyotiklere maruz kalmaktadırlar. Bunlar üretilmiş ve doğal olarak bulunan kimyasallar, ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisitler, kirleticiler, pişmiş gıdalarda oluşan piroliz ürünleri, alkaloidler, sekonder bitki metabolitleri ve küfler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen toksinler olabilir. Ksenobiyotikler, lipofilik özellikte olduklarından deri, akciğer ve gastrointestinal sistemden absorbe edilebilmektedirler. Lipofilik karakterde olmaları, eliminasyonlarında önemli bir engel oluşturmaktadır. Dolayısıyla, ksenobiyotiklerin bertaraf edilmesi, karaciğer ve dokularda enzimler tarafından katalizlenen “biyotransformasyon” ile suda çözünür kimyasallara dönüştürülebilmesine bağlıdır (Parkinson ve Ogilve, 2001).

Metabolik biyotransformasyon; yağda çözünen, apolar, boşaltım sistemi ile atılamayan kimyasalların suda çözünen, polar özellikte, safra ve idrar ile atılabilen forma dönüştürülmesidir. Bu reaksiyonlar genellikle zehirli bileşiklerin zararlı etkisini ortadan kaldırma işlevini görürler. Ancak bazı durumlarda ksenobiyotik metabolizmasındaki araçların kendisi de toksik etkilere neden olabilmektedir (Jakoby ve Ziegler, 1990). Biyotransformasyon yaygın olarak, karaciğer, akciğer, böbrek, bağırsaklar (bağırsak mikrobiyotası bu döngüye katkıda bulunur), deri ve eşey bezlerinde gerçekleştirilir. Biyotransformasyon gerçekleşmezse, lipofilik ksenobiyotiklerin vücuttan atılması oldukça yavaş olup, nihayetinde organizmada aşırı birikerek ölüme sebebiyet vermektedir (Parkinson ve Ogilvie, 2001).

Genotoksinler, DNA'ya zarar vererek hücre ölümü ya da mutasyonlara neden olan maddelerdir (Trainer, 2013). Genotoksinler, mutajen ve kanserojenler bağırsaklarda faz I ve faz II enzimleri tarafından biyotransformasyona uğratılırlar. Faz I enzimleri biyoaktivasyona neden olurken faz II enzimleri ise mutajen/kanserojenlerin inaktivasyonunu sağlamaktadır (Raman vd., 2013). Faz I metabolizmasında molekül ağırlığında küçük değişimler gerçekleşmekte ve Sitokrom P450 (CYP450) isimli karışık fonksiyonlu oksidazlar görev almaktadır. Faz I metabolizması, ksenobiyotiği Faz II metabolizmaya hazırlamaktadır. Bu fazda oksidasyon-redüksiyon ve hidroliz tepkimeleri ile moleküle -OH, -COOH, -NH₂ ve -SH grupları eklenmektedir (Parkinson ve Ogilvie 2001). Substrat seçiciliği olmayan CYP450, birçok ksenobiyotiği metabolize etmekte ve birçok reaksiyonu katalizlemektedir. Dokular arasına yayılmıştır ve bulunduğu dokular çeşitlidir. Farklı genler tarafından üretilbildiklerinden birkaç farklı şekilde bulunmakta, miktarları gıda/su/havada maruz kalınan kimyasal miktarına göre değişiklik göstermektedir. Bu gruba ait enzimler çoğu endüstriyel ve çevresel kimyasallar ile ilaçlar gibi çok sayıdaki düşük molekül ağırlıklı ve yüksüz biyomolekülün biyotransformasyonunda rol oynamaktadır.

İnsanlarda, AFB₁'in tüm konsantrasyonlarında, *exo*- epoksit dönüşüm reaksiyonunda CYP450 3A4 enziminin, en baskın enzim türü olduğu belirtilmektedir (Guengerich vd., 1998). CYP450 3A4, yüksek AFB₁ konsantrasyonunda aktif iken; CYP450 1A2 ise düşük dozlarda yüksek afinite göstermektedir (Monson vd., 2015). P450 3A4, AFB₁'i AFQ₁'e okside etmektedir (Guengerich ve ark. 1998). CYP450

1A1, poliaromatik hidrokarbonlar ve aromatik aminler gibi prokanserojenlerin aktivasyonunda yer almaktadır. Örneğin, benzo[*a*]piren CYP450 1A1 tarafından kanserojen ve mutajenik epoksitlere dönüştürülmektedir (Çetinkaya ve Pınarbaşı, 2006).

Faz II metabolizmada, ksenobiyotikler diğerlerine göre daha büyük ve suda yüksek çözünme özelliğine sahip bileşiklerle kompleks oluşturmaktadır. Bu fazda yer alan temel enzimler glukoronoziltransferazlar, glutatyon-S-transferazlar, sülfotransferazlar ve asetiltransferazlardır. Bu enzimler, sitokrom P450 enzimine benzer özelliktedirler. Fakat hücrede bulundukları yer farklıdır. Sitokrom P450 hücre membranlarında bulunmakta olup, faz II enzimler ise sitoplazmada yer almaktadır (Anonim, 2015).

2.3.1 Mikotoksinler

Mikotoksinler çoğu aromatik halka yapısında, daha az kısmı da alifatik bileşiklerden oluşan, küflerin ürettiği sekonder metabolitlerdir. Çoğunluğu yüksek sıcaklığa dirençli olmakla birlikte, bu özellik mikotoksin çeşidi, uygulanan sıcaklık derecesi ve uygulama süresine göre değişkenlik göstermektedir (Arıgül ve Zorba, 2014; Tunail, 2000). Küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi için ortamın nemi, sıcaklığı, oksijen miktarının yanı sıra tahıllardaki mekanik hasar ve ürünün pH'sı önemli parametrelerdir (Kaya (a), 2014). Mikotoksinlerin bir kısmı misel içinde birikirken, çoğunluğu miselden dış ortama doğru salgılanır. Bu nedenle küfle kontamine gıdalarda yalnızca küflü kısmın uzaklaştırılması, mikotoksin tehlikesi olmadığı anlamına gelmemektedir (Tunail, 2000).

Mikotoksinler ağırlıklı olarak *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Vinderola ve Ritieni, 2014) ve *Alternaria* (Tunail, 2000) türleri tarafından üretilmektedir. *Alternaria* ve *Fusarium* türleri tarla küfleri olarak sınıflandırılırken; *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri ise depo küfleri olarak gruplandırılmaktadır (Tunail, 2000). Mikotoksinler, doğrudan veya metabolitleri ile dolaylı olarak farklı yollarla etki oluşturmakta, DNA'ya doğrudan ya da metabolitleriyle bağlanarak DNA'nın yapısını bozmaktadırlar. AFB₁'in epoksidasyon ürünü olan AFB₁-2,3-epoksit, DNA'ya

guaninin 7. azotu üzerinden bağlanarak DNA bağlanma ürünleri (adducts) oluşturmaktadır (Kaya (a), 2014).

Gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi için, küf kontaminasyonu engellenmeli, gıda ve yemlere bulaşan mikotoksinler etkisiz hale getirilmeli ve son olarak besinler aracılığı ile tüketilen mikotoksinlerin sindirim kanalında absorpsiyonu engellenmelidir (Kabak, 2002).

Mikotoksinler bağırsak sisteminden absorbe edilerek kana karışırlar. Plazmadaki mikotoksin konsantrasyonunun düşürülmesi ise ancak bağırsaktan emilimlerinin azaltılması ile mümkündür. Küçük çocukların günlük beslenmesinde sıklıkla yer alan süt ve tahıllar en muhtemel mikotoksin kaynaklarıdır. Çoklu mikotoksinlere maruziyet kısa süreli yüksek dozda "akut" ya da uzun süreli düşük dozda maruziyet sonucunda kansere ve bağırsak bağışıklık sisteminin bozulması, böbrek ve karaciğer hasarı, akciğer ödemi gibi geri dönüşü olmayan etkilere yol açacak şekilde "kronik" olabilir (Gao vd., 2016). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla; probiyotiklerin mikotoksinlere kronik maruziyetin etkilerini azaltabileceği ya da önleyebileceği gösterilmektedir (Vinderola ve Ritieni, 2014).

2.3.1.1 Aflatoksin B₁

Aflatoksin B₁, birçok *Aspergillus* türü tarafından üretilen mikotoksin olup (Jebali vd., 2015), kategori I olarak sınıflandırılan insan kanserojeni ve en etkili genotoksik faktörlerden biridir (Wang ve Groopman 1999). Aflatoksin B₁ toksik etkisini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymaktadır (Girgin vd., 2001). Birçok model sisteme göre mutajenik özellik göstermekte; kemirgen ve insanlarda kromozomal anomalilere, mikronükleus oluşumuna, kardeş kromatit değişimi, programlanmamış DNA sentezi ve kromozomal zincir kırıkları ile bağlanma ürünlerinin oluşumuna yol açmaktadır. AFB₁-DNA bağlanma ürünleri, onarıma dayanıklı olup, depürinasyon ya da DNA'nın hatalı onarımı sonucunda, tek zincir kırıkları, baz çifti değişimi ve çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabilmektedirler (Wang ve Groopman 1999). AFB₁ kimyasal yapılarına göre difurokumarosiklopentanon ve difurokumarolakton olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Floresan ışık altında oluşturduğu renge göre mavi renk verenler B₁ ve B₂ grubunu,

yeşil renk verenler ise G_1 ve G_2 grubunu oluşturmaktadırlar (Girgin vd., 2001; Özkaya ve Temiz, 2003).

AFB_1 , aflatoksin türlerinin en kanserojeni olup, memeliler tarafından tüketildiğinde gastrointestinal sistemde emilerek kanda, sütte ve dolayısıyla süt ürünlerinde AFB_1 'in hidrokssillenmiş metaboliti olan AFM_1 'e dönüşmektedir (Jebali vd., 2015). AFB_1 'in CYP450 3A4 enzimi tarafından AFQ_1 ve epoksi formuna; CYP 1A2 tarafından da AFM_1 ve epoksi formuna dönüştürülebildiği rapor edilmiştir (Huang vd., 2017). Maruz kalınan AFB_1 'in %1,1-2,2'si AFM_1 'e dönüştürüldükten sonra idrar ile atılmaktadır. Dönüşüm oranları, hayvanlar arasında AFB_1 'i metabolize edebilme yeteneğine göre değişiklik göstermektedir (Redzwan vd., 2016).

Aflatoksin M_1 , sınıf 2B insan kanserojeni olup sütte maksimum kalıntı limiti belirlenen tek mikotoksindir (Gao vd., 2016, Serrano-Niño vd., 2013). Hem Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) hem de Codex Alimentarius tarafından, AFM_1 'in kanserojen etkisinin AFB_1 'e göre 10 kat daha düşük olduğu belirtilmektedir (IARC, 2002; Codex Alimentarius Commision, 2001). Ayrıca AFM_1 , AFB_1 'in aksine metabolik aktivasyona ihtiyaç duymadan, insan hücrelerine sitotoksik etki göstermektedir (Serrano-Niño vd., 2013).

Aflatoksinlere maruziyet, özellikle kontamine yemlerle beslenmiş hayvanlardan elde edilen ürünlerin tüketilmesi yolu ile gerçekleşmektedir. Beslenmenin önemli bir kısmını kanatlı hayvanlar, tahıllar ve süt ürünleri oluşturduğundan, peynir gibi konsantre süt ürünlerinin tüketilmesi, kontamine ürünlerle alınan aflatoksin miktarının, işlenmemiş süttten alınan aflatoksin miktarına göre 3-3,5 kat artmasına yol açmaktadır (Girgin vd., 2001). Hayvanların kronik olarak aflatoksinlere maruz kalması, bağışıklık sisteminin baskılanmasına yol açmaktadır. Ayrıca oluşturduğu bağlanma ürünleri nedeniyle protein metabolizmasını etkilemekte ve kritik öneme sahip mikrobelerin kullanılmalarını engellemektedir (Istiqomah vd., 2017). Beslenme yolu ile alınan AFB_1 , oniki parmak bağırsağından difüzyon ile emilmekte ve bu emilim tüm bağırsak sistemi boyunca devam etmektedir. Emilimin ardından AFB_1 kana karışmakta ve diğer organlara ulaşmaktadır. Karaciğerde CYP450 enzimleri ile metabolize edilen aflatoksin B_1 , AFB_1 *exo*-8,9-epoksite dönüştürülmekte, sonra ya vücuttan atılmakta ya da DNA ve

biyolojik moleküller gibi diğer biyolojik moleküllerle etkileşime girmektedir (Redzwan vd., 2016).

Exo-epoksit yapısındaki AFB₁, su içinde oldukça kararsız olduğundan, DNA ile etkileşime girerek yüksek miktarda DNA-bağlanma ürünleri oluşturur. En sık oluşan AFB₁-DNA bağlanma ürünü, DNA'da guaninin 7 numaralı azotuna bağlanmış 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroksi-AFB₁ (AFB₁-N⁷-Gua)'dır (Huang vd., 2017; Kaya (a), 2014; Wang ve Groopman, 1999). Karaciğerde metabolize edildikten sonra, DNA'da guanine bağlanan AFB₁, tümör baskılayıcı gen P53'ün 249. kodonunda mutasyona yol açmaktadır (El-Nezami vd., 2006). AFB₁-epoksitinin ise yalnızca *exo*- izomeri genotoksiktir. (Guengerich vd., 1998).

AFB₁, okratoksin A (OTA) ve zearalenon (ZEA) tahıllarda, hayvan yemlerinde ve çeşitli gıdalarda sıklıkla bulunan mikotoksinlerdir. Süt ineği tarafından tüketilen mikotoksin ile kontamine yemler, sindirim sisteminde metabolize edildikten sonra, bu mikotoksinler AFM₁, OTA, okratoksin α (OT α), ZEA ve α -zearalenol (α -ZOL)' dönüştürülür ve süte aktarılır. Bu metabolitler sütün işlenmesi sırasında da stabil kalırlar (Gao vd., 2016).

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğine göre, bebek ve çocuklara yönelik ek ve özel gıdalarda maksimum AFB₁ kalıntı limiti 0,1 μ g/kg olarak belirlenmiştir. Doğrudan insan tüketimine sunulan gıdalarda, ürün çeşidine göre değişiklik göstermekle beraber AFB₁ bulunma üst sınırı sırasıyla 2 μ g/kg, 5 μ g/kg ve 8 μ g/kg olarak düzenlenmiştir. Yönetmelikte; çiğ, ısıtılmış süt ile süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütte, izin verilen en yüksek AFM₁ miktarı 0,05 μ g/kg; bebek formülleri ve devam formülleri ile bebekler için özel tıbbi amaçlı gıdalarda üst limit 0,025 μ g/kg olarak belirtilmektedir (TGK, 2011).

2.3.1.2 Aflatoksin B₁'in Detoksifikasyonu

Gıda ve yemlere kontamine olmuş aflatoksinler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler ile parçalanabilir. Sıcaklık uygulaması, UV ışık ya da iyonize radyasyon gibi fiziksel yöntemler kullanılabilmekte ancak etkinlikleri oldukça yetersiz kalmaktadır. Kimyasal yöntemler içerisinde klorlayıcı, oksitleyici ve hidrolitik ajanların ilavesi yer almaktadır. Bu gibi kimyasal yöntemler, pahalı

yatırıma ihtiyaç duymakta ve uygulanan ürünlerin besin değerinde kayba yol açabilmektedirler (El-Nezami vd., 1998).

Son yıllarda AFB₁'in biyolojik detoksifikasyonu ilgi ve önem kazanan bir çalışma alanı olmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda birçok mikroorganizmanın, bakteri, maya, küf, aktinomisetler ile alglerin, gıda ve yemlerdeki aflatoksini parçalama yetenekleri araştırılmıştır. Bazı küfler ile küf sporlarının aflatoksini kısmen yeni floresan özellikteki bileşenlere dönüştürdüğü bazılarının da aflatoksinin küçük bir miktarını uzaklaştırdığı ya da parçaladığı bildirilmiştir (Ciegler vd., 1966). *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Rhizopus* sp. ve *Mucor* sp. gibi bazı küfler ile *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma* türleri ve *Armilleriella tabescens* gibi mayaların, AFB₁'i, hücre ekstraktları sayesinde daha az toksik metabolitlere dönüştürdüğü belirlenmiştir. Ancak uygulamada funguslar ile detoksifikasyon çalışmaları, 120 saat gibi oldukça uzun süreye ihtiyaç duyulması ve aktif ekstraktların eldesinin karmaşık prosedürlerden oluşması nedeniyle oldukça sınırlı kalmıştır. Bakterilerle yapılan çalışmalar ise daha çok laktik asit bakterileri üzerine yoğunlaşmıştır. Laktik asit bakterileri ile AFB₁'in indirgenmesi, bu bakterilerin toksini hücre duvarları yüzeyinde tutması/bağlaması yoluyla gerçekleşmektedir. Metabolize etmeleri ya da degrade etmeleri söz konusu olmamakla birlikte bu bağlanma tersinir olup, bu durum kontamine besiyeri içerisinde bulunan AFB₁'i tamamen ortamdan uzaklaştırmasını engellemektedir (Guan vd., 2008). Ancak Wu vd. (2009) tarafından, AFB₁'in, yoğurt ve süt ürünleri fermentasyonu süresinde AFB_{2a}'ya detoksifiye edildiği bildirilmiştir.

Aflatoksinler kumarin türevlerinden oluşmaktadır. Bazı mikroorganizmalar kumarini karbon kaynağı olarak kullanabilmekte veya metabolize edebilmektedir (Guan vd., 2008; Xia vd., 2017). Laktik asit bakterilerinin yanı sıra *Nocardia corynebacterioedes* (eski adıyla *Flavobacterium aurantiacum*) (Ciegler vd., 1966), *Bacillus* türleri (*Bacillus clausii*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. firmus*) (Cenci vd., 2008), *Stenotrophomonas maltophilia* (Guan vd., 2008), *Pseudomonas* türleri (Sangare vd., 2014), *Bacillus subtilis* JSW-1 (Xia vd., 2017) türleri ise hücreleri ya da sekonder metabolitleri sayesinde AFB₁'i parçalayabilmektedir. *Flavobacterium aurantiacum* sıvı besin ortamından ve gıda

ürünlerinden toksik yan ürün oluşturmada aflatoksini önemli miktarda uzaklaştıran tek mikroorganizma olarak rapor edilmiştir (Ciegler vd., 1966; El-Nezami vd., 1998).

2.3.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, 2 ya da daha fazla aromatik benzen halkası içeren aromatik hidrokarbonlardır. Organik maddelerin, yetersiz yanması sonucu oluşurlar (Abou-Arab vd., 2015). Bu bileşikler, 100'den fazla kimyasaldan oluşan oldukça yaygın çevresel kontaminantlardır (Ramesh vd., 2004). Volkanik faaliyetler, orman yangınları, alüminyum endüstrisi, baca ve sigara dumanı, asfalt yollar, kömür, katran, zirai yangınlar, ev ve endüstriyel atıkların yakılması, tehlikeli atık alanları ve taşıtların egzozları gibi çoğunlukla insan faaliyetleri sonucunda çevreye karışmaktadır (Abou-Arab, 2015; Ukiwe vd., 2013). Üretilen PAH miktarı ve bileşimi ise sıcaklık ve hava miktarı gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Abou-Arab, 2015).

PAH'ların en sık bulundukları yerler toprak, sediment ve yağlı materyallerdir. Su ve havadaki konsantrasyonları toprağa kıyasla oldukça düşüktür. Atmosfere karıştıklarında ise birçoğu kolay parçalanamayıp uzun süreli kirlenmeye yol açmaktadır. Rüzgar, bu kirleticilerin oldukça geniş alana yayılmasına neden olmaktadır (Ukiwe vd., 2013). Bu kontaminantlar, vücutta özellikle yağ doku ve yağ bakımından zengin dokularda birikerek kısa sürede toksik seviyelere ulaşmaktadır (Kaya (b), 2014; Ramesh vd., 2004).

Gıdaların PAH'lar ile kontaminasyonu, çevresel bulaşan olarak atmosferik kontaminasyon, kontamine olmuş ambalaj materyali ya da gıdaya uygulanan, kurutma, ızgara ve tütsüleme gibi termal prosesler gibi farklı yollarla gerçekleşmektedir (Abou-Arab vd., 2015). Gıdalarda en sık bulunan PAH bileşenlerinin benzo[b]floranten (%59), floranten (%48) ve benzo[k]floranten (%46) oldukları belirtilmektedir. Şeker ve tatlılar grubunda ise 36 µg/kg krizen olduğu tespit edilmiştir. Şeker ve tatlılar, tahıllar, sıvı ve katı yağlar ile kabuklu yemişler en yaygın PAH taşıyıcılardır (WHO, 2000). Kişinin yaşam şekline bağlı olarak günlük alınan toplam PAH miktarı 25-30 µg arasında değişmektedir. Ortalama 70 yıl yaşayan bir insanın ömrü boyunca; solunum, gastrointestinal ve deri yoluyla

toplamda 29 mg benzo[a]piren'e maruz kaldığı belirtilmektedir (De Kok ve Van Maanen, 2000). Türk Gıda Kodeksi Kalıntı ve Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre ise benzo[a]piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten ve krizen toplamı yetişkin ürün grupları için minimum 10 µg/kg, maksimum 35 µg/kg olarak belirlenmiştir (TGK, 2011).

PAH grubu içerisinde yer alan bazı maddeler hayvan ve insanlar için toksik, kanserojen ve mutajenik etki göstermektedir (Abou-Arab vd., 2015). Dört ve daha fazla benzen halkasına sahip olan PAH bileşenleri; örneğin benzo[a]piren ve dimetilbenz[a]antrasen, farelerde yüksek kanserojen etki göstermektedir. Diğer PAH bileşenlerinden dibenz[a,h]antrasen, metilbenz[a]antrasen ise bu kanserojenitein etkisini azaltmaktadır. Bazıları (antrasen, fenantren, perilen ve benzo[e]piren) ise tamamen inaktif özellik sergilemektedir (De Kok ve Van Maanen, 2000). PAH'lar sindirildikten sonra gastrointestinal sistemden absorbe edilerek tüm organlara buradan yayılırlar. Bazı PAH'ların yapılan *in vivo* çalışmalarda kemirgenler; *in vitro* çalışmalarda ise memeli ve insan hücre hatları ile prokaryotlar için genotoksik etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Abou-Arab vd., 2015).

Hücre kültürü çalışmalarında benzo[a]pirenin DNA'ya bağlanarak mutasyonlara, kromozom anomalileri, kardeş kromatid değişimi ve programlanmamış DNA sentezine yol açtığı belirtilmektedir (Anonim, 2017). PAH'ların önemli bir kısmı feçes ile atıldığı için kolon ve rektum, PAH tarafından tetiklenen kanserlerin hedefinde yer almaktadır (De Kok ve Van Maanen, 2000). Benzo[a]piren, meme kanserine neden olan en etkili kanserojen maddedir ve en sık bulunduğu yerler tütsülenmiş, kızartılmış ve kavrulmuş gıdalardır (Zhao vd., 2013).

2.3.2.1 PAH'ların Detoksifikasyonu

Düşük molekül ağırlıklı polisiklik aromatik hidrokarbonlar iki ya da üç aromatik halka içermektedir. PAH'lar diğer gruba nazaran daha uçucu ve daha iyi çözünürlüğe sahiptirler. Yüksek molekül ağırlığındakilere göre daha kolay parçalanabilmektedirler. Dört ya da daha fazla halka içeren yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar toprak ve sedimente kuvvetle tutunarak mikrobiyal parçalanmaya karşı direnç göstermektedir (Mrozik vd., 2003).

Toprakta PAH'lar özellikle *Pseudomonas* cinsine ait Gram (-) bakteriler tarafından parçalanabilmektedir. Bunun yanı sıra *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus* ve *Bacillus* türleri de biyo-parçalanmada rol alan diğer bakteri grupları olarak belirtilmektedir (Mrozik vd., 2003).

PAH'lar organizmada öncül maddeler olup, metabolik transformasyona uğrayarak, DNA bağlanma ürünlerinin oluşumuna yol açan, polar ve oldukça reaktif metabolitler oluşturmaktadır. PAH biyotransformasyonu; sitokrom P450 enziminin, molekülü epoksidasyona uğratarak aren oksitlerin oluşumu ile başlamaktadır. İnsanda CYP450 1A1 en etkin enzim olup, oldukça fazla sayıda PAH bileşiğinin metabolizmasından sorumludur (Kaya (b), 2014;Ramesh vd., 2004). Başlangıç epoksidasyon basamağında, endoplazmik retikulum içerisindeki enzim kompleksi olan karma fonksiyonlu oksidaz (mixed-function oxidase, MFO) tarafından katalizlenir ve süreç boyunca apolar PAH'ları, polar hidroksi türevleri ve aren oksitlere dönüştürmek için NADH ve NADPH'a gereksinim duyulmaktadır (Anonim 2017). İkinci basamakta, hidroksilasyon ve diollerin oluşumu gerçekleşmektedir. Epoksi hidrolaz tarafından katalizlenen bu olayla oluşan dioller, bir sonraki ürün olan dihidrodiol epoksitlere dönüştürülebilmektedir (Ramesh vd., 2004). Diol epoksit 4 farklı stereoizomerik formda bulunmaktadır. Kansere yol açan en önemli ürün ise benzo[a]pyrene-r-7,t-8-diol-t-9,10-epoksittir (Anonim, 2017). Bu ürünler DNA'nın nükleofilik kısımlarına, nükleofilik saldırılar yapan oldukça reaktif bileşenlerdir (Ramesh vd., 2004).

PAH metabolizmasında asıl görev alan organ karaciğerdir. Ancak diğer organlar da PAH'ların metabolizmalarında önemli rol oynamaktadır. Bağırsak epitelleri, PAH'ların aktivasyonu ve detoksifikasyonu için tüm enzimleri içerir ancak bunların etkinlikleri karaciğere göre oldukça düşüktür. Kolon dokularının oldukça düşük seviyede CYP enzimleri salgıladığı bildirilmiştir. Ancak sindirim sisteminde, bağırsak mikroflorası ve intestinal sitokrom p450 enzimleri PAH metabolizmasına katkıda bulunmaktadır (Ramesh vd., 2004).

PAH'ların birçok metaboliti feçes ve idrar yolu ile atılmaktadır (Anonim, 2017). PAH'lara maruziyetin göstergesi idrarda artan miktarda 1-hidroksipiren (1-OHPY) bulunmasıdır (Kaya (b), 2014). Deney hayvanlarının toksin ile eş zamanlı olarak bitki fenollerini ile beslenmeleri sonucu PAH'lar tarafından hücre

çekirdeklerinde oluşan toksisitenin inhibe edilebildiği belirtilmektedir (De Kok ve Van Maanen, 2000).

2.4 Laktik Asit Bakterilerinin DNA-Biyokoruyucu Özellikleri

Düzenli olarak gıda ve çevresel kanserojenlere maruz kalmanın kaçınılmaz olduğu durumlarda antimutajenik maddeler, mutajenlerin etkisiz hale getirilmesinde hayati rol oynamaktadır. Beslenme, antimutajenik maddelerin alınmasında en doğal yöntemlerden biridir. Bunun yanı sıra, probiyotik, prebiyotik ve simbiyotikler bakımından zengin gıda takviyesi ve nutrasötikler, gıda kaynaklı mutajenlerin uzaklaştırılmasında en etkili biyolojik yöntem olarak kabul edilmektedir (Raman vd., 2013).

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ya da cerrahi müdahalelerin başarılı olma oranları; oluşturdukları yan etkiler ve ölüm yüzdelerinin yüksek olması nedeniyle halen tartışmaya açık bir konudur. Bu nedenle son zamanlarda çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının kolon kanserlerindeki fonksiyonel özelliklerinin ortaya çıkarılmasında yoğunlaşmaktadır (Raman vd., 2013).

Metabolik faaliyet sonucu oluşan birçok N-nitröz bileşeni, kanserojen-mutajen özellikleri olan etkili DNA alkilleyici ajanlardır. Bu bileşenler gastrik kanser görülme olasılığını artırırlar Protein metabolizması nedeniyle açığa çıkan azot bakımından zengin atıklar ve nitrat metabolizması ile oluşan bu bileşenler, kalın bağırsakta oldukça yüksek miktarda bulunurlar (Pithva vd., 2015). Mikrobiyal anti-genotoksiste, bağırsak sistemindeki kolonositleri hem gıda hem de endojen mutajenlerinden koruma özellikleri bakımından dikkat çekmektedir (Bocci vd., 2015).

Bağırsak mikrobiyotasının doğal üyesi olan probiyotikler mutajen bağlama, parçalama ve mutajenezi önleme, pro-kanserojenlerin zararlı, toksik ve reaktif kanserojenlere dönüşmesini engelleme, prebiyotiklerin fermentasyonu ile bütirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitleri oluşturarak bağırsak pH'sını düşürme, anti-inflamatuvar moleküllerin salgılanarak konukçu bağışıklık sistemini geliştirme, apoptozu indüklemeye, tümör hücrelerine anti-proliferatif etki gösterme ve

kanser hücrelerinin farklılaşmasını sağlama gibi farklı mekanizmalar sayesinde anti-kanserojen etki göstermektedir (Adebola vd., 2013; Ambalam vd., 2016; Raman vd., 2013; Wang vd., 2014). Lifli besinlerin fermentasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri pH'yı düşürüp laktik asit bakterilerinin gelişimi için uygun koşulları sağlamakla beraber patojenlerin gelişimini engellemenin yanı sıra; kolon hücreleri için de karbon kaynağı sağlamaktadır (Vinderola ve Ritieni, 2014). Ayrıca düşük pH hücrelerde sentezlenen biyotransformasyon enzimlerinin miktarını düşürerek prokanserojenlerin, kanserojen ürünlere dönüşmesini engellemektedir (Raman vd., 2013).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, bazı probiyotik bakterilerin AFB₁ ve diğer kanserojenler ile sıkı kompleksler oluşturabildiğini göstermektedir (El-Nezami vd., 2006). *In vitro* çalışmalarda probiyotik suşların mutajenleri bağlayarak antimutajenik aktivite gösterdikleri ifade edilmektedir (Ambalam vd., 2016).

Laktik asit bakterileri farklı genotoksinleri farklı mekanizmalarla uzaklaştırma yeteneğine sahiptirler. Mutajenlerin bağlanması genellikle hücre duvarı yapısındaki iki temel bileşen peptidoglikan ve polisakkaritler nedeniyle adsorbsiyon yoluyla veya katyon değişim mekanizması ile gerçekleşmektedir (Hirayama ve Rafter, 2000). Yapılan araştırmalarda mikotoksinlerin hücre yüzeyine adsorbe edilerek (Fuchs vd., 2008; Hernandez-Mendoza vd., 2009; Zhao vd., 2013); PAH'lar içerisinde en mutajen olan benzo[a]pirenin ise hücre duvarındaki peptidoglikan katmanda tutularak uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Hücrede yer alan sferoplastlar, ekzopolisakkaritler, S-protein katmanı ile taykoik asitlerin BaP üzerinde etkisiNİN olmadığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2013).

Bağırsak mikrobiyotasında belirli bakteri türlerinin varlığı, kolorektal kanserler ile ilişkilendirilmektedir. “Batı tipi beslenme” olarak da adlandırılan yağ ve protein bakımından zengin beslenme bağırsak mikrobiyotasını değiştirmekte ve *Firmicutes* grubu üyelerinin sayısı hızla artarken, *Bacteroidetes* grubu üyelerinin sayısında önemli azalışa neden olmaktadır (Hemarajata ve Versalovic, 2013). Buna karşın lif bakımından zengin besinlerin tüketilmesi ile tam tersi durum gözlenmekte; *Firmicutes* sayısı azalmakta, *Bacteroidetes* sayısı ise artmaktadır (Kumar vd., 2016). Kolon kanseri hastalarında çok yüksek sayıda bulunan *Fusobacterium nucleatum*'un adenomların kansere dönüşümünde rol aldığı; enterotoksijenik *Bacteroides*

fragilis'in ise bir diğer kanser etmeni olduğu bildirilmiştir. Laktik asit bakterileri antimikrobiyel özellikleri sayesinde bu patojenlerin gelişimini baskılamaktadırlar (Ambalam vd., 2016).

Laktik asit bakterilerinin antikanserojen özellikleri bakterilerin bulunduğu gelişme fazına, besiyeri pH'sına, mutajen tipi ve suşa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Antigenotoksik ve antimutajenik aktiviteye sahip *Lactobacillus* türleri, mutajen yükünü azaltarak kolorektal kanserin başlamasına engel olabilir (Ambalam vd., 2016). Bunun yanı sıra bifidobakter ve laktobasillerin; *Bacterioedes*, *Clostridium* ve *Enterobacteriaceae* grubunun aksine, ksenobiyotik metabolizmasında etkili olan β -glukoronidaz, azoredüktaz ve nitroredüktaz gibi enzimlerin ekspresyonunu azalttıkları belirtilmektedir (Ambalam vd., 2016; Raman vd., 2013).

Gıda ve yemlere bulaşan mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin dekontaminasyon miktarı yüksek olmasına rağmen, oluşturdukları sağlığa zararlı yan ürünler ve gıda kalitesini düşürmesi nedeniyle kullanım alanı bulamamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda mikotoksin oluşumu ve uzaklaştırılması için biyolojik yöntem olan mikroorganizmalarla detoksifikasyonun üzerinde durulmaktadır (Kabak ve Var, 2004).

Laktik asit bakterileri, farklı yöntemlerle AFB₁'in oluşumunu engellemekte veya kontamine gıda ve yemlerde AFB₁'in miktarının azaltılmasını sağlamaktadırlar. Özellikle gıdalarda kullanılan koruyucu kültürler, küflenmenin önüne geçerek muhtemel AFB₁ üretiminin de önüne geçebilmektedir. Fermentasyon ile birlikte ortamda hızla çoğalan laktik asit bakterileri, pH'dan bağımsız olarak (Haskard vd., 2001; Topcu vd., 2010) ortamda bulunan AFB₁ miktarını azaltabilmektedir.

Yapılan bir çalışmada fermente tahıllardan izole edilen *L. plantarum* MW, *L. plantarum* YO, *L. brevis* WS3, *L. fermentum* OYB, *L. fermentum* RS2 ve *Lactococcus* spp. RS3 suşlarının, *Aspergillus flavus*'un M1, B4, B5, C6 ve *Aspergillus parasiticus*'un C2 ve AF7 suşlarının gelişimini önemli miktarda inhibe ettikleri; en yüksek inhibisyon etkisinin ise *L. plantarum* YO suşu tarafından sağlandığı tespit edilmiştir (Onilude vd., 2005).

Bir diğerk çalışmada ise, *Aspergillus flavus* ATCC 15517 ile birlikte inkübe edilen *L. casei* KC-32'nin, aflatoksin üretimi ve misel oluşumunu engelleyici etkisi araştırılmış; *L. casei* KC-324'ün ürettiğı hücre dışı metabolitler sayesinde, hem AFB₁ biyosentezini hem de *A. flavus* ATCC 15517'nin gelişimini engellediğı tespit edilmiştir. Bu anti-aflatoksijenik metabolitler 25-37 °C arasında farklı sıcaklıklarda üretilebilmektedir (Chang ve Kim, 2007).

Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ üreten *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile yapay olarak kontamine edilmiş besiyeri ve mısır tanesine, *L. acidophilus* ATCC4495 ve *L. acidophilus* ATCC20552 uygulandığında ve aflatoksin üretimi ile küflerin gelişimi izlenmiştir. Sonuç olarak; *L. acidophilus* ATCC4495'nin daha etkili anti-fungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ghonaimy ve Yonis 2007).

Zeytinlerin depolanmaları süresince çoğalan küfler tarafından üretilen AFB₁ miktarının *L. plantarum* ile azaltılması çalışmasında; elektron mikroskopundan alınan görüntüler ise, *L. plantarum*'un zeytin yüzeyinde biyofilm oluşturarak, yarattığı oksijen rekabeti nedeniyle maya ve küflerin çoğalmasını engellediğı ifade edilmektedir (Kachouri vd., 2014).

AFB₁'in laktik asit bakterileri tarafından uzaklaştırılmasına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. El-Nezami vd. (1998) yaptığı çalışmasında, *L. rhamnosus* GG (LBGG), *L. rhamnosus* LC-705 (LC-705), *L. acidophilus* ATCC, *L. gasseri* ATCC 33323, *L. casei* Shirota suşları ile *Escherichia coli* kullanmıştır. LBGG ve LC-705 suşlarının 0. saatte AFB₁'in %80'ini ortamdan uzaklaştırdığı; diğerk Gram (+) ve Gram (-) bakterilere göre uzaklaştırılan bu miktarın istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; LBGG ve LC-705 suşlarının, diğerk suşlara göre AFB₁'i bağlama bakımından üstün olduğu; kullanılan tüm laktik asit bakterilerinin, *E.coli*'ye göre daha yüksek miktarda AFB₁ bağladığı tespit edilmiştir. *L. casei* Shirota'nın 24 saat sonunda bir miktar ($p>0,05$) AFB₁'i geri bıraktığı, 48. saat sonunda ise yeniden AFB₁ bağlama özelliğinin arttığı belirlenmiştir (El-Nezami vd., 1998).

Süt ürünü ve insan bağırsak mikrobiyotasından izole edilmiş 250'den fazla laktik asit bakterisinin, AFB₁'i bağlama kapasitesinin test edildiğı çalışmada ise, bağlama özelliğinin cins ve türe bağılı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bakterinin hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat ve protein bileşenlerinin, AFB₁

bağlama özelliği için önemli oldukları ve ısıtım işlem uygulamasının bu bağlama yeteneğini azaltmadığı ifade edilmektedir. *L. rhamnosus* GG (LGG)'nin, ortama ilave edilen 150 µM AFB₁ ile 1 saatlik ko-inkübasyon sonunda, AFB₁'i %40-61 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile *L. rhamnosus* GG'nin (LGG), Caco-2 hücrelerinde AFB₁ taşınımı, metabolizması ve toksisitesini azalttığı belirlenmiştir. Ökaryotik hücrelerde apoptoz belirteci olan DNA fragmentasyonu, yalnızca AFB₁ uygulanmış hücrelerde gözlemlenirken; LGG ile ko-inkübe edilmiş hücrelerde tespit edilmemiştir. LGG, Caco-2 hücrelerine AFB₁ alımını azaltarak, membran ve DNA hasarını önlemiştir (Gratz vd., 2007).

Topçu vd. (2010) tarafından, probiyotik *Enterococcus faecium* M74 suşu ve ticari kültür *E. faecium* EF031 suşlarının AFB₁'i bağlama özelliğine, bakteri canlılığının, inkübasyon süresinin ve besiyeri pH'sının etkisi araştırılmıştır. Araştırma bulgularına göre 48 saatlik inkübasyon sonunda M74 suşu %19,3 ile %30,5 arasında AFB₁ bağlarken; EF031 suşu ise %23,4 ile %37,5 arasında AFB₁ bağlamıştır. Suş-AFB₁ kompleksinin stabilite deneyinde ise AFB₁'in en çok pH 7'de ayrılma gösterdiği belirlenmiştir (Topcu vd., 2010).

Serrano-Nino vd. (2013) tarafından, *L. acidophilus* NRRL B4495, *L. reuteri* NRRL-B14171, *L. rhamnosus* NRRL B-442, *L. johnsonii* NRRL B-2178 ve *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410 suşlarının, yapay sindirim sistemi içerisinde AFM₁'i uzaklaştırma özellikleri araştırılmıştır. Sindirim işleminden sonra en yüksek bağlama etkinliği *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410, en düşük bağlama etkinliğini de *L. acidophilus* NRRL B-4495 göstermiştir.

L. plantarum MON03 (LP) hücreleri ile birlikte 24 saat inkübe edilen AFM₁'in, süre sonunda miktarının %93 azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra genetik olarak aynı olan (Balb/c) farelerde mikronükleus oluşumu ve kromozomal anomalinin belirlenmesi için öğünlerine ilave edilen AFM₁, LP ve AFM₁ + LP ile pozitif kontrol olarak da sırasıyla 4 mg/kg kolkisin ya da 1 mg/kg mitomisin C ile 15 gün boyunca beslenmiştir. Sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve AFM₁ uygulamasının vücut ağırlığında önemli miktarda azalışa yol açtığı; sitotoksik ve genotoksik etkisi nedeniyle, farelerin kemik iliği hücrelerinde polikromatik eritrosit, mikronükleus oluşumu ve kromozomal anomalilerin görülme sıklığının arttığı belirlenmiştir. *L. plantarum*'un AFM₁ ile birlikte uygulandığı farelerde, AFM₁'in

etkilerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu grupta, kontrol grubu fareler ile araştırılan parametreler bakımından önemli fark gözlenmemiştir. Ben Salah-Abes vd. (2014) yaptıkları bu çalışmada, *L. plantarum* MON03'ün yan etkisinin olmadığı gibi; AFB₁'in detoksifikasyonunda kullanımının faydalı olabileceğini ifade etmektedir (Ben Salah-Abbès vd., 2014).

Huang vd. (2017) tarafından yürütülen çalışmada, geleneksel Çin yiyeceği Tofu'dan izole edilmiş 10 farklı suşun AFB₁ bağlama özellikleri araştırılmış ve ölü hücreleri de yüksek miktarda AFB₁ bağlayabilen *L. plantarum* C88 ile çalışmaya devam edilmiştir. AFB₁ biyo-transformasyonunun, *L. plantarum* C88 tarafından engellenip engellenmediğinin doğrulaması, farelerde CYP450 1A2 ve CYP450 3A4 ekspresyon seviyelerine bakılarak kontrol edilmiş ve canlı *L. plantarum* C88 ile beslenen farelerde CYP450 1A2 ve CYP450 3A4 ekspresyonunun, AFB₁ kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca *L. plantarum* C88, feçes yoluyla AFB₁'in atılmasını arttırmış, idrarda bulunan sitokrom enzimi ürünleri AFB+N⁷-guanin miktarını da önemli miktarda azaltmış ve yağların peroksidasyonunu önlemiştir.

El-Nezami vd., (1998), AFB₁ bağlanmasının çok hızlı bir işlem olduğu, 0. saatteki AFB₁ bağlanması ile 72. saatteki AFB₁ bağlanması arasında istatistik olarak önemli bir farkın olmadığını belirtmişlerdir (El-Nezami vd., 1998). Peltonen vd. (2001) ise *L. amylovorus* CSCC S160 tarafından, 0. saatte AFB₁'i %52,6'dan %73,2'ye kadar bağlanabildiğini belirtmişlerdir. Bir diğer çalışmada, 48 saat sonunda AFB₁'in suşlar tarafından toplamda yaklaşık olarak %65'inin bağlandığı; bağlanma miktarının 1. saatten 24. saate kadar artarak devam ettiği, 24 saat sonunda da azalışa geçtiği belirlenmiştir (Gratz vd., 2007). Benzer olarak ölü *L. rhamnosus* GG suşu ile AFB₁'in ko-inkübasyonunun ilk bir saatinde %40,1; 1×10^{10} ve 5×10^{10} kob/mL hücre konsantrasyonuna sahip GG ile AFB₁ karışımında ise %61 oranında AFB₁ bağlandığı tespit edilmiştir. Ancak inkübasyon sonunda (24. saatte) *L. rhamnosus* GG'nin AFB₁'i bağlama yüzdelерinin sırasıyla %18 ve %40,9'a düştüğü tespit edilmiştir (Gratz vd., 2007). Benzer şekilde *E. faecium* M74 ve EF031 suşlarının da AFB₁'i kuvvetli bağlamadığı; 24 saat sonunda AFB₁'in geri bırakmaya başladığı belirlenmiştir (Topcu vd., 2010).

PAH'ların laktik asit bakterileri yardımıyla dekontaminasyon çalışmaları AFB₁ kadar yaygın değildir. Abou-Arab vd. (2010), laktik asit bakterileri tarafından PAH'ların indirgenmesi üzerine yaptığı çalışmada, *B. bifidum*, *Streptococcus thermophilus* ve *L. bulgaricus* kullanarak 16 bileşenli PAH referans standardında bulunan bileşenlerin indirgenebilirliğini araştırmışlardır. Her bir bileşeni 0,25 µg/mL konsantrasyonunda içeren PAH karışımı ilave edilmiş besiyerinde laktik asit bakterileri 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 ve 72 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Başlangıçtaki PAH konsantrasyonunun 72 saatlik inkübasyon sonunda *B. bifidum* tarafından %46,6, *S. thermophilus* tarafından %87,7 ve *L. bulgaricus* tarafından ise %91,5 oranında azaltılmasını sağlamıştır (Abou-Arab vd., 2010).

PAH'lar arasında en sık rastlanan ve indikatör olarak kullanılan benzo[a]piren'in (B[a]P), *Lactobacillus* suşları tarafından indirgenme miktarları ile birlikte diğer çalışmalardan farklı olarak B[a]P'in hangi hücresel yapılar tarafından indirgendiği de araştırılmıştır. Bu amaçla sferoplastlar, ekzopolisakkaritler, S-protein katmanı, hücre duvarı ve taykoik asitler ile peptidoglikanlar önce hücre ekstraktından ayrılmış, sonra saflaştırılarak B[a]P ile inkübe edilmişlerdir. Sferoplastların, B[a]P'i çok zayıf bağladığı, ne ekzopolisakkaritlerin ne de S-protein katmanının B[a]P bağlama özelliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Hücre duvarının normal hücrelerle aynı miktarda B[a]P bağladığı, hücre duvarı bileşenlerinden taykoik asitlerin de zayıf ayırım sağladığı ancak peptidoglikan katmanının B[a]P bağlama gücünün çok yüksek olduğu hatta sadece bu katmanın normal hücrelerden çok daha yüksek miktarda B[a]P uzaklaştırdığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2013).

Çalışmalarda AFB₁'in etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için laktik asit bakteri sayısının 2-5x 10⁹ kob/ mL ile 2x10¹⁰ kob/mL düzeyinde olmasının gerektiği belirtilmektedir (Bolognani vd., 1997; El-Nezami vd., 1998; Hernandez-Mendoza vd., 2009; Peltonen vd., 2001; Topcu vd., 2010). Optimum bağlanma sıcaklığı ise 37°C olarak belirlenmiştir (El-Nezami vd., 1998). Bugüne kadar antigenotoksik özelliği araştırılan çeşitlik laktik asit bakterileri ile mayaların listesi Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2. 1. Antigenotoksik özelliği araştırılan bakteri ve mayalar

Mikroorganizma	Referans	Mikroorganizma	Referans
<i>L. acidophilus</i>	Cenci vd (2002), Tavan vd (2002), Raipulis vd(2005), Caldini vd (2005)	<i>E. faecium</i>	Walia vd. 2014
<i>L. casei</i>	Pool-Zobel vd. 1993, Cenci vd. 2002, Tavan vd. 2002, Caldini vd., 2005	<i>B. coagulans</i>	Caldini vd. (2002)
<i>L. casei</i> Shirota	Raipulis vd. 2005	<i>B. firmus</i>	Caldini vd. (2002)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 191T	Wollowski vd. 1998, Cenci vd. 2002, Caldini vd. 2005	<i>B. megateium</i>	Caldini vd. (2002)
<i>L. fermentum</i>	Walia vd. 2014	<i>B. subtilis</i>	Caldini vd. (2002)
<i>L. plantarum</i>	Cenci vd. 2002, Caldini vd. 2005, Walia vd. 2014	<i>B. bifidum</i>	Cenci vd (2002),Tavan vd. (2002)
<i>L. plantarum</i> MON03	Ben Salah Abes vd. 2014	<i>B. infantis</i>	Hsieh ve Chou 2006
<i>L. plantarum</i> KL	Raipulis vd. 2005	<i>B. longum</i>	Hsieh ve Chou 2006
<i>L. plantarum</i> 8014	Raipulis vd. 2005	<i>B. lactis</i> Bb-12	Raipulis vd. 2005
<i>L. rhamnosus</i>	Cenci vd. 2002, Caldini vd. 2005	<i>S. cerevisiae</i>	Trotta vd. 2012, Walia vd. 2014
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Walia vd. 2014	<i>D. hansenii</i>	Trotta vd., 2012
<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Raipulis vd. 2005, Hsieh ve Chou 2006	<i>P. anamola</i>	Walia vd., 2014
<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> CH3	Wollowski vd. 1998, Tavan vd. 2002	<i>C. albidus</i>	Walia vd., 2014

2.5 Hücre Kültürü

Hücre, canlı organizmaların yapı taşı olup, içerdiği bilgiler ile tüm organizmayı temsil etmektedir. Hücre kültürü ise hayvan ya da bitkilerden farklı yöntemler kullanılarak alınan hücrelerin, gelişmeye uygun yapay bir ortamda devamlılıklarının sağlanmasını ifade etmektedir (Sigma-Aldrich, 2016). Hücreler dokudan doğrudan ayrılabilceği gibi enzimatik ve mekanik yöntemlerle de elde edilebilir (Invitrogen, 2010).

Hücre kültürü teknolojisi oldukça farklı alanlarda kullanılmaktadır. Hücre biyolojisinde, hastalığa neden etmenler ve hücreler arasındaki etkileşimler, ilaçların hücrelere etkisi, yaşlanma etmenleri ve beslenme çalışmaları, yeni ilaçların üretiminde toksisite deneylerinde, çeşitli kimyasalların, virüs ve radyasyonun normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştürme araştırmalarında, aşı üretimi, aşı üretimi için büyük ölçekli ticari proteinlerin üretimi ve gen terapisi çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır (Görbe, 2011).

Primer kültür, dokudan izole edilen hücrelerin uygun tüm substratı kullanarak çoğalmasını (konfluens) ifade etmektedir. Bu aşamada hücreler pasajlanarak alt kültürler (sekonder hücre kültürü) oluşturulmakta ve yeni hücrelerin taze besin ortamında da sürekli olarak çoğalması sağlanmaktadır (Thermo Fisher Scientific, 2017).

İlk pasajdan sonra primer hücre kültürleri “hücre hattı” ya da “subklon” (alt klon) olarak adlandırılmaktadır. Primer kültürlerden türeyen hücre hatlarının yaşam süresi sınırlıdır. Pasajlandıklarında, yüksek çoğalma hızına sahip hücreler baskın hale gelmekte ve popülasyon genotip ve fenotip bakımından tek tip hücrelerden oluşmaktadır (Sigma Aldrich, 2016, Thermo Fisher Scientific, 2017). Hücre hattı hücrelerinde, hücrelerin mutasyona uğrayarak belirli pasaj sayısından sonra apoptoza uğraması önlenmektedir. Sürekli hücre hatlarında ise, hücre hatları tümör indükleyici virüs ya da kimyasallar yardımıyla transformasyona uğratılmaktadır (Görbe, 2011).

Tek hücreden gelişen ve özdeş genetik kompozisyona sahip hücre kültürü, hücre hattı olarak tanımlanmaktadır (Sigma-Aldrich, 2016). Hücre hatları yaşam sürelerine göre iki ayrı grupta toplanmaktadır. Normal hücreler sınırlı sayıda

bölünebilirler. Bu durum “senesens” olarak adlandırılan genetik bir durumdur. (Thermo Fisher Scientific, 2017). Sınırlı hücre hatlarında popülasyon, 20-80 kez ikiye katlanabilir. Çoğalma hızları düşük olan bu hücrelerde ikilenme süresi 24-96 saat arasındadır (Sigma Aldrich, 2016). Ancak bazı hücre hatları “transformasyon” işlemi ile bazen doğal olarak bazen de kimyasal veya viral yollarla “ölümsüz” hale getirilmektedir. Sınırlı yaşam süresine sahip bir hücre hattı transformasyona uğrayarak sınırsız sayıda bölünme yeteneği kazanabilmekte ve böylelikle sürekli hücre hattı adını almaktadır (Sigma-Aldrich, 2016; Thermo Fisher Scientific, 2017).

Hücre hatlarının kültür koşulları, kullanılan hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Genel olarak temel bileşenler olan aminoasitler, karbonhidrat, vitamin ve mineralleri karşılamada yeterli, büyüme faktörleri, hormonlar, gazlar (O₂, CO₂) ve pH, ozmotik basınç ve sıcaklık gibi kontrollü fiziko-kimyasal ortama ihtiyaç duyar. Bazı hücreler katı ya da yarı-katı substrata bağımlı olup, bu substratlar olmadığında bölünemezler. Bu hücreler yapışkan (adherent) olarak adlandırılırlar. Yapışkan hücreler, organdan elde edilmiş ve bulundukları yer itibariyle zaten hareketsiz ve bağ doku içine gömülü hücrelerdir (Sigma-Aldrich, 2016). Bazı hücre grupları ise kültür ortamında yüzer halde bulunurlar. Bu hücreler süspansiyon kültür adını alır (Thermo Fisher Scientific, 2017). Tüm süspansiyon kültürler kan dolaşım sisteminden elde edilmektedir (Sigma-Aldrich 2016)

2.5.1 HT-29 ve Caco-2 Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı

Bağırsak epitelleri, gıda ve toksinlerin, kan dolaşımına katılmadan önce son bariyeri konumundadır. Bu epiteller; enterositler, goblet, paneth, endokrin ve kök hücrelerin bir arada bulunduğu bileşik yapıdır. Enterositler ve goblet hücreleri, bağırsak epitelinin temel iki hücre tipidir. Emilimi sağlayan enterositlerin apikal (üst) kısmı birçok enzim içeren, fırça yüzeyli, besinlerin emilimini sağlayan yapılardan (mikrovilus) oluşmaktadır. Goblet hücreleri ise, mukus salgılayarak, bağırsak hücrelerinin apikal yüzeyini kaplamakta ve moleküllerin absorpsiyonunu sınırlamaktadır (Nollevaux vd., 2006). *In vitro* çalışmalarda, bağırsak epitel hücre modelleri olarak Caco-2 ve HT-29 hücre hatları sıklıkla kullanılmaktadır. Her iki hücre hattı da tümör orijinli olup farklılaşma özelliğine sahiptir (Luca vd., 2014).

Parental HT-29 hücresi insan kolorektal adenokarsinomundan elde edilmiştir. Bu hücrelerin farklı maddelere adapte edilmiş halleri alt türlerin elde edilmesini sağlar (Nollevaux vd., 2006). İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı olan HT-29, 1964 yılında kolorektal kanserli 44 yaşındaki bir kadında bulunan primer tümörden izole edilmiştir. Epitel morfolojiye sahip bu hücre hattı; *in vitro* çalışmalarda, enterositler ve mukus üreten yetişkin bağırsak hücrelerinin özelliklerini de sergilediğinden, ileriki yıllarda gıda sindirimi, absorpsiyon, taşınım ve biyoyararlılığının araştırılmasında model hücre olarak kullanılmaya başlanmıştır (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 2017; Martinez-Maqueda vd., 2015). Bunun yanı sıra, ilaç ve gıda bileşenlerinin taşınımı, bakteriyel enfeksiyonlarda bağırsak bağışıklık sisteminin cevabı, mikroorganizma canlılığı, adezyon ve invazyon çalışmalarında da kullanım alanı bulmaktadır (Martinez-Maqueda vd., 2015).

HT-29 hücreleri, mikrovilus ve mikrofilament bulunduran; geniş, boşluklu ve siyah granüllü mitokondri ile ribozomsuz endoplazmik retikulum, yağ damlacıkları ve bir kısmı primer çoğunluğu sekonder lizozomlardan oluşan yapıya sahiptir (ATCC, 2016). Caco-2 hücre hattı ve klonları, konfluense ulaştığında kendiliğinden farklılaşarak ince bağırsak enterositlerine benzer absorbtif fenotipe dönüşmektedir (Nollevaux vd., 2006). Parental kolon kanser HT-29 hattı ise çoğunlukla farklılaşmamış hücrelerden oluşmaktadır. Toplam hücrelerin %3-5'i kadar da farklılaşmıştır (Gagnon vd., 2013). Farklılaşan HT-29 hücreleri, mukus üreten goblet hücrelerine dönüşmektedir (Luca vd., 2014). HT-29 hücreleri, birbirine sıkı tutunan tek katman halinde ve apikal (üst) bölgede fırçamsı kenarlı (brush border) görünümüne sahiptir (Martinez-Maqueda vd., 2015).

HT-29 hücre hattı, ilaç ve gıda bileşenlerinin taşınımı çalışmalarında mukus tabakasının etkisi araştırılmak istendiğinde veya bir diğer kolon kanser hücresi olan Caco-2 hücreleri ile kombine halde kullanılmaktadır (Martinez-Maqueda vd., 2015).

Caco-2 bir diğer insan kolon kanseri epitel hücre hattı olup, insanlarda bağırsaklardan ilaç ve diğer bileşenlerin emiliminin belirlenmesinde sıklıkla model olarak kullanılmaktadırlar (van Breeman ve Li, 2005; Nollevaux vd., 2006). Caco-2 hücrelerinin normal hücrelerden farklarından biri, bağırsaktaki normal hücrelerde yüksek miktarda eksprese edilen sitokrom P450 izoenziminin özellikle de CYP3A4

enzimini salgılama yeteneğinin olmayışdır (van Breeman ve Li, 2005; Gratz vd., 2007). Caco-2 hücre hattı heterojen özellikte olup, içerdiği hücreler farklı özellikler göstermektedir. Bu nedenle farklı laboratuvarlarda yapılan aynı denemeler birbiriyle karşılaştırılamayabilirler. Bu durumdan dolayı literatürde farklı Caco-2 hücre hatları tanımlanmaktadır (Venema, 2015).

2.6 Apoptoz

Apoptoz, hücre intiharı olarak da adlandırılan fizyolojik bir olaydır. RNA ve protein sentezi ile enerjiye ihtiyaç duyan, genlerle düzenlenen ve dolayısıyla ne zaman gerçekleşeceği belirli, programlı bir hücre ölümüdür. Bu sürece girmiş olan hücrelerde sistein proteaz kaspazlar (CASP 3, CASP6 ve CASP7) hücre iskeletini parçaladığı için önce sodyum (Na), potasyum (K) ve klor (Cl) taşıma sistemi durmakta, bu nedenle de hücre büzüşerek komşu hücreler ile temas kesilmektedir. Hacmi yarı yarıya azalan hücrelerde, plazma membranının şekli bozulmakta ve zarda çıkıntılar oluşmaktadır. Bu hücrelerde morfolojik değişimlerin yanı sıra birçok enzim aktif hale gelmekte ve bu enzimler apoptozu artık geri dönüşsüz hale getirmektedir. Flipaz enzimi ile hücre zarında fosfatidil serin sitozolden ayrılıp membranın dış yüzeyine taşınmaktadır. Plazma ve çekirdek kondenzasyonunu, kromatin kondenzasyonu izlemektedir. Kromatindeki kondenzasyon, nükleozomlar arası bağlantı bölgelerinin ayrılmaya başladığı aşamadır. Son olarak kaspaz tarafından etkin hale getirilen DNaz (CAD), DNA ayrılmalarını kolaylaştırarak 180-200 baz çifti uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturmaktadır. Bu fragmentler, sitoplazma membranından türeyen küçük kesecikler içine paketlenmekte ve apoptotik yapıları/cisimleri oluşturmaktadır. Bu apoptotik hücreler komşu hücreler tarafından fagositoz yoluyla temizlenmektedirler (Araldi vd., 2015; Coşkun ve Özgür, 2011; Tekin, 2017; Tomatır, 2003). Apoptoz, embriyonik gelişimde, doku homeostazisi ve hastalıklardan korunma mekanizması olarak görev yapmaktadır (Lu vd., 2004).

Apoptozu tetikleyen ajana bağlı olarak, harici (ekstrinsik) ve dâhili (intrinsik) olmak üzere iki yolak bulunmaktadır. Her iki yolak da kaspaz-3 aktivasyonunda birleşmektedir (Wong, 2011). Dâhili yolak iç sinyallerle uyarılan mitokondriyal

yolak, harici yolak ise dış sinyallerle tetiklenen ölüm reseptörleri yolağı olarak bilinmektedir (Ayhan, 2013).

Mitokondriyal apoptotik olaylarının kontrol ve düzeni, Bcl-2 ailesine ait proteinler tarafından sağlanmaktadır. Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bcl-2 grubu proteinler, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eder ve hem apoptotik hem de anti-apoptotik özellik gösterebilmektedirler (Elmore, 2007; Wong, 2011).

Bugüne kadar tanımlanmış Bcl-2 ailesine ait 25 gen bulunmaktadır. Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG proteinleri anti-apoptotik grup içerisinde yer alırken; Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk apoptotik grubu oluşturmaktadır (Wong, 2011; Elmore, 2007). Bu proteinler apoptoz oluşumu veya önlenmesinde özel öneme sahiptir. Bcl-2 ailesine ait proteinlerinin çalışma prensibi, mitokondri membranının devre dışı bırakılarak sitokrom c salınımının düzenlenmesidir (Elmore 2007). Anti-apoptotik grup, mitokondriyal sitokrom-c'nin salınımını bloke ederken, pro-apoptotik proteinler de aynı salınımı teşvik etmektedir (Wong, 2011). Bağırsak epitellerinde eksprese olan Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranı, dahili yolak olan mitokondriyal kaynaklı apoptozun göstergesi olup; bu oranın >1 olması durumunda test edilen moleküllerin apoptotik etkisi olduğu anlaşılmaktadır (Chen vd., 2017). Apoptotik ve anti-apoptotik proteinler olan Bax/Bcl-2 oranındaki bu dengesizlik, mitokondriden sitozole sitokrom c salınımını arttırarak, apoptozdan sorumlu kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktifleşmesine neden olmaktadır (Lin vd., 2017). Aktifleşen kaspaz-3, DNA fragmentasyonunu ve hücre ölüm yolağını aktif hale getirerek apoptozu gerçekleştirmektedir (Ayhan, 2013).

Apoptoz yalnızca belirli eşik değeri aşıldıktan sonra gerçekleşmekte (Khoo vd., 2014) ve eğer DNA tamir edilemeyecek boyutta hasar gördüyse apoptozu başlatmaktadır (Elmore, 2007).

2.7 Apoptoz-Kanser İlişkisi

Kanser, normal hücrelerin genetik değişime uğrayarak kötü huylu hücrelere dönüşmesidir. Apoptoz 1970'li yıllardan beri tümör oluşumu ve hiperplazinin

(dokuda aşırı büyüme) engellenmesi için, kötü huylu olması muhtemel hücreleri eleme yöntemi olduğu düşünülmektedir (Wong, 2011).

Apoptoz, normal fizyolojide mitoz kadar büyük öneme sahiptir. Yetişkin bir insan vücudunda homeostazın sağlanması için günde 10 milyar hücre apoptoz ile ölmektedir. Bu sayı, yaşlanma ve hastalık süresince artış göstermektedir. Apoptozun çok az veya çok fazla olması, gelişim bozuklukları, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer ve ALS) ile kansere yol açmaktadır (Elmore, 2007).

Hücre sinyal yollarında meydana gelen değişimler, apoptozun düzenini bozarak kansere yol açmaktadır (Elmore, 2007). Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, kaspaz fonksiyonunun azalması ve ölüm sinyal reseptörlerindeki bozulma apoptozun gerçekleşmesini engellenmektedir (Wong, 2011). Apoptoza gösterilen direnç, tümör oluşumu ile yakından ilişkilidir (Lee vd., 2016).

Mitokondrinin dış membranında yer alan Bcl-2 proteinleri, dimer yapıda olup, iyon kanallarının veya porların oluşumu gibi membran geçirgenliğinin kontrolünden sorumludur. Normal koşullarda dengede olan bu grup proteinlerin miktarlarındaki düzensizlik, hücreyi kontrolsüz bir apoptoz sürecine sokar veya apoptozun gerçekleşmesini engeller. Anti-apoptotik proteinlerin aşırı, pro-apoptotik proteinlerin gereğinden az ekspresyonu; örneğin Bcl-2'nin aşırı derecede eksprese edilmesi prostat, meme, glioblastoma ve nöroblastoma kanseri hücrelerinin apoptozdan korunmasına; Bcl-XL'in aşırı derecede eksprese olması tümör hücrelerinde çoklu ilaç direnci oluşmasına ve hücrelerin apoptotik sürece girmesine engel olmaktadır (Wong, 2011).

Düşük miktarda sentezlenen kaspazlar ya da kaspazların çalışmasının bozulması da, apoptozun azalması ve kanser oluşumu ile ilişkilidir. Meme, yumurtalık ve servikal kanserlerinde, kaspaz-3 mRNA seviyelerinin çok düşük olduğu tespit edilmiş ya da hiç tespit edilememiştir. Tedavide, kaspaz (kaspaz-3) ekspresyonunun artırılması, meme kanserinde yaşam süresinin uzamasını sağlamaktadır (Wong, 2011).

p53 tümör baskılayıcı geni, hücre döngüsünü düzenleyen transkripsiyon faktörü olup; insanlarda görülen tümörler sıklıkla bu gende meydana gelen mutasyon sebebiyle oluşmaktadır (Elmore 2007). Normal koşullarda p53 geni tarafından sentezlenen p53 proteininin DNA'ya bağlanarak aktifleştirdiği bir diğer genin transkripsiyon ürünü p21 proteini, hücre bölünmesini teşvik eden cdk2 (siklin bağımlı kinaz-2) ile interaksiyona girdiğinde oluşturduğu kompleks, tamir proteinlerini uyararak hücrenin bir sonraki bölünme aşamasına geçmesine engel olmakta ve hücre döngüsünü G₁/S fazında tutmaktadır (Elmore, 2007; NCBI, 1998). Fakat mutant p53, DNA'yı etkili bir şekilde bağlayamadığı için p21 proteini hücre bölünmesi için “dur sinyali” oluşturamamaktadır. Böylelikle hücre bölünmesi ve dolayısı ile tümör oluşumu kontrolsüz olarak gerçekleşmektedir (NCBI, 1998).

Normal hücrelerin p53 iletişim ağı devre dışı kalmadan, kanser hücrelerine dönüşmesi neredeyse imkânsızdır (Vogelstein vd., 2014). Tümör baskılayıcı gende oluşan hasarlar insanda görülen kanserlerin %50'den fazlasından sorumludur. Örneğin, melanoma hücrelerinde, apoptoz ve hücre döngüsünden sorumlu p53 geni aşırı eksprese olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açmaktadır (Wong, 2011).

Apoptoz proteinleri inhibitörleri; apoptoz, sitokinez ve sinyal aktarımını sağlayan proteinler ile benzer yapı ve özelliktedir. Bu inhibitörler, kaspazın aktif bölgesine bağlanarak bloke eder ve substratların bağlanması önler veya aktif haldeki kaspazların parçalanmasına yol açmaktadır. Düzensiz inhibitör protein ekspresyonunun birçok kanser tipinde görüldüğü bildirilmiştir. Bunlardan biri, pankreas kanseri hücrelerinde anormal sentezlenen bu inhibitörler, hücrelerde kemoterapiye karşı direnç oluşmasına neden olmaktadır (Wong, 2011).

Apoptoz, en iyi bilinen hücre ölüm mekanizmasıdır. Doğal maddeler ile ilaçlar tarafından da gerçekleştirilen bu mekanizmasının yanı sıra; yine doğal maddeler tarafından otofajik hücre ölümü, nekroz ve mitotik katastrof gibi farklı ölüm mekanizmaları da görülebilmektedir (Lee vd., 2016). Kanser tedavileri, ölüm reseptörlerini (harici) veya mitokondriyal (dâhili) yolağı aktive ederek apoptozu arttırmayı hedefler. Kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi, laktik asit bakterileri kullanılarak antikanser ilaçlarının üretilmesinde de hedeflenen noktadır.

2.8 Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre duplikasyonundan sorumlu bir takım olaylar zinciridir. Genetik bilginin bir sonraki nesile aktarılması için gerekli olan replikasyon S-fazında; bu bilginin iki yeni yavru hücreye bölünmesi ise mitoz yani M-fazında gerçekleşmektedir. S- ve M- fazları, herhangi bir genetik anomali olmadan, hücrenin doğru bir şekilde ikiye bölünebilmesi için hücre döngüsünde çok önemli olaylardır. Normal bir hücre döngüsünde S-fazını, M-fazı takip eder. S-fazı tamamlanmadan M-fazı gerçekleşmemektedir. Bu iki faz arasında iki hazırlık evresi bulunmaktadır. G_1 fazı, M-fazını S-fazından ayırırken; G_2 fazı ise S ve M fazı arasında yer almaktadır. Hücre farklılaşma yolunda ilerliyorsa, G_1 fazından çıkarak dinlenme evresi olan G_0 fazına geçmektedir (Pucci vd., 2000).

Hücre döngüsü kontrol noktaları bir kontrol sistemi dizisi olup, çoğalmanın yalnızca gelişme faktörleri gibi teşvik edici sinyallerin varlığında gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu noktalar genetik bilginin bir sonraki nesle ataya uygun bir şekilde aktarılmasında görev almaktadır. DNA'nın hasar görmesi veya kromozomlarda yanlış eşleşme durumunda hücre büyümesi durmakta (growth arrest) ve bu kontrol noktaları hücrenin bu hasarları tamir etmesini sağlamaktadır (Pucci vd., 2000).

Hücre döngüsündeki kontrol noktaları; i) G_1 kontrol noktası (G_1/S geçişinde), ii) G_2 kontrol noktası (G_2/M geçişi) ve iii) spindle kontrol noktasından (metafazdan anafaza geçiş) oluşmaktadır. G_1 kontrol noktası, hücrenin geleceğini tayin eden bölünme ya da bölünmeme kararının verildiği esas yerdir. Hücre G_1 fazını geçip S fazına girdiği anda bölünme emri verilmekte ve DNA kopyalanarak çoğaltılmaya başlanmaktadır. Bu fazda hücrenin boyutunun bölünmek için yeterli olup olmadığı, ortamda yeteri kadar besinin olup olmadığı, gelişme faktörlerinin miktarı, çevresel ve mekanik etmenler ile DNA'da hasar olup olmadığı kontrol edilmesi gereken parametreler olduğu belirtilmektedir. Bu fazda eğer bölünme gerçekleşmeyecekse, hücre G_0 fazı olarak adlandırılan dinlenme fazına girmektedir. G_2 kontrol noktasında ise, G_1 kontrol noktasını geçerek bölünme emri verilen hücrede DNA replikasyonu başlamaktadır. DNA'da hasar var mı ya da S-fazı boyunca DNA tamamen kopyalanıp kopyalanmadığı bu noktada kontrol edilmektedir (Biology Noteshelp, 2017).

Apoptoz ve hücre döngüsü arasında doğrudan ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki mitoz ve apoptoz hücre morfolojilerinin oldukça benzer özellik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Her ikisinde de hücre küçülmekte, kromatin kondensasyonu gerçekleşmekte ve membranda çıkıntılar oluşmaktadır (Alenzi, 2004; Pucci vd., 2000).

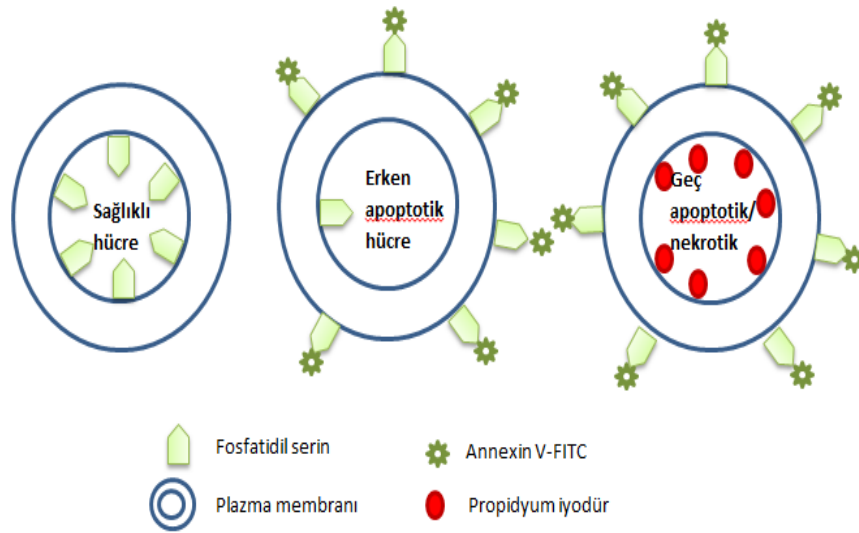
Hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü çok hücreli organizmalarda gerçekleşen temel süreçlerdir. Sağlıklı bir organizmada hücre çoğalması ve hücre ölümünün dengede olması gerekmektedir (Alenzi, 2004; Pucci vd., 2000). Apoptozun kontrolsüz ve aşırı olması dejeneratif hastalıklara yol açarken gerekenden az gerçekleşmesi ya da hücre çoğalmasının gerekenden fazla olması tümör oluşumuna dolayısıyla kansere neden olmaktadır (Ayhan, 2013).

2.8.1 Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyaması ile Apoptoz Tespiti

Apoptotik morfolojinin gösterilmesi ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri akridin oranj-etidyum bromit ikili boyama yöntemidir. Akridin oranj hem ölü hem de canlı hücrelerde DNA'ya bağlanarak kuvvetli bir floresans oluşturmaktadır (Abid-Essefi vd., 2003; Ribeiro vd., 2010). Tek zincirli nükleik aside bağlandığında kırmızı, çift zincirli DNA'ya bağlandığında ise sarı-yeşil floresans vermektedir (Collins, 2004). Etidyum bromit ise yalnızca membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyayabilmektedir. Apoptozun farklı basamaklarında hücrelerde kromatin kondenzasyonu ve membrana bağlı apoptotik yapılar ve bunların içinde çekirdek fragmentleri gözlenmektedir (Abid-Essefi vd., 2003). Erken apoptotik hücreler yeşil olarak boyanırken çekirdeklerinde parlak noktalar görünmektedir (Ribeiro vd., 2010). Kromatin kondenzasyonu erken apoptotik hücrelerde görülen morfolojik bir değişimdir (Abid-Essefi vd., 2003) Geç apoptotik hücreler ise etidyum bromidi hücre içine almakta, yoğunlaşmış ve de çoğunlukla parçalanmış çekirdek görüntüsü oluşturmaktadırlar. Nekrotik hücreler ise turuncu renkte görünmekte ve çekirdek morfolojisi canlı hücrelerdeki çekirdek görüntüsü ile benzerlik göstermektedir (Ribeiro vd., 2010).

2.8.2 Akım Sitometrisi ile Apoptozun Belirlenmesi

Apoptoz, yaşayan organizmada istenmeyen hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayan normal fizyolojik bir işlemdir. Hücrelerde membran simetrisinin bozulması, apoptozun erken belirteçlerinden biridir. Apoptotik hücrelerde membran fosfatidil serini, plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkarak, dış ortama maruz kalmaktadır. Annexin V, 35-36 kDa ağırlığında, Ca^{++} bağımlı fosfolipit bağlayıcı protein olup, fosfatidilserine yüksek afinite gösterir ve apoptotik hücre yüzeyinde yer alan fosfatidil serine bağlanır. Florokorom bağlanmış Annexin V, apoptoz sürecindeki hücrelerin tespitinin hassas bir şekilde yapılabilmesini sağlamaktadır (Hingorani vd., 2011). Sağlıklı hücrelerin apoptotik sürece girmelerinin ardından hücre membranında meydana gelen değişimler Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Sağlıklı ve apoptotik hücreler (Hingorani vd., 2011)

Akım sitometride gerçekleştirilen apoptoz testlerinde, Annexin V, propidyum iyodür (PI) gibi canlılık boyaları birlikte kullanılmaktadır. Canlı hücreler propidyum iyodürün hücreye girmesine engel olur; ancak ölü ya da hasarlı hücre membranları propidyum iyodür boyasını içeri alır. Hem Annexin V hem de propidyum iyodür ile boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirilirken; Annexin V pozitif propidyum iyodür negatif hücreler erken apoptotik, her iki boya ile de pozitif sonuç veren hücreler ise geç apoptotik hücre olarak değerlendirilmektedir (Hingorani vd., 2011).

Akım sitometri yardımıyla yapılan analizlerde dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta ise, Annexin V’nin kalsiyum bağımlı bir protein olması nedeniyle EDTA

ve diğ er kalsiyum bağlayıcı Őelat r içeren tampon ve kimyasalların kullanılmamasına dikkat edilmelidir (Invitrogen, 2017). Bu nedenle yapışkan hücreleri kaldırmak için kullanılan tripsin-EDTA yerine hücre sıyırıcı kullanılması sonuçların güvenirliliği bakımından önem taşımaktadır.

Literatürde bugüne kadar kanser hücre hatlarına apoptotik etkisi çalışılmış olan laktik asit bakterileri ve etki mekanizmaları  izelge 2.2’de özetlenmiştir.



Çizelge 2.2. Laktik asit bakterilerinin çeşitli kanser hücre hatları üzerine etki mekanizmaları

Cins	Tür ve Suş	Etki Ettiği Hücre	Etki Mekanizması	Kaynak
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. johnsonii</i> BCRC17010, <i>L. salivarius</i> BCRC14759, <i>L. brevis</i> PM150 ve PM177, <i>L. plantarum</i> PM153 <i>L. rhamnosus</i> GG	HT-29 Kolon kanseri	Nitrik oksit üretimi Nekroz faktör κ -B yolağının baskılanması ve karsinogenezin önlenmesi	Chen vd., 2017 So vd., 2017
	<i>L. rhamnosus</i> GG	Caco-2, HT-29 ve SW480	Hücre çoğalmasını durdurma, apoptozu etikleme ve hücre döngüsünün durması	Orlando vd., 2016
	<i>L. kefir</i>	Gastrik ve meme kanser hücreleri ile tek çekirdekli periferik kan hücreleri	Doza bağlı olarak yalnızca gastrik kanser hücrelerinde apoptoz	Ghoneum ve Felo, 2015
	<i>L. plantarum</i> L67	HT-29	Isıl işlem ile öldürülen bakterilerden izole edilen proteinin yarattığı sitotoksik etki	Song vd., 2015
	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG	HCT-116 (Metastatik kolon kanser hücresi)	Hem laktik asit bakterileri hem de bakteri süpernatantları tarafından kanser hücrelerinin invazyonunu önleme	Escamilla vd., 2012
	<i>B. adolescentis</i> SPM0212	Caco-2, HT-29 ve SW480	Hücre çoğalmasını ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) üretimini durdurma, hücre morfolojinin değişimi	Kim vd., 2008
	<i>B. adolescentis</i> SPM0212	Caco-2, HT-29 ve SW480	<i>B. adolescentis</i> SPM0212 bütanol ekstraktının, (TNF- α) ve nitrik oksit üretimini arttırması ile tümör hücrelerinde proliferasyonun durması	Lee vd., 2008
	<i>L. acidophilus</i> 606, <i>L. casei</i> ATCC 393	HeLa, MCF7, U-87, HepG2, U2OS ve PANC-1 kanser hücreleri ile HT-29, WiDr, DLD-1 ve CX-1 kolon kanser hücreleri, sağlıklı insan embriyo fibroblast (hEF) hücreleri	<i>L. acidophilus</i> 606'nın ürettiği çözünür polisakkaritler, tüm kanser hücre hatlarında çoğalmanın inhibisyonunda en etkili faktör, HT-29 hücre hattında apoptoz tetikleyicisi	Choi vd., 2006
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i>	MCF7 (Meme kanseri hücresi)	MCF7 hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu. En yüksek etkiyi <i>B. infantis</i> ve <i>L. acidophilus</i> göstermiştir (%85 inhibisyon).	Biffi vd., 1997

2.9 Comet Testi

DNA hasarı ve bu hasarın tamiri çalışmaları insan yaşlanması ve kanserin anlaşılabilmesi için önemlidir (Singh 2016). Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen comet testi, tek hücre bazında DNA hasarını belirlemeye yönelik oldukça sık kullanılan bir analizdir. Hızlı, hassas ve kısmen kolay bir yöntemdir (Kumaravel vd., 2009; Speit vd., 1996). Kırık DNA'nın alkali elektroforez sırasında hücre dışına çıkması ile DNA hasarını yansıtan kuyruklu yıldız görüntüsünden adını alan bu analiz için floresan mikroskop görüntülemeye gereksinim duyulmaktadır (Bedir vd., 2004).

DNA hasarının ölçülmesi ilk olarak 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir (Kumaravel vd., 2009). Radyasyon uygulanmış hücreleri, lam üzerinde agaroz gömdükten sonra lize ederek, nötr koşullarda DNA'nın kısmi açılması ile DNA hasar miktarını doğrudan ölçmüşlerdir. DNA'daki hasarın ölçümü floresan fotometre yardımıyla, nötrleştirildikten sonra akrinin turuncu ile boyanmış hücrelerin yeşil (Çift zincirli DNA'ya bağlanan boya)- turuncu (tek zincirli DNA'ya bağlanan boya) oranına göre yapılmıştır. İleriki zamanda, yine aynı araştırmacılar tarafından bu yöntem geliştirilerek "Mikro jel elektroforez" ismini almıştır. Lam üzerinde agaroz içerisine gömülen hücreler deterjanlar ve yüksek miktarda tuz ile lize edildikten sonra, nötr ortamda kısa süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Hücrelerdeki yüksek DNA hasarı, DNA'nın çekirdekten anoda doğru daha fazla sürüklenmesine yol açmıştır. Göç eden DNA miktarı etidyum bromür ile boyanarak belirlenmiş ve mikroskop fotometresi ile floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Ancak bu yöntemle yalnızca çift zincirli DNA kırıkları tespit edilebilmiş, tek zincir kırıkları tespit edilememiştir (Singh vd., 1988). DNA çift zincir kırıkları, kromozomal anomalilerin oluşumunda kritik öneme sahip birincil hasar şeklidir. Bu kırıklar iyonize radyasyon gibi ekzojen kaynaklar tarafından tetiklenebilmekte veya hücresel süreçlerde oldukça sık bir şekilde doğal olarak gerçekleşebilmektedir (Pfeiffer vd., 2000). Singh vd. (1988) ise, comet testinin alkali versiyonunu geliştirmişler ve hasar miktarının niceliğinin belirlenmesi için DNA göç uzunluğunu (kuyruk uzunluğu) kullanmışlardır (Kumaravel vd., 2009; Singh vd., 1988). Hasarın belirlenmesi, kuyruk uzunluğu ve şekline göre sınıflandırılması ise görsel olarak,

ticari yazılımlar veya kullanıma açık ücretsiz yazılımlar kullanarak gerçekleştirilmektedir (Garcia vd., 2011; Kumaravel vd., 2009)

Comet testi, uygulanan elektroforez çözeltisinin pH'sına göre asit, alkali ve nötr koşullarda gerçekleştirilebilmektedir (Araldi vd., 2015). Singh vd. (1988) tarafından geliştirilen alkali comet testinde, lize olmuş hücreler alkali koşullarda elektroforeze tabi tutularak DNA'nın sekonder yapısı kısmen zarar görmekte, tersiyer ve kuaterner DNA yapıları ise uzaklaştırılmış olmaktadır. Bu koşullar DNA'nın agaroz içindeki hareketini öngörülebilir hale getirmektedir. Ayrıca alkali koşullar RNA'yı degrade ederek DNA'da çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları ve alkali-labil (alkaliye duyarlı) bölgeler gibi daha fazla hasarlı bölgeyi ortaya çıkarır. Böylelikle yalnızca çift zincir kırıklarını tespit eden nötr koşullarda yapılan teste göre alkali koşullar daha hassas sonuç vermektedir (Hartman ve Speit, 1997; Singh, 2016).

DNA sarmal kırıklarını ölçen yöntemler, genellikle sarmal kırığına neden olan ajanların, DNA molekülünün büyüklüğünü azaltması prensibine dayanmaktadır. Burada DNA göçü, hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk, hasara bağlı olarak uzamakta ve kuyruktaki floresan şiddeti, baş tarafa göre kıyaslanarak kırık sayısı hakkında bilgi edinilmektedir (Başbayraktar, 2009).

Çevresel toksik maddeler, kanser ve yaşlanma doku ve hücre tipine özel etki gösterdiklerinden hücreye özel DNA hasarı tespit yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir (Singh vd., 1988). Nötr teknik çift zincir kırıklarının tespitine izin verirken, alkali yöntem tek zincir kırıklarının tespitine olanak sağlamaktadır. Bu tek ve çift zincir kırıkları kromozomal anomali ve genomik değişkenlik (instabilite) ile ilintilidir. Genomik değişkenlik ise doğrudan tümör oluşumu ile bağlantılıdır (Araldi vd., 2015).

Bazı genotoksinler çift zincir kırıklarından 5 ila 2000 kat daha fazla tek zincir kırıklarına yol açmaktadırlar. Bu nedenle DNA hasarının tespitinde nötr koşullar, alkali koşullar kadar hassas değildir. Ayrıca alkali koşullarda hücrede bulunan RNA da degrade olduğundan hatalı sonuçların önüne geçilmiş olmaktadır (Singh vd., 1988).

DNA hasarı, hücre ölümü ile ilgili olduğundan uygulanan en yüksek dozun sitotoksositeye yol açmaması ve sitotoksitenin de eş zamanlı olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için pek çok yöntem bulunmakta olup bu testler toksine maruziyet sonrasında (örn. canlılık boyaları) veya uzun süreli kültürlerde (örn. hücre sayısı, ATP seviyesinin belirlenmesi) yapılmalıdır. Test maddesine maruziyet süresi sonunda yapılan canlılık testlerinde genel yaklaşım, test materyalinin hücre canlılığını azaltmasını önlemektir. Kontrol grubu ile eş zamanlı yapılan deneylerde test maddesine maruz bırakılan hücrenin canlılığının, negatif kontrol grubuna göre %30'dan daha az olmaması gerekmektedir (Tice vd., 2000).

Comet testi için teorik olarak ökaryot hücre kullanılması yeterlidir (Tice vd., 2000). Corcuera vd. (2011) çalışmalarında, Hep G2 hücrelerine Okratoksin A ve AFB₁ uyguladıklarında maruziyet süresini 3 ve 24 saat olarak denemişlerdir. Metabolik aktivasyonun da kullanıldığı denemede, 3 saat sonunda S9 (metabolik aktivasyon karışımı) karışımı ilave edilmemiş hücrelerde DNA hasarı oluşmazken, metabolik aktivasyon karışımının ilave edildiği hücrelerde 30 µM AFB₁ dozundan itibaren DNA hasarının oluşmaya başladığı tespit edilmiştir. Metabolik aktivasyon olmayan hücre gruplarında da 24 saat sonunda DNA hasarı oluşmuştur. Bensassi vd. (2009), deoksinivalenolün bir diğer insan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan HT-29 hücrelerine genotoksik etkisini comet testi ile belirlemiş ve 2 saatlik uygulamanın DNA fragmentasyonu için yeterli süre olduğunu belirlemişlerdir. Bir günlük (24 saat) sonunda oluşan DNA hasarı, kontrol değerinin 4 katına ulaşmıştır (Bensassi vd., 2009).

Speit vd. (1996) yaptıkları çalışmada, çeşitli mutajenlerin comet testinde DNA etkilerini tetiklediğini; ancak testte DNA göçüne yol açan DNA değişimlerinin, gen mutasyonuna yol açan değişimler ile aynı olmadığını belirtmektedirler. Fetal akciğer hücresinden elde edilmiş SV40-transforme MRC5CV1 insan hücre hattı, mutajen (B[a]P)'s, S9 karışımı ile birlikte 2 saat boyunca maruz bırakılmıştır. B[a]P tarafından indüklenen DNA hasarının, hücre hattında mutasyona yol açmadığı ancak comet testinde oldukça kuvvetli genotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. B[a]P, S9 ile oldukça reaktif metabolitlere dönüştürülmüş ve bu genotoksik etki de comet testi ile gösterilmiştir (Speit vd., 1996).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kùltürler

Çalışmada Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakùltesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Mikrobiyoloji Kùltür Koleksiyonunda yer alan, TÜBİTAK TOVAG 106O559 numaralı proje kapsamında, otlu peynir yapımında kullanılan fermente orlardan izole edilmiş, teknolojik ve probiyotik özellikleri bilinen yerel *Lactobacillus plantarum* KPb11 suşu ile Amerikan Tarım Bakanlığı ARS Kùltür Koleksiyonlarından temin edilen *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 standart suşları kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada aflatoksin B₁ (CAS Number 1162-65-8), etil alkol (CAS Number 64-17-5), NaOH (CAS Number 1310-73-2), Na₂-EDTA (CAS Number 6381-92-6) ile MRS Agar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD), QTM PAH Karışımı (16 bileşen, her biri 2000 µg/mL) Supelco (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya), dimetil sülfoksit (DMSO, CAS Number 67-68-5) ve Tris-EDTA (pH 7.5) tampon çözeltisi ChemCruz (Santa Cruz Biotechnology Inc, ABD) firmasından temin edilmiştir. Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen 10x PBS (Lonza, Basel, İsviçre), %0,4'lük tripan mavisi Life Technologies (Life Technologies, CA, ABD), DMEM-Ham's F-12 with 15 mM HEPES, L-glutamin ile tripsin-EDTA (%0,05) Capricorn (Capricorn Scientific GmbH, Almanya), De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth ise Merck (Darmstadt, Almanya) tarafından sağlanmışır.

3.3 Laktobasil Kùltürlerinin Hazırlanması

Laktik asit bakterilerinin aktifleştirilmesinde, DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmışır. Kùltürler %20 gliserol içeren

stoklardan MRS Broth'a 100 µL aktarıldıktan sonra 37 °C'de 18 saat inkübe edilmişlerdir. Aktifleşen bu kültür bir kez daha pasajlandıktan sonra analizlerde kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin canlılıklarının kontrolü ve canlı hücre sayımı MRS-Agarda yayma kültür sayım yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla uygun dilüsyondan ekilen laktik asit bakterileri 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve gelişen koloniler sayılarak kob/mL olarak değerlendirilmiştir.

3.4 Genotoksinlerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan AFB₁ ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar laktik asit bakterileriyle ve hücre kültürleri ile birlikte kullanılabilmesi için farklı şekillerde hazırlanmışlardır.

3.4.1 Aflatoksin B₁'in Hazırlanması

Çalışmada kullanılan AFB₁ çözeltisi, Topçu vd. (2010) tarafından önerilen yöntem uygulanarak hazırlanmıştır.

Amber renkli cam şişe içindeki katı AFB₁, benzen:asetonitril (97:3 v/v) karışımı içerisinde çözündürüldükten sonra karışım temiz, 15mL'lik vida kapaklı plastik tüpe aktarılmıştır. AFB₁ viali yine bu karışım kullanılarak yıkanmış ve bu çözelti de falcon tüpünde toplanmıştır. Elde edilen bu stok çözeltinin spektrofotometrede 300-400 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapılmış ve de maksimum absorbens değerine ulaştığı dalga boyu 348,2 nm olarak belirlenmiştir ($\epsilon_{348}=19800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Spektrum taraması ile elde edilen absorbens değeri;

$$A = (\epsilon \times c \times l) \quad \text{(Denklem 3.1)}$$

eşitliğinde (Lambert-Beer eşitliği) yerine konularak çözeltinin güncel konsantrasyonu hesaplanmıştır (A: absorbens değeri, c: Çözeltinin molar derişimi (mol/L) l: ışık yolu uzunluğu (1 cm), ϵ : Molar absorbsiyon katsayısı (L/mol.cm)).

Biyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere sulu çözeltinin hazırlanabilmesi için benzen:asetonitril karışımı çeker ocak içerisinde azot gazı altında uzaklaştırılmıştır.

Tüp içerisinde kalan katı AFB₁ tamamen çözünene kadar metanol ilave edilip bu karışım 100 mL balon jode toplanmıştır. Metanol ile tamamen çözünen AFB₁, Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile (pH 7) ile hacme tamamlanmıştır (El-Nezami vd., 1998; Haskard vd., 2001; Peltonen vd., 2000; Topçu vd., 2010; Zinedine vd., 2005).

Hazırlanan AFB₁ çözeltisinden ana ve ara stoklar hazırlanmış ve küçük hacimlere bölünerek çalışmada kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

In vitro hücre kültürü çalışmasında AFB₁ içermeyen PBS, uygulama gruplarına uygulanan solvent kontrol olarak kullanılmıştır.

3.4.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Karışımının Hazırlanması

Çalışmada Abou-Arab vd. (2010) tarafından önerilen 16 bileşenli polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) karışımı kullanılmıştır. Bu bileşenler Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından toksisiteleri bakımından öncelikli kirleticiler olarak belirlenmiştir. Bu 16 bileşenin içerisinde 7 tanesi (benzo[a]antrasen, krizen, benzo[a]piren, benzo[a]floranten, benzo[k]flroanten, dibenz[a,h]antrasen ve indeno[1,2,3-cd]piren) muhtemel insan kanserojeni olarak tanımlanmaktadır.

Metilen klorit içinde çözünmüş, her bir bileşenin konsantrasyonu 2000 µg/mL olan bu karışımın, biyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için suda çözünür hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla karışım önce dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüştür. Ardından PBS içerisine aktararak çalışma konsantrasyonu hazırlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan PAH karışımından, son dimetil sülfoksit konsantrasyonu ≤ %0,5 (Solhaug vd., 2004) olacak şekilde besin ortamı içerisine eklenmiştir.

3.5 Laktik Asit Bakterisi-Genotoksin Ko-İnkübasyonu

Laktik asit bakterileri, genotoksinlerle birlikte inkübasyona bırakılmadan önce Cenci vd. (2002) tarafından önerilen yönteme göre hazırlanmışlardır.

Aktif laktobasil kültürleri 18 saatlik inkübasyondan sonra 7500 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj (Nüve NF 1200, Türkiye) edilmişlerdir. Süre sonunda süpernatant atılmış, hücre peleti yıkama amacıyla PBS ile tekrar çözündürülmüştür. Her iki kültürde de aynı işlemi gerçekleştirdikten sonra hücre süspansiyonu tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra, pelet; son hücre konsantrasyonu 10^9 kob/mL olacak şekilde PBS ve PBS içinde çözülmüş genotoksin karışımı ile çözülerek çalışma kültürleri hazırlanmıştır.

Hazırlanan hücre süspansiyonları 6 kuyucuklu plaka içerisine aktarılmış, hücre süspansiyonlarının yanı sıra kalan kuyucuklara, genotoksinlerin zaman ve sıcaklığa bağlı değişiminin de izlenebilmesi için hücre içermeyen genotoksin karışımları ilave edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol amaçlı olarak PBS de 6-kuyucuklu plaka içinde yer almıştır. Aynı gün yürütülen çalışmalarda yalnızca bir genotoksin kullanılmıştır.

Örneklerin plakalara aktarılmasının ardından plaka, 37°C’ye ayarlanmış inkübatör içine yerleştirilen plaka çalkalayıcıya (ISOLAB GmbH, Almanya) yerleştirilmiş, çalkalama hızı ~120 rpm’e ayarlanmıştır. Çalışmalar 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6 Laktik Asit Bakterilerinin Genotoksinleri Bağlama Miktarının Belirlenmesi

L. plantarum ve *L. rhamnosus* NRRL-B 442 kültürlerinin süreye bağlı genotoksinleri bağlama miktarlarını belirlemek amacıyla, yukarıda anlatıldığı şekilde laktobasil-genotoksin ko-inkübasyonu devam ederken 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde örnek alınmıştır. Ayrıca 0. ve 24. saatlerde laktik asit bakterilerinin sayılarındaki değişim belirlenmiştir.

3.6.1 Aflatoksin B₁'in Bağlanması

AFB₁ bağlanma etkinliğinin zamana bağlı olarak değerlendirildiği çalışmada; 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde toplanan örnekler, El-nezami vd. (1998) tarafından da önerildiği şekilde 0.22 µm gözenek çaplı, PES (polietersülfon) membranlı şırınga ucu filtrelerden (Merck-Milipore, Germany) geçirilerek, herhangi bir ekstraksiyona tabi tutulmadan amber renkli viallere aktarılıp HPLC'de analiz edilmişlerdir.

3.6.1.1 HPLC Analizi

İndirgenme miktarı Topçu vd. (2010) tarafından önerilen yönteme göre HPLC (LC-20A, Shimadzu, Japonya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışma, ön koruma kolonu ilave edilmiş ODS-2 C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) (GL Sciences, Japonya) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzokratik akış formunda, dakikada 0.8 mL akış hızına sahip su:asetonitril:metanol (60:30:10) mobil faz karışımı kullanılmıştır. Kolona 20 µL örnek enjekte edilmiş, 30°C kolon sıcaklığında ayırım sağlandıktan sonra yüksek hassasiyetli floresans dedektör (Shimadzu RF-20Ax) yardımıyla veriler toplanmıştır (AFB₁ ex:360 nm, em: 440 nm). AFB₁'in indirgenme miktarı (3.2) eşitliği ile hesaplanmıştır.

$$\text{AFB1 Bağlanma (\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{Örnekteki Mikotoksin Alanı}}{\text{Kontrol Toksin Alanı}} \right] \text{ (Denklem 3.2)}$$

3.6.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Bağlanması

Bu test için 0., 3., 6., 12. ve 24. saatlerde toplanan örnekler mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. İşlem sonunda süpernatant temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bu örnekler ekstraksiyon işlemine kadar -24°C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.6.2.1 HPLC analizi için Örneklerin Hazırlanması

Dondurulmuş olarak saklanan örnekler sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutularak HPLC analizi için hazırlanmışlardır. Örneklerin hazırlanmasında US EPA 3510C ve Karakaş vd. (2004) tarafından önerilen yöntem kombine edilerek kullanılmıştır.

Örnekler 50 mL'lik ayırma hunisine aktarıldıktan sonra üzerine 3 mL diklormetan (DCM) ilave edilmiştir. Organik çözücü ilave edildikten sonra huniler 4 dakika boyunca çalkalanmış ve faz ayrımı için beklenmiştir. Organik faz temiz bir tüpe alındıktan sonra, ayırma balonuna tekrar DCM ilave edilerek işlem tekrarlanmıştır (US EPA 3510C). Ekstraksiyon için kullanılan tüm organik fazlar tek bir tüpte toplandıktan sonra içerisine 50 µL dimetilformamit (DMF) ilave edilip karıştırılmıştır. Bu sayede DCM'in buharlaştırılması sırasında PAH'ların da uçması önlenmiştir. Tüpler azot evaporatörü altına yerleştirilerek azot gazı altında DCM tamamen uçurulmuştur. Tüpler tekrar ~0.5 mL DCM ile yıkanıp amber viallere aktarılmıştır. Vial içindeki DCM tekrar azot altında uzaklaştırıldıktan sonra 950 µL asetonitril ilave edilerek son hacim 1 mL'ye tamamlanmış ve analize hazır hale gelmiştir (Karakaş vd., 2004).

3.6.2.2 HPLC Analizi

PAH'ların indirgenme miktarları DeMuro (2004) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde önerilen floresans (FLD) ve foto diyot dedektörleri (PDA) birlikte kullanmak yerine yüksek konsantrasyon (5 ppm) ile çalışıldığından yalnızca PDA dedektör kullanılmıştır. Analizde PAH'ların tespiti için özel ön arıtma kartuşu ile birlikte Pineacelle II (Restek, ABD) kolon kullanılmıştır. Örnekler kolona 10 µL hacimde otomatik örnekleyici yardımıyla enjekte edilmiş ve mobil faz akış hızı da 1 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Mobil fazlar su (A) ve asetonitril (B) olup gradiyent akış sistemi kullanılmıştır. Gradiyent program Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C olarak; piklerin tespiti için PDA dedektör 280 nm'ye ayarlanmıştır.

Çizelge 3.1. Gradyent program

Süre (dk)	Su (A)	Asetonitril (B)
0.01	%100	0
2.00	%60	%40
30.00	0	%100
32.00	0	%100
32.10	%60	%40
38.00	Stop	
38.00		

Bağlanan % PAH miktarı (3.3) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{PAH Bağlanma (\%)} = 100x[1 - \frac{\text{Örnekteki PAH alanı}}{\text{Kontrol PAH alanı}}] \text{ (Denklem 3.3)}$$

3.7 Hücre Kültürü

Bağırsaklar, gıdalardaki bulaşanların karşılaştığı ilk bariyer olduğundan diğer organlara göre daha yüksek konsantrasyonda bulaşana maruz kalmaktadır (Gao vd., 2016). Bu çalışma kapsamında da, kullanılan genotoksinler mitokondriyal (dâhili) yolak üzerinden metabolik transformasyona uğradığı için; sitokrom c içermeyen Caco-2 hücre hattı yerine, HT-29 hücre hattı kullanılmıştır.

HT 29 hücre hattı, DMEM/Ham's F-12 L-glutamin içermeyen 15 mM HEPES içeren besin ortamında , %10 fetal sıgır serum, %1 penisilin-streptomisin ile %1 L-glutamin ilave edilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş atmosferde inkübe edilmiştir. Hücreler, her üç günde bir %80 konfluense ulaştığında, %0,05 konsantrasyonunda tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmıştır.

3.8 Hücre Senkronizasyonu ve Genotoksin Uygulaması

Hücre senkronizasyonu Chen vd. (2000) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

Genotoksin uygulanacak hücrelerin tamamının aynı mitotik döngüde aynı evrede olması için senkronizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla genotoksin uygulamalarından önce 6-kuyucuklu plaka veya 25 cm²'lik hücre kültürü kaplarına sırasıyla 3 mL ve 5 mL tam besin ortamı içerecek şekilde ekilen hücreler 24 saat gelişime bırakılmışlardır (Hücre sayısı 2×10^5 hücre/mL veya 1×10^6 hücre/mL, sırasıyla). Gelişimin (24 saat) sonunda tam besin ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler 3 kez Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardından hücreler serum açlığı uygulaması nedeniyle %0,04 FBS içeren besin ortamında 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Bu koşullar altında hücreler G₀/G₁ fazında tutuklanmaktadır. Bu süre sonunda %0,04 FBS içeren besin ortamı uzaklaştırılmış ve çalışma konsantrasyonlarında genotoksin bulunan tam besin ortamı (%10 FBS içeren) ilave edilerek hücrelerin gelişimi tekrar teşvik edilmiştir. Yapılan tüm testlerde hücrelere senkronizasyon işlemi uygulanmıştır.

3.9 Comet Testi ile Genotoksisitenin Tespiti

Çalışmada Enzo LifeScience Comet Test kiti kullanılmıştır. Analiz, kit prosedüründe birkaç değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde hazır olarak lizis çözeltisi (2x 500 mL, 4250-050-01), 200 mM EDTA (12,5 mL, 4250-050-04), düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz (LMA, 15 mL, 4250-050-02), CyGreen nükleik asit boyası (20 µL, Enz-Gen105-0020) ve 50 örneklik comet lamı (25 adet, 4250-050-03) bulunmaktadır. Test boyunca gerekli kimyasal ve çözeltilerin listesi ve hazırlanış şekilleri EK 1'de verilmiştir.

3.9.1 Örneklerin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılacak hücreler deneyden hemen önce hazırlanmıştır. Kullanılan genotoksinlerin çözündürüldüğü kimyasallar kontrol gruplarını

oluşturmuşlardır. Pozitif kontrol için 100 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. H₂O₂ uygulaması, 4°C’de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Teste başlanmadan önce genotoksine maruz bırakılan hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Comet testi için genotoksin uygulanmış hücrelerin en az %75’inin canlı olması gerekmektedir. Canlılık testi tripan mavisi yöntemiyle yapılmıştır.

3.9.2 Tripan Mavisi ile Canlılık Testi

Tripan mavisi ile canlılık testi Lonza Teknik Referans Kılavuzu’nda belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (Lonza Technical Reference Guide, 2016). Bu yöntemde negatif yüklü bir boya olan tripan mavisi kullanılmaktadır. Testte hücre membranı zarar görmemiş ve canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte görünmektedir.

Teste tabi tutulacak hücreler uygun ölçüde (1:1) metilen mavisi ile seyreltildikten sonra, elde edilen homojen hücre-boya karışımından 10 µL Neubauer hemositometresi üzerine aktarılmıştır. Mikroskop (Boeco, Almanya) altında 4 kadranda, 1’er satırda kareler içerisinde yer alan boyanmış ve boyanmamış hücreler sayaç yardımıyla sayılmıştır. Tekrarları önlemek için karelerde sağ ve alt çizgiye temas eden hücreler sayıya dâhil edilmemiştir.

Aydınlık saha mikroskopunda sayılan hücreler mavi ve toplam sayı olarak ayrılmıştır. Sayıların ortalaması alındıktan sonra aşağıdaki formül yardımıyla toplam hücre ve % canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Hücre } \left(\frac{\text{Hücre}}{\text{mL}} \right) = \frac{1. \text{ kadradaki Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10^4}{\text{Sayılan Kare Sayısı (1)}}$$

(Denklem 3.4)

$$\text{Canlı Hücre (\%)} = \frac{\text{Boyanmamış Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \text{ (Denklem 3.5)}$$

3.9.3 Comet Testi

Comet testi, kitte belirtilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Test süresince aksi belirtilmediği sürece tüm çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Endojen hasar oluşmasını önlemek için çalışmaya başlamadan önce lizis çözeltisi 4°C'ye soğutulmuştur.

PBS içinde çözünmüş olarak temin edilen LMA kaynar su banyosunda eritildikten sonra hücrelerin termal şoka uğramalarını önlemek için LMA 37 °C'de bekletilerek uygun konsantrasyonda hücre ile karıştırılmış ve hücre- agaroz karışımı comet lamı üzerine aktarılmıştır. Düz ve karanlık ortamda agarozun donması beklenmiştir. Ardından +4°C'ye kaldırılan lamlarda agarozun yaklaşık 20 dakika daha donması beklenmiştir. Böylelikle örneğin lam yüzeyine tutunma özelliği arttırılmıştır. Süre sonunda lamlar önceden soğutulmuş lizis çözeltisi içerisine daldırılmış ve 90 dakika boyunca +4 °C'de hücrel proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla (Collins vd., 1995) lizis işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda içerisinde deiyonize su bulunan kap içerisine lamlar birkaç kez daldırılıp kalan lizis çözeltisi yıkanmıştır.

Temizlenen lamlar taze hazırlanmış alkali çözeltiye (pH>13) daldırılmıştır. Örnek sayısına uygun elektroforez tankı seçildikten sonra tanka yerleştirilen lamlar üzerine alkali çözelti ilave edilmiştir. Karanlık ortamda ve 4 °C'de 45 dakika boyunca alkali açılma (alkali unwinding) işlemi uygulanan lamlar aynı çözelti kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforezin gerçekleşebilmesi için güç kaynağı, gerilim, 25 V (akım 300 mA) olacak şekilde ayarlanmıştır. Gerilimin ayarlanması için uygun miktarda elektroforez tamponu tanka ilave edilmiş veya çıkarılmıştır.

Süre sonunda lamlar tanktan çıkarılıp, deiyonize su ile yıkandıktan sonra 3 kez her biri 5 dakika olmak üzere Tris-HCl (pH 7,5) 4°C'deki nötralizasyon tamponuna daldırılmıştır. Kit yönteminden farklı olarak gerçekleştirilen bu basamak, görüntüleme aşamasında problem oluşturan arka plan gürültüsünün azalmasını sağlamaktadır (Rojas vd., 1999). Lamlar 3 kez 5'er dakika süresince yıkandıktan

sonra %70'lik etanol içeren ışık almayan kap içerisine yerleştirilmiş ve 5 dakika boyunca fiksasyon sağlanmıştır.

Süre sonunda etanol içerisinden çıkarılan lamalar, bir nem çekici ile birlikte gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Bu aşamada görüntüleme aşamasına geçilmeden örnekler saklanabilmektedir. Böylelikle agaroz içinde oluşan derinlik farkı ortadan kaldırılarak hücreler tek bir düzlemde toplanmıştır. Bu aşamadan sonra örneklerin üzerine 50 µL CYGreen nükleik asit boyası eklenerek ve 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda fazla boya uzaklaştırılmış ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Lamalar iyice kuruması için 37 °C'de veya bir nem tutucu ile birlikte kurumaya bırakılmıştır.

Görüntüleme işlemi lazer taramalı konfokal mikroskopta (Nikon C2, Japonya) FITC filtre kullanılarak yapılmıştır.

Görüntülerin değerlendirilmesi Collins vd., (1995) ve Corcuera vd. (2011) tarafından önerilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Comet görüntüleri 5 ayrı grupta toplanmış ve her bir lamdan en az 75 hücre sayılmıştır. Hesaplama Denklem 3.6 eşitliği ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam Comet Hasar Değeri = $[(0 \times \% \text{Hasarsız hücre sayısı}) + (1 \times \% \text{Az hasarlı hücre sayısı}) + (2 \times \% \text{Orta hasarlı hücre sayısı}) + (3 \times \% \text{Hasarlı hücre sayısı}) + (4 \times \% \text{İleri derecede hasarlı hücre sayısı})]$
(Denklem 3.6)

3.10 Apoptotik Hücrelerin Tespiti için Akridin Turuncusu Boyama Testi

Apoptotik hücrelerin görüntülenebilmesi için akridin turuncusu-etidyum bromür ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem çekirdekteki değişimleri ve apoptotik gövdedeki apoptoza özgü hücre karakteristiklerinin görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Akridin turuncusu metakromatik bir boyadır. Bu özelliği nedeniyle çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil ve tek zincirli DNA ve RNA'ya bağlandığında kırmızı/turuncu floresans oluşturur (Invitrogen by Thermo Fisher

Scientific, 2017). Genotoksinlere maruziyet sonrasında apoptoza doğru yol alan hücrelerin tespitinde floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Çekirdekte oluşan değişimler, kromatinin yoğunlaşması, çekirdeğin küçük parçalara ayrılması bu yöntem ile görüntülenebilmektedir. Bu amaçla HT-29 hücreleri, her bir kuyucuk içerisine 18 mm steril yuvarlak lam yerleştirilmiş 6-kuyucuklu plakaya, 3 mL besin ortamı içerisinde 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmişlerdir. 6-kuyucuklu plakada kültürler, hem genotoksin hem de kontrol gruplarını içerecek şekilde yer almaktadır. Hücreler G_0/G_1 fazında sabitlendikten sonra, %10 FBS içeren tam besin ortamı içerisine ilave edilen PBS, genotoksin ve genotoksin+laktobasil karışımı ile 48 saat daha inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda besin ortamı kuyucuklardan atılmış, PBS ile yıkamanın ardından lameller kuyucuklardan çıkarılmıştır. Boyama işlemi, Abid-Essefi vd. (2003) kullandığı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Temiz bir kap içerisine alınan lameller 40 µL, akridin turuncusu (100 µg/mL) ile etidyum bromür (100 µg/mL) boyalarının 1:1 karışımı ile boyandıktan sonra üzerine 10 µL saf su damlatılmış lam üzerine yapıştırılmış ve hızla görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi x20 ve x40 objektifler kullanılarak lazer taramalı konfokal mikroskopta (Nikon C2, Japan) akridin oranj (488 nm) ve etidyum bromür (545nm) filtreleri kullanılarak görüntülenmiştir.

3.11 Akım Sitometrisi ile Apoptoz Tespiti

Akım sitometri için, toplam 5 mL besin ortamı içerisinde 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Hücrelerin ortama alışması ve yapışması için 24 saat beklenmiş, süre sonunda besin ortamı uzaklaştırılıp, kap yüzeyi 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından hücrelerin aynı hücre döngüsünde (G_0/G_1 fazı) olmaları için kısıtlı serum (%0,04 FBS) içeren 5 mL içeren besin ortamı ilave edilmiştir. İnkübasyon süresinin (24 saat) sonlanmasının ardından besin ortamı tekrar uzaklaştırılmış, yerine uygulama gruplarında yer alan katkıları ilave edilerek 48 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücre yüzeyi PBS ile yıkanarak kalıntı FBS uzaklaştırılmış ve hücre sıyırıcı yardımıyla hücreler kap yüzeyinden ayrılmıştır. Bu aşamadan sonra, eBioscience kit içeriğinin apoptoz prosedürüne geçilmiştir.

Yıkanan hücreler 195 μ L 1x bağlama tamponu ile karıştırılmıştır. Üzerine 5 μ L AnnexinV boyası ilave edilmiş ve karanlıkta 10 dakika beklenmiştir. Süre sonunda hücrelerin üzerine tekrar 200 μ L bağlama tamponu eklenmiş ve yavaşça vortekslenerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Yıkandıktan sonra 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Son olarak hücrelere 190 μ L bağlama tamponu eklenmiş ve analizden hemen önce 10 μ L propidyum iyodür ilave edilmiştir. Analiz, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde bulunan Beckman Coulter Flow Cytometer cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.12 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada denemeler 2 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Uygulanan işlemlerden elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak SPSS Statistics 24 (IBM, ABD) paket programı ile Duncan testi yardımıyla uygulama grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak 0,95 güven aralığında analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 AFB₁ ve PAH İçeren Ortamda Laktik Asit Bakterilerinin Zamana Bağlı Hücre Sayısı Değişimi

Ön denemelerle, 18 saatlik laktik asit bakterisi sıvı kültürlerinden elde edilen ortalama hücre sayısı yaklaşık 10^9 kob/mL olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bağlama analizleri için 18 saat sonunda elde edilen hücrelerin tamamı doğrudan kullanılmış, sayı ayarlama yöntemine başvurulmamıştır. Bu nedenle bazı gruplarda başlangıç laktik asit bakterisi sayıları arasında farklılık gözlenebilmektedir. Ayrıca tüm denemelerde başlangıç hücre sayısının aynı ya da çok yakın olması önem arz ettiğinden, uygulanan genotoksin grubu ile kontrol grupları birlikte istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuştur. İki tekrarlı yürütülen çalışmada, kontrol (PBS) ve genotoksinler ile inkübasyon başlangıcı ve sonundaki *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 sayısının değişimi Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Genotoksin-laktobasil ko-inkübasyonu süresince *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* canlı hücre sayısı değişimi ($\log \text{ kob/mL} \pm \text{SS}^{**}$)

Çalışma Grubu	İnkübasyon Süresi (saat)	
	0.	24.
<i>L. plantarum</i> +PBS	9,63 ^{a*} ±0,47	9,76 ^a ±0,39
<i>L. plantarum</i> +AFB ₁	10,10 ^a ±0,93	10,10 ^a ±0,76
<i>L. rhamnosus</i> +PBS	9,77 ^a ±0,24	9,79 ^a ±0,08
<i>L. rhamnosus</i> +AFB ₁	10,14 ^a ±0,81	10,11 ^a ±0,75
<i>L. plantarum</i> +PBS	9,35 ^{a,b} ±0,03	9,31 ^b ±0,01
<i>L. plantarum</i> +PAH	9,53 ^a ±0,04	9,54 ^a ±0,13
<i>L. rhamnosus</i> +PBS	9,44 ^a ±0,24	9,39 ^a ±0,08
<i>L. rhamnosus</i> +PAH	9,53 ^a ±0,81	9,34 ^a ±0,75

n=2 * Tabloda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı ($p<0,05$), aynı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farksızdır ($p>0,05$). Karşılaştırmalar her bir genotoksin ve ona ait kontrol grubundaki canlı laktik asit bakteri sayısı arasında, 0. ve 24. saatlerde elde edilen sayım sonuçları baz alınarak karşılaştırılmıştır. **Standart Sapma

Ortamda herhangi bir besin maddesi bulunmadan, tampon çözelti olan PBS içerisinde laktik asit bakterilerinin canlılıklarını korudukları görülmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında çalışabilen *L. plantarum* için bu canlılık beklenen bir durum iken *L. rhamnosus*'un da canlılığını kaybetmemesi türlerin üstün özellikleri olduğunu göstermektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre hem *L. plantarum* hem de *L. rhamnosus* NRRL B-442'nin PBS ve AFB₁ içinde süspanse edilerek hazırlanmış çalışma gruplarında, canlı hücre sayılarında meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde hem *L. plantarum* hem *L. rhamnosus* NRRL B-442, PBS ve PAH karışımı içerisinde süspanse edildikten sonra canlılıklarını 24 saat boyunca korudukları belirlenmiştir. *L. plantarum*'un PAH karışımı ile süspanse edildiği grupta, kontrol olan PBS grubunda 0. ve 24. saatteki canlı *L. plantarum* sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). PBS ile hazırlanan *L. plantarum*'un 24 saat sonundaki canlı hücre sayısı ile PAH ile hazırlanan *L. plantarum* canlı hücrelerinin sayısı arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum uygulamadan bağımsız olarak *L. plantarum*'un PBS içinde süspanse edilen başlangıç hücre sayısının düşük olmasından kaynaklanmaktadır. *L. rhamnosus* NRRL B-442 hücreleri, ayrı ayrı PAH ve PBS ile karıştırıldıktan sonra 0. ve 24. saatlerde ortamda bulunan canlı hücre sayılarında hem gruplar hem de saatler arasında istatistik olarak önemli değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$). Yani kullanılan her iki laktik asit bakterisi türü de hem kontrol ve genotoksin uygulama grupları içerisinde canlılıklarını kaybetmeyerek çalışma süresince canlılıklarını korumuşlardır.

Konu ile ilgili literatür incelendiğinde mutajen olduğu bilinen farklı (4-nitrokinolin, furazolidon ve N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidin) genotoksinlerin laktik asit bakterileri tarafından uzaklaştırılmasına dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Kullanılan bu mutajenler, bu çalışmada kullanılan toksinlerden farklı olsa da laktik asit bakterilerinin hazırlanış şeklinin benzerliği nedeniyle, bu mutajenlerin bulunduğu ortamda gösterdikleri canlılık derecesi ve mutajen uzaklaştırma miktarları bizim çalışma verilerimiz ile karşılaştırılabilecek parametrelerdir. Bu kapsamda, Cenci vd. (2002)'nin, 65 farklı laktobasil suşu (*L. rhamnosus* ile *L. plantarum* türleri dahil) ve 2 bifidobakterinin, 4-nitrokinolini (4-

NQO) indirgeme yeteneğini araştırdığı çalışmada, tüm suşların %92'sinin canlı olduğu, sadece *L. acidophilus*'un %75 oranında canlılık gösterdiği tespit edilmiştir.

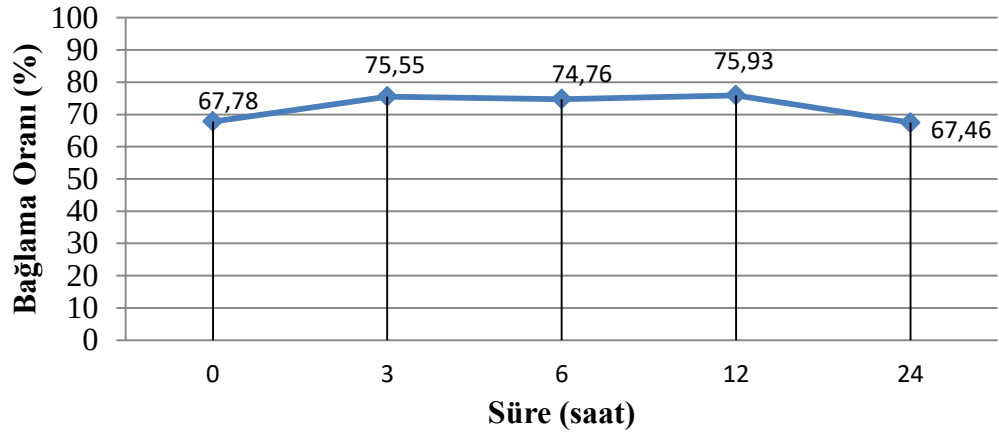
Caldini vd. (2005) tarafından da laktik asit bakterilerinin 4-NQO ve N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidin (MNNG) içeren ortamda canlılıkları test edilmiş; bu çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzer şekilde hem *L. plantarum*'un hem de *L. rhamnosus*'un kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılığını yüksek oranda koruduğu belirlenmiştir. 4-NQO içeren ortamda *L. plantarum* sayısı, kontrol grubuna göre ortalama %6,6 oranında azalma gösterirken, *L. rhamnosus* %8,1 oranında canlılık kaybına uğramıştır. MNNG içeren ortamda ise her iki bakterinin de canlı hücre sayıları, kontrol grubuna göre %6,6 oranında azalış göstermiştir.

Raipulis vd. (2005) ise yine türe ve suşa bağlı olarak; laktik asit bakterilerinin genotoksin furazolidon ile ko-inkübasyonunda, kontrol grubuna göre %90 ve üzeri canlılık gösterdiklerini tespit etmişlerdir. En yüksek ölüm oranı (%33) *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus*'ta görülmüştür.

Conway vd. (1987) tarafından mide sıvısı içerisinde bulunan bazı bileşenler bakteri hücrelerini koruyucu etki göstermeleri nedeniyle *Lactobacillus* türlerinin, PBS içerisinde mide sıvısından daha düşük canlılığa sahip oldukları ifade edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kullanılan probiyotik türlerin PBS içinde canlılıklarını koruması nedeniyle Conway vd. (1987)'nin önermesine karşı gelmektedir. Bunun dışında diğer araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlar ise bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyum gösterdiği görülmektedir.

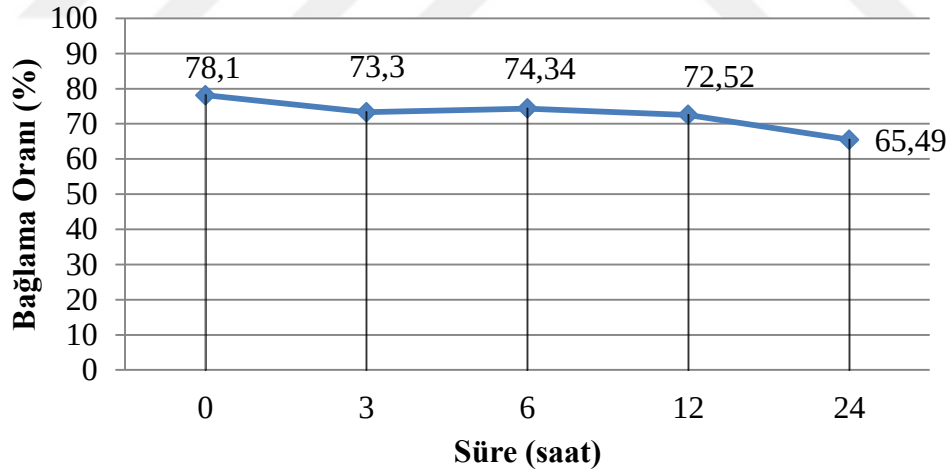
4.2 AFB₁'in Laktik Asit Bakterileri Tarafından Bağlanma Miktarı

Alınan sonuçlar doğrultusunda *L. plantarum*'un zamana bağlı olarak AFB₁'i bağlama miktarındaki değişim Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre AFB₁'in en fazla miktarda ortamdan uzaklaştırılabilmesi için *L. plantarum* ile 12 saat boyunca temas halinde olması gerektiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. *L. plantarum* ile AFB₁ ko-inkübasyonunda zamana bağlı AFB₁ konsantrasyonu % azalış miktarı

L. rhamnosus NRRL B-442'nin AFB₁'i bağlama oranındaki değişim ise Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Bu verilere göre bakterinin, AFB₁ ile karşılaştığı anda en fazla miktarda mikotoksini ortamdan uzaklaştırdığı belirlenmiştir. *L. plantarum*'dan farklı olarak uzayan inkübasyon sürelerinde, bakteri AFB₁ bağlama özelliğini kaybetmekte ve bağladığı AFB₁'i ise ortama geri bıraktığı belirlenmiştir.



Şekil 4.2. *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile AFB₁ ko-inkübasyonunda zamana bağlı AFB₁ konsantrasyonu % azalış miktarı

Analiz edilen örneklerde *L. plantarum* tarafından ortamdan uzaklaştırılan AFB₁ miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Yani inkübasyonun başlangıç (0. saat) ve bitiş (24. saat) saatleri arasında uzaklaştırılan AFB₁ miktarları arasındaki önemli fark bulunmamaktadır. Yine de en

yüksek AFB₁ bağladığı inkübasyon süresi olan 12 saatin en uygun süre olacağı değerlendirilmektedir. Bu sonuçtan farklı olarak *L. rhamnosus* NRRL B-442 suşu tarafından zamana bağlı ortamdan uzaklaştırılan AFB₁ miktarlarının; bakteri ve mikotoksinin ortak inkübasyonunun başlangıç (0. saat) ve bitiş (24. saat) saatlerine göre değişim gösterdiği ve süreler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). AFB₁'in, *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından bağlanmasının oldukça hızlı bir işlem olduğu; *L. rhamnosus*, *L. plantarum*'dan farklı olarak daha kısa sürede daha fazla AFB₁'i ortamdan uzaklaştırdığı için ve optimum inkübasyon süresi olarak başlangıç anı (0. saat) olarak belirlenmiştir. Benzer sonuç, *L. rhamnosus* GG ile çalışan El-nezami vd. (1998) tarafından da alınmış olup, *L. rhamnosus* GG tarafından AFB₁'in çok hızlı bağlandığı belirtilmektedir. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442'un zamana bağlı AFB₁ bağlama oranları ve gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme sonuçları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus*'un zamana bağlı AFB₁ bağlama miktarları (% Bağlama±SS**)

<i>L. plantarum</i>		<i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442	
Süre	Bağlama (%)	Süre	Bağlama (%)
0. saat	67,78 ^{a*} ±8,56**	0. saat	78,10 ^a ±7,24
3. saat	75,55 ^a ±1,61	3. saat	73,30 ^{a,b} ±0,55
6. saat	74,76 ^a ±3,42	6. saat	74,34 ^{a,b} ±0,91
12. saat	75,93 ^a ±4,87	12. saat	75,52 ^{a,b} ±6,63
24. saat	67,46 ^a ±2,01	24. saat	65,49 ^b ±2,79

n=2 * Tabloda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı ($p<0,05$), aynı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farksızdır ($p>0,05$). Her bakteri grubu, kendi içerisinde değerlendirilmiştir. ** SS: Standart sapma

Çizelge 4.2 incelendiğinde, artan inkübasyon sürelerinde, ortamda bulunan serbest AFB₁ miktarının arttığı görülmektedir. Bu durum laktik asit bakterilerinin AFB₁'i tersinir olarak bağladığı, uzun süreli inkübasyonlarda geri bırakmanın arttığını göstermektedir.

Literatürde yer alan veriler ışığında, birçok araştırmacının farklı yöntemlerle genotoksinleri özellikle de aflatoksinleri laktik asit bakterileri yardımıyla başarılı bir şekilde etkisizleştirdikleri görülmektedir.

Laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin genotoksin bağlama etkinlikleri; suşa, mutajen konsantrasyonuna, mutajenin kimyasal yapısına, bakterinin gelişme fazına, ortam pH'sı ve iyon gücüne, inkübasyon/fermentasyon süresi ve ortam tipine bağlı olarak değişmektedir (Khorshidian vd., 2016).

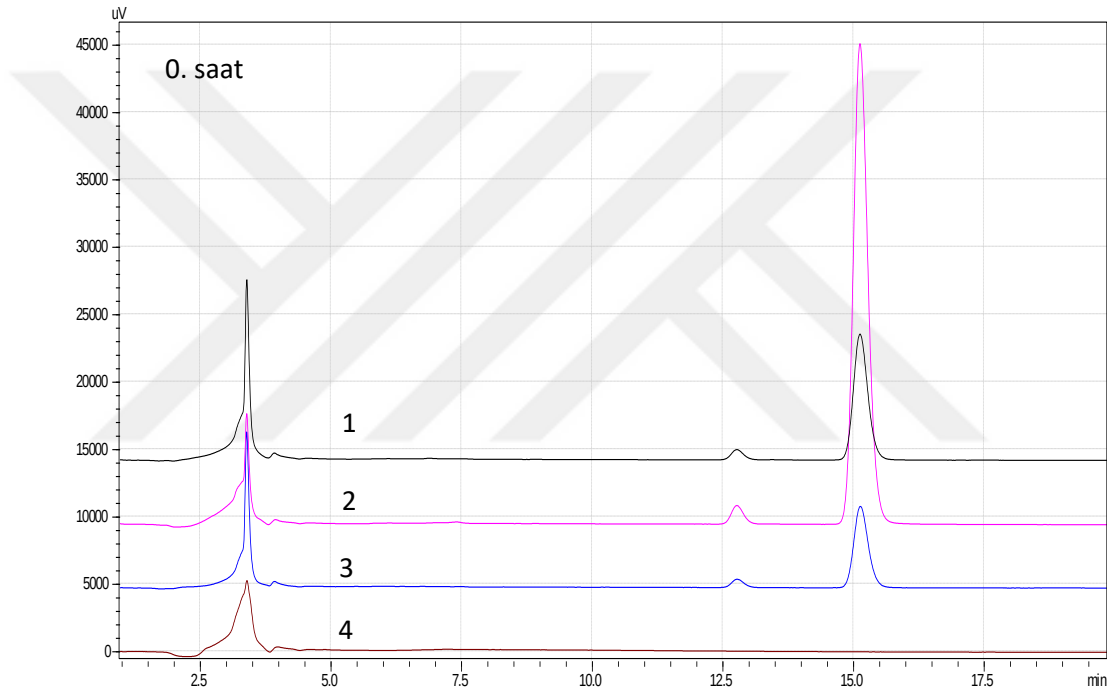
Peltonen vd. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kullandıkları *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait laktik asit bakterilerinin ortamda bulunan serbest AFB₁'i farklı miktarlarda bağladıkları belirlenmiştir. Bu çalışmada *L. johnsonii* LJ-1 ve *L. paracasei* F19 ortamda bulunan serbest AFB₁'in %30'unu bağlayarak en çok bağlama etkinliği gösteren türler olmuşlardır.

Fazeli vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise ekşi hamurdan elde edilmiş yerli izolatlar olan *L. plantarum* ve *L. fermentum*'un AFB₁'i uzaklaştırma etkinliği belirlenmiştir. Bakteri konsantrasyonu 2×10^{10} kob/mL olarak ayarlanmış ve AFB₁ içeren ortamda 37 °C'de 72 saat inkübasyon sonunda ortamdaki AFB₁ miktarı %25'ten %61'e kadar miktarı azalış göstermiştir. Bir diğer çalışmada ise, *L. plantarum* ve *L. lactis*'in, ortamda bulunan serbest AFB₁'i bağlama kabiliyeti araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulugulara göre; *L. plantarum*'un (%46) *L. lactis*'e (%27) göre daha üstün özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu iki laktik asit bakterisi ayrı tüplerde üretilip sonradan birleştirildiğinde, uzaklaştırdıkları AFB₁ miktarı %59'a çıkarken; başlangıçtan itibaren birlikte inkübe edilen bakterilerin ise AFB₁'in %81'ini bağladığı; ayrıca bu ortak kültürde üretilen bakteriyosinlerin de AFB₁'i bağladığı (%90) tespit edilmiştir (Sezer vd. 2013).

Zeytinlerin depolanma süresi boyunca AFB₁ üretimi ve birikiminin araştırıldığı çalışmada, *L. plantarum*'un küf gelişimini ve dolayısıyla AFB₁ üretimini engellediği belirlenmiştir. Başlangıçta, 11 µg/kg olarak belirlenen AFB₁ miktarı, *L. plantarum* inoküle edildikten sonra 5,9 µg/kg olarak ölçülmüş ve küf miktarını da %86,3 oranında azaldığı belirlenmiştir. Elektron mikroskobundan alınan görüntülerle, *L. plantarum*'un zeytin yüzeyinde biyofilm oluşturarak, yarattığı oksijen rekabeti nedeniyle maya ve küflerin çoğalmasını engellediği belirlenmiştir.

(Kachouri vd., 2014). Yapılan bu çalışma ile benzer şekilde Fuchs vd. (2008), yaygın bulunan iki mikotoksin olan okratoksin A ve patulinin, laktik asit bakterileri tarafından detoksifiye etkilerini araştırmışlardır. Mikotoksin ile kontamine sıvı besiyerinde *L. acidophilus* VM 20'nin okratoksin A miktarında %95 ve *B. animalis* VM 12'nin patulin miktarında %80 düşüşe yol açtığını belirlemişlerdir.

L. plantarum ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile birlikte inkübe edilen AFB₁'in zamana bağlı ortamdaki uzaklaştırılmasına ait HPLC kromatogramlar Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

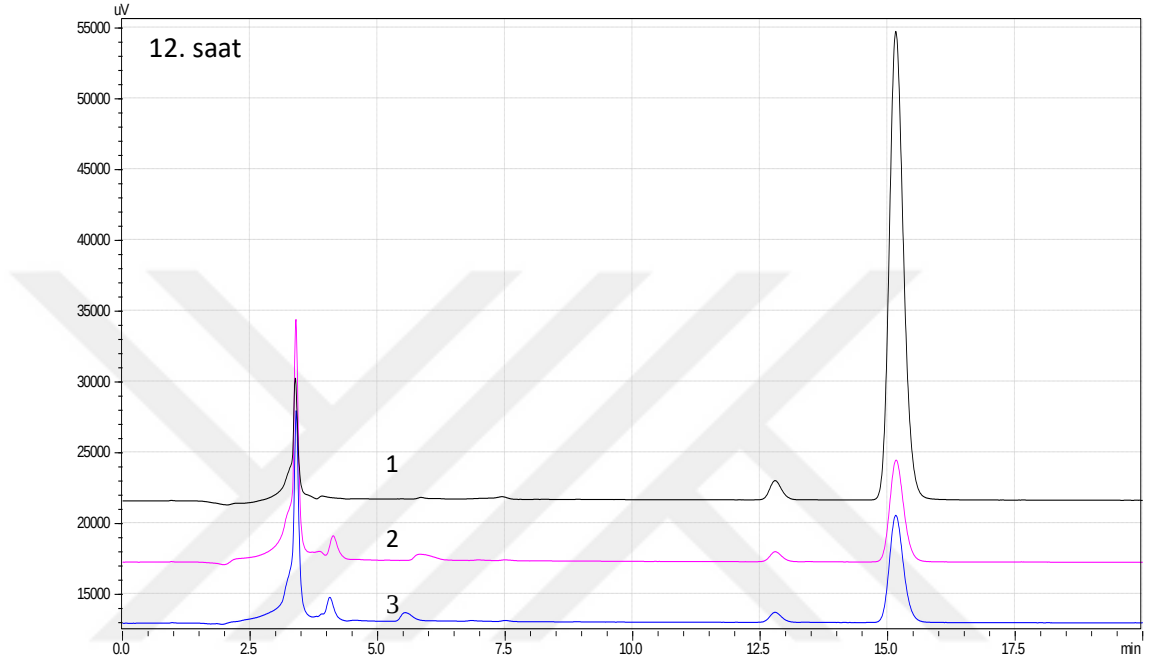


Şekil 4.3. Bağlanan AFB₁'e ait kromatogram (0. saat)

(1) *L. plantarum*+AFB₁; (2) AFB₁ (5 ppm); (3) *L. rhamnosus*+AFB₁ (4) PBS

Kromatogramlar incelendiğinde, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda AFB₁'in stabilitesini koruduğu görülmektedir. Yani laktik asit bakterileri ile bir arada bulunduklarında, ortamdaki serbest AFB₁'in miktarındaki azalış termal degradasyon nedeniyle değil, kullanılan laktik asit bakterilerinin etkisi ile gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra AFB₁'in mikrobiyal yolla etkisizleştirme yöntemlerinde kaygı duyulan en önemli nokta; yeni, toksik yan ürünlerin oluşmasıdır. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile birlikte inkübe edilen AFB₁'in herhangi bir kimyasal parçalanmaya uğramadan ortamdaki uzaklaştırıldığı, yani bu etkisizleştirme işleminin

fiziksel bir işlem olduğu anlaşılabilmektedir. AFB₁'e komşu olan yavru pikin ise, AFB₁'in depolanması sırasında oluşan parçalanma ürünü olma ihtimali yüksektir. Çünkü inkübasyonun başlangıç ve bitiş saatlerinde gerek yalnız AFB₁, gerekse laktik asit bakterisi-AFB₁ karışımlarında da bulunması, uygulanan işlemler öncesinde oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. Bağlanan AFB₁'e ait kromatogram (12. saat)
(1) AFB₁ (5 ppm); (2) *L. plantarum*+AFB₁; (3) *L. rhamnosus*+AFB₁

Haskard vd. (2001), AFB₁ bağlama etkinliği bakımından *L. rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* LC-705 suşlarının üstün olduğunu belirtilmektedir. Farklı laktobasil, propiyonibakter ve streptokokların AFB₁ bağlama kapasiteleri araştırıldığında bu suşların ortamdaki serbest AFB₁'in %78,9 ve %76,5'ini diğer suşlara göre daha kararlı şekilde bağladıklarını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırıldığında, AFB₁ bağlama yüzdesi ve süresi göz önüne alınarak, *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 (%78,1) suşunun da diğer *L. rhamnosus* suşlarına benzer şekilde üstün özellikli bir suş olduğu söylenebilir.

Peltonen vd. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, 24 saat süreyle laktik asit bakterisi ve bifidiobakteri ile inkübe edilen AFB₁'in %5,6'sı ile %59,7'sinin bu bakteriler tarafından uzaklaştırıldığı rapor edilmiştir. *L. amylovorus*

ve *L. rhamnosus* türleri, serbest AFB₁'in %50'sini uzaklaştırmaları nedeniyle çalışmada kullanılan 20 bakteri içinde en etkili türler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmamızda tespit edilen optimum bağlama süresine benzer şekilde, kullandıkları bakterilerin de AFB₁'i bağlamasının hızlı bir proses olduğu nu belirtmektedirler.

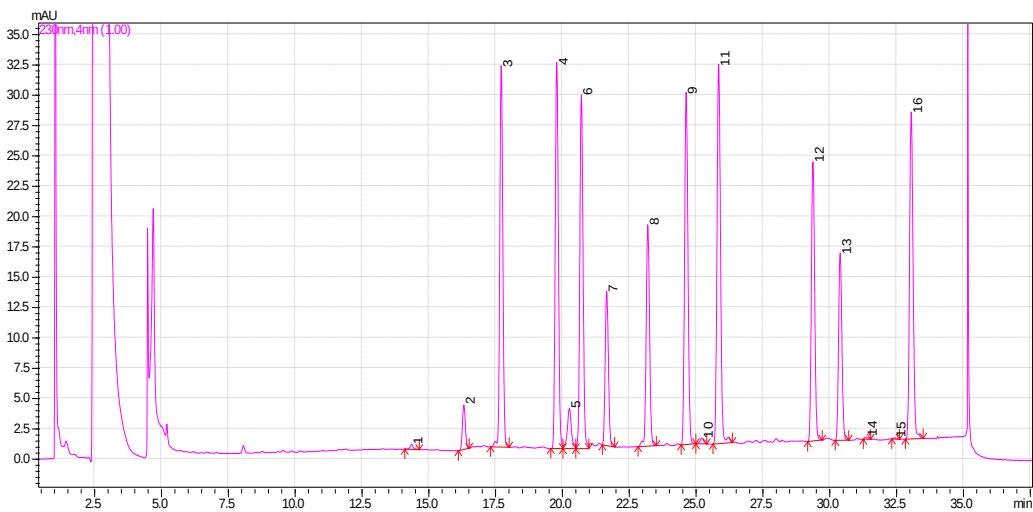
AFB₁, süt ürünlerinde hidroksillenmiş metaboliti olan AFM₁ olarak bulunabilmektedir. Ayrıca AFB₁'in %1,1-2,2'si, insan metabolizmasında sitokrom enzimleri tarafından AFM₁'e dönüştürülmektedir. Bu dönüşüm ve süt ürünlerinden kaynaklanan AFM₁'e maruziyet dolayısıyla, AFM₁'in de laktik asit bakterileri kullanılarak giderimi çalışılmıştır. Yapılan çalışmada, AFM₁'in laktik asit bakterileri tarafından en fazla %25 oranında bağlandığı tespit edilmiştir (Serrano-Niño vd. 2013). AFB₁ bağlama çalışmalarında laktik asit bakterileri tarafından %85'e kadar çıkan bağlama oranının AFM₁'de bu kadar düşük olmasının nedeni, AFM₁'in fazladan -OH grubu içermesi nedeniyle AFB₁'e göre daha polar özellik göstermesi ve bu hidrofilik özellik nedeniyle suda çözünürlüğünün de artış göstermesi şeklinde açıklanmıştır (El-Nezami vd., 1998). Haskard vd. (2000) tarafından elde edilen sonuçlarda ise; AFB₁'in *L. rhamnosus* GG tarafından çoğunlukla karbonhidrat ağırlıklı bileşenlerce bağlandığı tespit edilmiştir. Hidrofobik etkileşimlerin bu bağlanmada temel rol oynadığı, elektrostatik etkileşimlerin de bağlanmaya az da olsa katkısı olduğu; hidrojen bağının katkısı ise bulunmadığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada, AFB₁ içeren sulu çözeltide *L. reuteri* NRRL 14171 ve *L. casei* Shirota tarafından AFB₁ bağlanma miktarı ve bağlanma işlemine protoplast, sferoplast ve hücre duvarı bileşenlerinin etkisinin yanı sıra; bu bakterilerde AFB₁ bağlama etkinliğine taykoik asitlerin etkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak, AFB₁ bağlanmasının pH'ya ve suşa bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Araştırılan bu bakterilerde, AFB₁'in bağlanmasından taykoik asitlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir (Hernandez-Mendoza vd., 2009).

Wollowski vd. (1998) tarafından, gıda matriksinde bakteriyel proteazlar tarafından katalizlenen tiyol içeren protein parçalanma ürünlerinin, MNNG veya diğer kanserojenlerin laktik asit bakterileri tarafından etkisiz hale getirilip, kolon mukoza hücrelerinde oluşan hasarın düşmesinde etkili oldukları ifade edilmektedir. Mikotoksinler dışında laktik asit bakterilerinin mutajenitesi bilinen kimyasalları

etkisizleştirme çalışmaları da yapılan araştırmalar arasında yer almaktadır. Bu kapsamda, *L. rhamnosus* IMC 501'in 4-NQO'e karşı gösterdiği antigenotoksik etki Verdenelli vd. (2010) tarafından araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, 4-NQO'in *L. rhamnosus* IMC 501 suşu ile ko-inkübasyonu öncesi ve sonrasında ortamdan uzaklaştırılan 4-NQO miktarındaki sayısal değişim gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, 4-NQO'nin genotoksisitesinin *L. rhamnosus* IMC 501 tarafından inhibe edilerek, bileşiğin daha az toksik bileşenlere dönüştürüldüğü rapor edilmiştir (Verdenelli vd., 2010).

4.3 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Bağlanması

Türk Gıda Kodeksi Kalıntı ve Bulaşanlar Tebliğine göre gıdalarda bulunması sınırlandırılan ve kontrole tabi olan PAH bileşenleri benzo[a]piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten ve krizendir. Bu kapsamda hem *L. plantarum* hem de *L. rhamnosus* NRRL B-442'nin PAH bileşenlerini bağlama etkinliği, özellikle bu bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılma miktarı açısından değerlendirilmiştir. Çevre ve gıdaya kontamine olan PAH'lar tek tek değil sıklıkla kombinasyon halinde çoklu bileşenler şeklinde bulunduğundan bu çalışmada 16 bileşenli PAH karışımı kullanılmıştır. Karışım olarak temin edilen PAH standardının bileşenlerine ait kromatogram Şekil 4.5'te, bileşenler Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

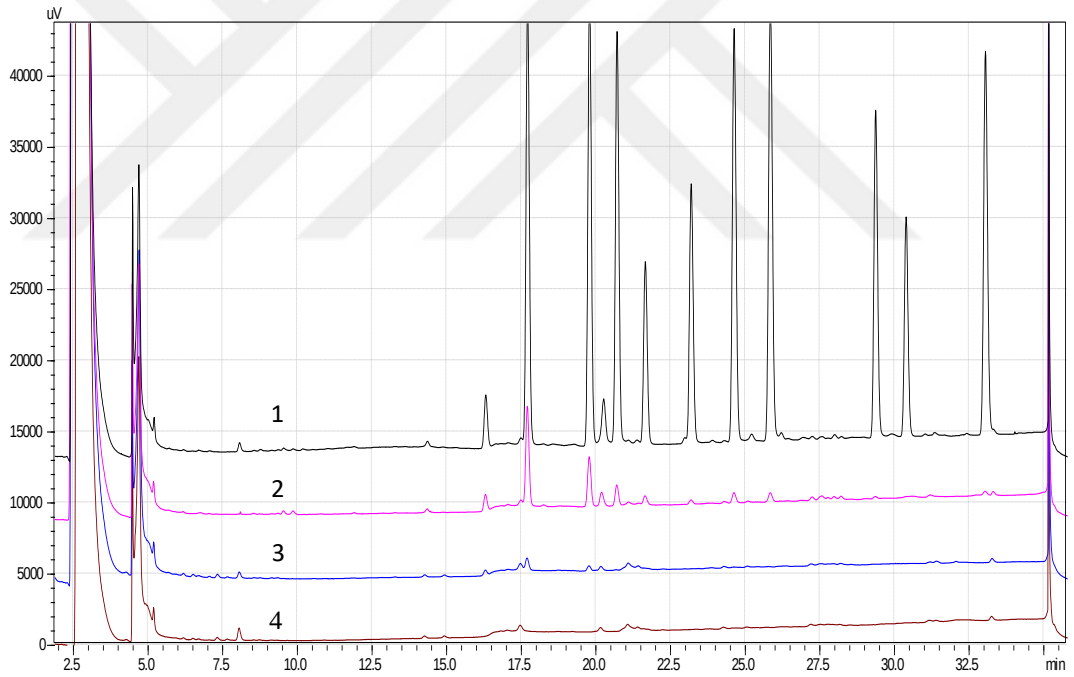


Şekil 4.5. Onaltı bileşenden oluşan PAH karışımına ait kromatogram

Çizelge 4.3. Kromatogramda görülen PAH bileşenlerinin isimleri

Pik No	Bileşen	Pik No	Bileşen
1	Naftalen	9	Piren
2	Asenaftilen	10	Benzo[a]antrasen
3	2-Bromonaftalen	11	Krizen
4	Asenaften	12	Benzo[b]floranten
5	Floren	13	Benzo[a]piren
6	Fenantren	14	Indeno[1,2,3-c,d]piren
7	Antrasen	15	Dibenz[a,h]antrasen
8	Floranten	16	Benzo[ghi]perilen

Analizde kullanılan PAH'ların başlangıç karışımı ve laktik asit bakterileri ile inkübasyonundan sonra elde edilen sonuçların karşılaştırması Şekil 4.6'da kromatogramlar karşılaştırılarak gösterilmiştir.

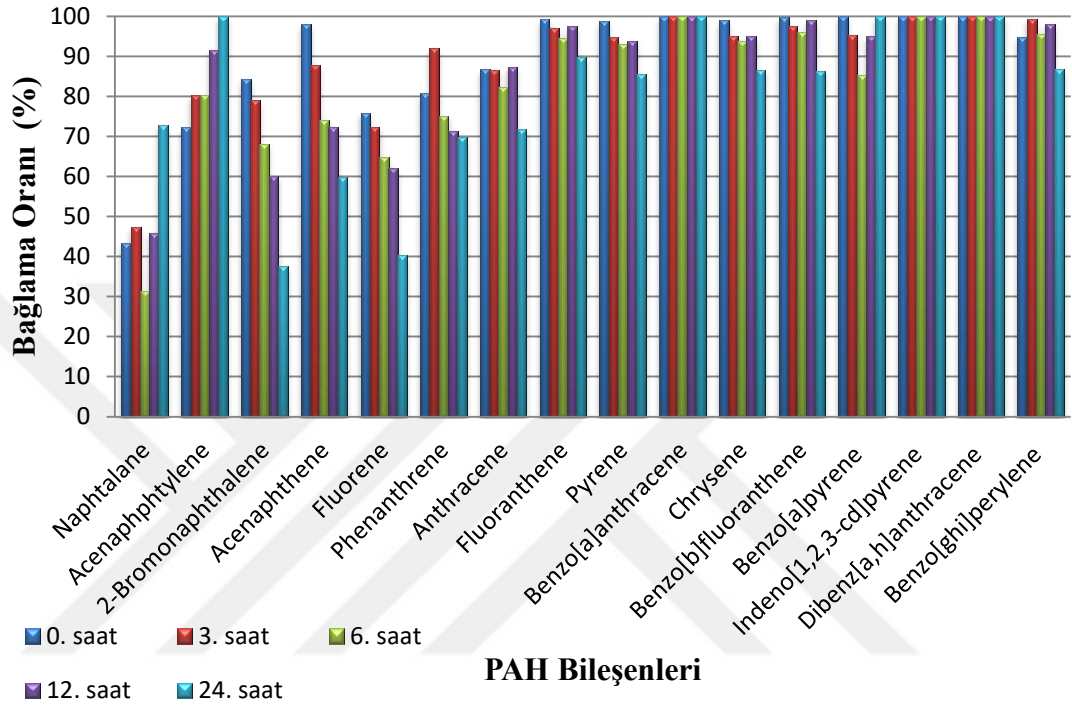


Şekil 4.6. Laktik asit bakterileri tarafından bağlanan PAH karışımına ait 0. saat kromatogramı (1) PAH (5 ppm), (2) *L. plantarum* + PAH, (3) *L. rhamnosus* + PAH (4) PBS

Kromatogramda başlangıç PAH karışımına ait piklerin yüksekliği, laktik asit bakterileri ile inkübasyonun ardından önemli miktarda azalma göstermekte hatta bazıları tamamen kaybolmaktadır. AFB₁ ile benzer şekilde, PAH'lar da laktik asit

bakterileri ile karıştırıldığında, PAH'lar ortamdan fiziksel olarak ayrılmakta ve herhangi bir yan ürün oluşturmamaktadırlar.

L. plantarum tarafından bağlanan PAH bileşenlerinin zamana bağlı azalış değerleri ise Şekil 4.7 de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. *L. plantarum* ile PAH karışımı ko-inkübasyonunda zamana bağlı bileşenlerin % bağlanma oranı

Her bir renk farklı inkübasyon süresini belirtmekte olup, özellikle küçük molekül ağırlığına sahip uçucu (naftalen, asenaften, 2-Bromonaftalen, asenaften, floren, fenantren) PAH'ların indirgenmesinde *L. plantarum*'un etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Molekül ağırlığı büyük olan PAH bileşenleri ise *L. plantarum* ile daha yüksek bağlanma eğilimi göstermişlerdir.

Türk Gıda Kodeksi'nde üst limitleri belirtilen dört bileşen, çalışmada optimum süre belirlenirken bu bileşenlerin aynı anda en yüksek miktarda uzaklaştırıldığı zaman dilimi dikkate alınmıştır. *L. plantarum* tarafından bağlanan PAH bileşenlerinin yüzdeleri Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Kodekste limit değerleri bulunan bileşenler ise kalın punto ile gösterilmiştir.

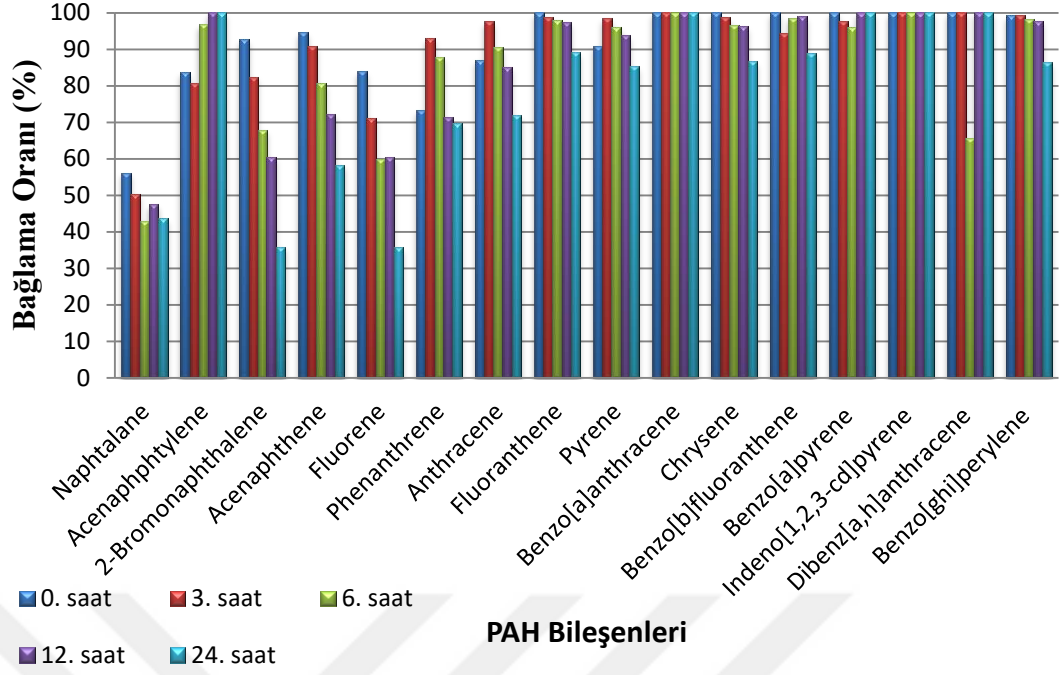
Çizelge 4.4. *L. plantarum*'un zamana bağlı olarak PAH bileşenlerini bağlama miktarı (% Bağlama±SS)**

Bileşen	Zaman				
	0. saat	3. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Naftalen	43,25 ^{a*} ±6,49**	47,37 ^a ±15,63	31,41 ^a ±10,4	45,86 ^a ±4,03	72,64 ^a ±2,64
Asenaftilen	72,22 ^b ±9,35	80,2 ^{a,b} ±10,18	80,19 ^{a,b} ±10,18	91,57 ^{a,b} ±11,92	100 ^a ±0,00
2-Bromonaftalen	84,29 ^a ±11,41	78,96 ^{a,b} ±7,62	67,94 ^{b,a} ±10,6	60,04 ^b ±5,05	37,59 ^c ±5,6
Asenaftren	97,97 ^a ±4,27	87,65 ^a ±6,12	74,1 ^a ±17,21	72,28 ^a ±3,58	59,7 ^a ±1,42
Floren	75,8 ^a ±2,01	72,35 ^a ±4,56	64,8 ^a ±25,78	62,01 ^a ±1,88	40,19 ^a ±15,91
Phenanthrene	80,69 ^a ±20,27	91,96 ^a ±6,32	75,08 ^a ±26,14	71,29 ^a ±11,76	69,78 ^a ±1,34
Antrasen	86,67 ^a ±10,83	86,52 ^a ±17,08	82,2 ^a ±17,73	87,3 ^a ±0,47	71,84 ^b ±4,27
Floranten	99,24 ^a ±1,08	97,06 ^a ±2,5	94,4 ^a ±5,89	97,44 ^a ±1,97	89,77 ^a ±6,43
Piren	98,76 ^a ±1,76	94,65 ^{a,b} ±5,28	92,9 ^{a,b} ±6,52	93,77 ^{a,b} ±3,12	85,41 ^b ±3,06
Benzo[a]antrasen	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00
Krizen	98,99 ^a ±1,42	95,04 ^{a,b} ±5,15	93,83 ^{a,b} ±6,13	94,86 ^{a,b} ±2,76	86,51 ^b ±3,52
Benzo[b]floranten	99,68 ^a ±0,45	97,44 ^a ±2,97	95,99 ^a ±4,32	98,99 ^a ±1,42	86,32 ^a ±8,7
Benzo[a]piren	100 ^a ±0,00	95,25 ^a ±4,54	85,29 ^a ±9,42	94,99 ^a ±7,08	100 ^a ±0,00
Indeno[1,2,3-cd]piren	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00
Dibenz[a,h]antrasen	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00
Benzo[ghi]perilen	94,8 ^a ±6,02	99,23 ^a ±0,05	95,53 ^a ±4,42	98,09 ^a ±0,25	86,84 ^a ±9,1

n=2 * Tabloda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı ($p<0,05$), aynı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farksızdır ($p>0,05$). Her bir bileşenin istatistiksel incelemesi kendi içerisinde, saatler arasındaki indirgenme farkına göre yapılmıştır. ** Standart sapma

Çizelge 4.4 incelendiğinde benzo[a]piren ve benzo[a]antrasen'in *L. plantarum* ile karşılaştığı anda hücre tarafından tutularak ortamdaki ayrıldığı görülmektedir. Benzo[a]antrasen tüm inkübasyon boyunca *L. plantarum* tarafından kararlı bir şekilde tutulduğu için, inkübasyonun ilerleyen saatlerinde alınan örneklerde tespit edilememiştir. B[a]P ve *L. plantarum* kararlı bir bağlanma göstermediğinden, inkübasyon süresince alınan örneklerde B[a]P'nin zaman zaman geri bırakıldığı ve ortamdaki miktarının da arttığı belirlenmiştir. Ancak ortamda serbest olarak bulunan B[a]P'nin miktarının örnek alınan saatler arasında gösterdiği değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzo[b]floranten ise, *L. plantarum* ile karıştırıldığı anda ortamdaki miktarı %99,68 oranında azalmış ve inkübasyon süresi arttıkça bağlanma özelliği zayıflayarak ortamda bulunan serbest miktarında artış görülmüştür. B[a]P ile benzer şekilde, bu geri bırakılan benzo[b]florantenin miktarındaki değişim saatler arasında istatistik olarak önemli fark oluşturmamıştır ($p>0,05$). Krizen ise benzo[b]floranten ile benzer bağlanma karakteristiği göstermesine rağmen, 24. saatte *L. plantarum* tarafından bağlanma miktarı düşmüş; ortamdaki miktarının artışı başlangıçta (0. saatte) ortamda bulunan miktarı ile arasındaki farkın istatistik olarak anlamlı miktarda değişmesine yol açmıştır ($p<0,05$).

L. rhamnosus NRRL B-442 tarafından bağlanan PAH bileşenlerinin zamana göre değişim grafiği Şekil 4.8'de gösterilmektedir..



Şekil 4.8. *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile PAH karışımı ko-inkübasyonunda zamana bağlı bileşenlerin % bağlanma oranı

L. plantarum ile benzer şekilde *L. rhamnosus* NRRL B-442 de karışımda yer alan uçucu PAH bileşenlerini ortamdan uzaklaştırmakta etkisiz kalmıştır. Molekül ağırlığı büyük olan PAH bileşenleri ise yüksek miktarda hatta bazı bileşenlerin tamamı ortamdan *L. plantarum*'da olduğu gibi ortamdan uzaklaştırılmışlardır. Yine *L. plantarum* ile benzer şekilde, *L. rhamnosus* NRRL B-442 de benzo[a]pireni, karşılaştıkları ilk anda ortamdan tamamen uzaklaştırmış, fakat ilerleyen inkübasyon saatlerinde bağladığı B[a]P'ın bir kısmını ortama geri bırakmıştır. İnkübasyonun 12. Saatinden itibaren ortamda bulunan serbest B[a]P, *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından tekrar bağlanarak ortamdan tamamen uzaklaştırılmıştır.

L. rhamnosus NRRL B-442'nin zamana bağlı PAH bileşenlerini bağlama miktarları ve bu bağlamanın istatistiksel değerlendirilmesi Çizelge 4.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. *L. rhamnosus* NRRL B-442'nin zamana bağlı PAH bileşenlerini bağlama miktarı (% Bağlama±SS**)

Bileşen	Zaman				
	0. saat	3. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Naftalen	56,17 ^{a*} ±17,83	50,32 ^a ±10,29	42,99 ^a ±14,67	47,53 ^a ±4,86	43,73 ^a ±0,38
Asenaftilen	83,6 ^a ±11,39	80,64 ^a ±3,39	96,72 ^a ±18,79	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00
2-Bromonaftalen	92,73 ^a ±6,39	82,4 ^a ±3,22	67,93 ^b ±5,57	60,52 ^b ±1,2	35,9 ^c ±3,22
Asenaften	94,62 ^a ±6,05	90,72 ^{a,b} ±2,45	80,65 ^{b,c} ±6,23	72,22 ^c ±0,05	58,34 ^c ±0,5
Floren	83,99 ^a ±12,34	71,23 ^a ±10,16	59,96 ^a ±8,63	60,4 ^a ±1,04	35,65 ^b ±9,49
Phenanthrene	73,22 ^a ±34,17	93,06 ^a ±0,86	87,91 ^a ±3,58	71,29 ^a ±11,59	69,78 ^a ±3,76
Antrasen	87,03 ^{a,b} ±16,15	97,57 ^a ±2,06	90,4 ^{a,b} ±3,58	85,13 ^{a,b} ±2,26	71,84 ^b ±4,75
Floranten	100 ^a ±0,00	98,81 ^a ±0,11	97,98 ^a ±0,64	97,44 ^a ±1,4	89,16 ^b ±5,56
Piren	90,89 ^a ±10,88	98,4 ^a ±0,22	96,14 ^a ±2,04	93,72 ^a ±2,79	85,27 ^a ±2,86
Benzo[a]antrasen	100^a±0,00	100^a±0,00	100^a±0,00	100^a±0,00	100^a±0,00
Krizen	100^a±0,00	98,72^a±0,2	96,64^a±1,84	96,27^a±0,28	86,59^b±3,63
Benzo[b]floranten	100^a±0,00	94,35^a±7,11	98,61^a±1,07	98,9^a±1,56	88,81^b±15,83
Benzo[a]piren	100^a±0,00	97,66^a±3,31	95,92^a±5,77	100^a±0,00	100^a±0,00
Indeno[1,2,3-cd]piren	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00
Dibenz[a,h]antrasen	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00	65,58 ^b ±48,68	100 ^a ±0,00	100 ^a ±0,00

n=2 * Tabloda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı ($p<0,05$), aynı harfler ile gösterilen ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farksızdır ($p>0,05$). Her bir bileşenin istatistiksel incelemesi kendi içerisinde, saatler arasındaki indirgenme farkına göre yapılmıştır. ** Standart sapma

L. rhamnosus NRRL B-442 hücreleri tarafından bağlanan ve belirli zaman aralıklarında geri salınan B[a]P'nin, saatler arasında ortamda bulunma miktarları değişim göstermesine rağmen, miktarlardaki değişimin arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzo[a]antrasen ise, *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından, test edilen tüm sürelerde tamamı tutulduğu belirlenmiş ve analizler boyunca tespit edilememiştir. Benzo[b]floranthen ve krizen ise *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile karşılaştığı anda ortamdaki tamamen ayrılmış fakat artan inkübasyon saatleri ile *L. rhamnosus* hücrelerinden ayrılmaya başlamışlardır. Bu ayrılma inkübasyonun sonu olan 24. saatte en yüksek düzeye ulaşmıştır. İnkübasyon son saatinde (24. saat) ortamda bulunan serbest benzo[b]floranten ve krizen miktarının artması nedeniyle bakteri hücrelerinin bağlama gücü azalmış, diğer saatlerde gözlemlenen yüksek bağlanma miktarları ile aralarında oluşan fark istatistiksel olarak önemli hale gelmiştir ($p<0,05$).

Laktik asit bakterilerinin anti-genotoksik ve anti-mutajenik özellikleri ile ilgili çalışmalarda, genotoksin/mutajen bağlanmasında canlı hücrelerin önemli rolü olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmalardan biri olan Pei-Ren vd. (2002) araştırmalarında, *B. lactis*'in canlı, ısı ile inaktive edilmiş, ham hücre duvarı ve hücre ekstraktlarının B[a]P bağlama özelliği araştırmıştır. En yüksek B[a]P inhibisyonun canlı hücreler (%81,7) tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra ölü hücrelerin %31,7, ham hücre duvarının %61 ve hücre ekstraktının ise %22 oranında B[a]P bağladığını belirlemişlerdir. Zhao vd. (2013) ise, laktobasil türlerinin B[a]P'ı bağlama özelliğini araştırdıkları çalışmada; *L. plantarum* CICC 22135 ve *L. pentosus* CICC 23163'un etkin bir şekilde (%66,76 ve %64,31; sırasıyla) B[a]P'ı bağlayabildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca hücre-B[a]P kompleksinin suda stabil olduğunu ve laktik asit bakterilerinin hücre duvarında yer alan peptidoglukan katmanın bağlanmayı sağlayan kısım olduğunu ifade etmişlerdir. Bir diğer çalışmada sucuklarda küreme öncesi ve sonrası laktik asit bakterisi uygulamasının B[a]P ve krizen miktarında önemli miktarda düşüşe yol açtığı belirtilmiştir (Bartkiene vd., 2017).

Literatürde yapılan araştırmalara bakıldığında çalışmalar çoğunlukla tek bileşenin laktik asit bakterileri tarafından bağlanma etkinliği üzerine yoğunlaşmaktadır. Yaptığımız çalışmada ise, literatürden farklı olarak, PAH

bileşenleri doğada tek tek değil genellikle kombinasyon halinde bulunduğundan; en yaygın bulunan PAH bileşenlerinden oluşan karışım kullanılarak bunların laktik asit bakterileri tarafından bağlanma oranları tespit edilmiştir. Ancak tek bileşenle yapılan çalışmalarda elde edilen inhibisyon değerlerine benzer şekilde ve bileşene bağlı olarak daha yüksek miktarda PAH bileşeni *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çalışma ile paralel sonuçlar Abou-Arab vd. (2010) tarafından da elde edilmiştir. Çalışmalarının ilk 2 saatinde, başlangıç PAH konsantrasyonu 4 µg/mL olan karışım laktik asit bakterileri ile birlikte inkübe edildiğinde, PAH bileşenlerinin %81'i *B. bifidum*, %88'i ise *S. thermophilus* tarafından bağlandığını belirlemişlerdir. Ancak farklı olarak uçucu olan PAH bileşenleri, laktik asit bakterileri ile PAH'ların inkübasyonuun ardından tespit edilememiştir.

4.4 Apoptoz Testleri

Çalışma kapsamında uygulanan genotoksinler nedeniyle hücrelerin programlanmış hücre ölümü olan apoptoza doğru yol alıp almadığı, hem akrinin oranj-etidyum bromür ikili boyama yöntemi, hem de akım sitometrisi ile belirlenmiştir.

Gerek apoptoz testleri gerekse genotoksisite testlerinde HT-29 hücrelerine uygulanan genotoksin konsantrasyonları, indirgenme çalışmalarından farklı olarak tekrar belirlenmiştir. Bunun nedeni, kullanılan genotoksinin yüksek konsantrasyonda (5 ppm) hücre hattına sitotoksik etki göstermesi (PAH'lar) ve/veya etkisini seçilen inkübasyon süresince göstermemesidir (AFB₁). Testlerde kullanılacak toksin dozu doz/cevap eğrisi oluşturulmadan, literatürde kullanılan dozlar araştırılarak belirlenmiştir. AFB₁ ve PAH'ların laktik asit bakterileri tarafından etkisiz hale getirilmesi çalışmalarının neredeyse tamamında, ortak çalışma konsantrasyonu 5 ppm olarak belirtilmektedir (Abou-Arab vd., 2010; El-nezami vd., 1998; Haskard vd., 2001; Peltonen vd., 2001; Topcu vd., 2010). Benzo[a]pirenin laktik asit bakterileri tarafından bağlanma özelliği ise 10 ppm konsantrasyonunda çalışılmıştır (Zhao vd., 2013). Şimdiye kadar yapılan *in vivo* çalışmalarda ise; fareler 0,5 mg (Abd-Allah vd., 1999) ve 100 mg/kg vücut ağırlığı AFB₁ ile beslenmiş; *in vitro*

çalışmalarda ise Caco-2 hücrelerine 20 ve 40 µM zearalenon (Abid-Essefi vd., 2003) ve 150 µM AFB₁ (Gratz vd., 2007), Caco-2/TC7 hücrelerine 40 µM - 1 mM aralığında okratoksin (Ranaldi vd., 2007), HT-29 hücrelerine farklı sürelerde (2-24 saat) deoksinivalenol (Bensassi vd., 2009), karaciğer HepG2 hücrelerine değişen konsantrasyonlarda (en düşük 1,56 µM, en yüksek 150 µM) AFB₁ ilave edilerek bu genotoksinlerin apoptotik etkileri ve genotoksisiteleri tespit edilmiştir. Diggs vd. (2011) tarafından da farklı kolon kanser hücre hatları (Caco-2, HT-29, HT-116 ve SW 486), rat ince bağırsak epitel hücreleri ve kolonositleri ile yapılan çalışmalarda 10 nM ile 200 µM aralığında değişen PAH konsantrasyonları kullanılabildiğini belirtmektedir. Daha önce çalışılan bu konsantrasyonlar göz önüne alınarak, AFB₁ alışma konsantrasyonu 100 µM ve PAH alışma konsantrasyonu ise 0,250 ppm olarak belirlenmiştir. Hücrelerin genotoksinler ile inkübasyon süresi ise 48 saat olarak uygulanmıştır. Kullanılan PAH özeltisi, 16 bileşenli karışım olduğundan birim olarak molarite (M) yerine, konsantrasyon (ppm) kullanılmıştır.

4.4.1 Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama ile Apoptoz Testi

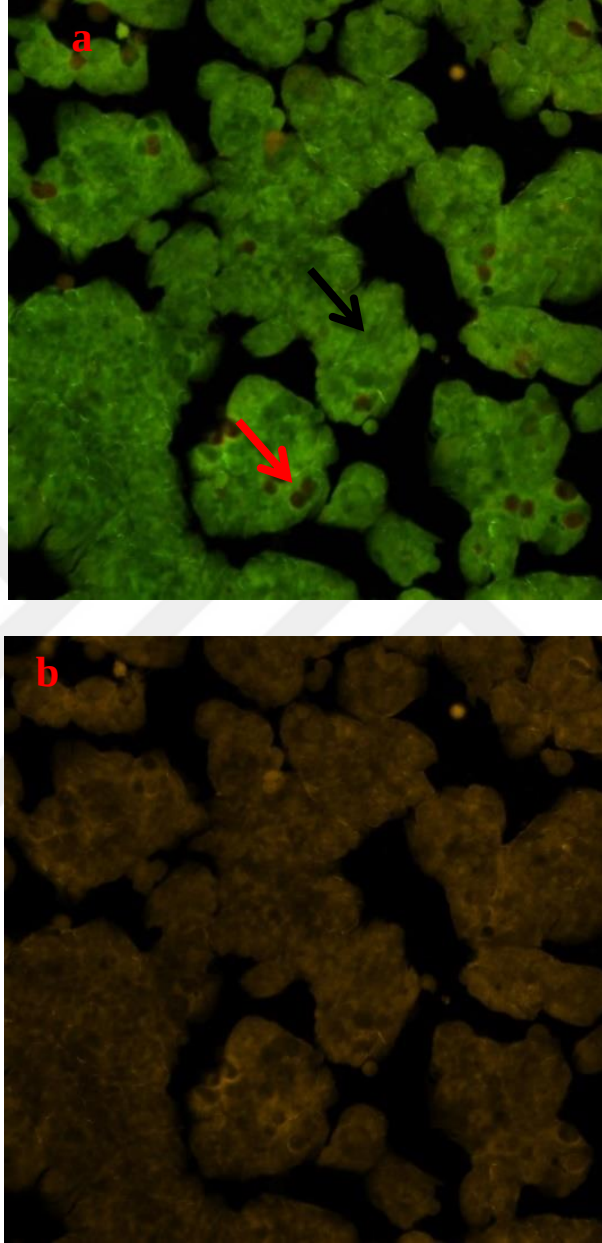
Apoptotik sürece girmiş hücrelerde gözlemlenen hücre morfolojisindeki değişimler akridin oranj-etidyum bromür boyaması ile mikroskopik olarak gösterilmiştir. Bu boyama yönteminde canlı hücreler akridin oranj sayesinde yeşil renkte görünürken, erken apoptotik hücrelerde görülen kromatin kondensasyonu, etidyum bromür ile birleştiğinde parlak turuncu renk oluşturmaktadır. Geç apoptozda ise hücreler tamamen turuncu renkte görünmektedirler.

4.4.1.1 AFB₁'in Yol Açtığı Apoptoz

Yapılan birçok araştırmada AFB₁'in bağırsak hücrelerinde neden olduğu apoptotik etki *in vivo* deneylerle gösterilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar sağlıklı bağırsak hücrelerinde AFB₁'in oluşturduğu hasar ve apoptoz sürecini kapsamaktadır.

Bu çalışmada negatif kontrol grubu olarak HT-29 hücrelerine yalnızca PBS uygulanmıştır. Kontrol grubuna ait görseller şekil 4.9'da gösterilmektedir. PBS uygulanan HT-29 hücreleri, akridin oranj ve etidyum bromür çakışık filtresinde canlı

olanlar yeşil renkte görülmektedir. Koyu kahverengi-turuncu görünümde olanlar apoptotik hücreleri göstermektedir.

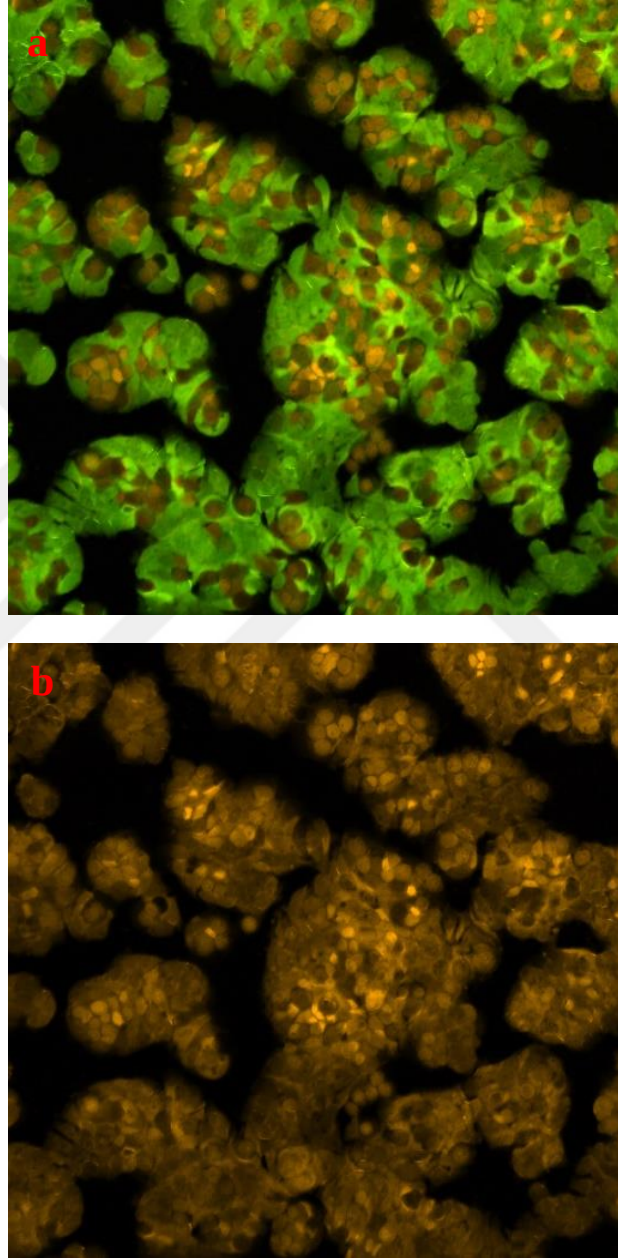


Şekil 4.9. Negatif kontrol (PBS) (a) Akridin oranj - etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

Etidyum bromür filtresi kullanılarak çekilen görüntüde ise canlı hücreler renksiz görülmekte iken, apoptotik hücreler floresans/parlak turuncu renkte görülmektedir. Çalışmada yalnızca PBS uygulanmış grupta, HT-29 hücrelerinin canlılığını koruduğu görülmektedir. Bu sonuç ile PBS'in apoptotik etki göstermediği

ve diğ er analizlerde gözlemlenen apoptotik etkinin uygulanan diğ er bile senlerin neden olduğu anlaşılmaktadır.

Pozitif kontrol olarak HT-29 hücrelerine 100 μ M AFB₁ uygulandıktan sonra HT-29 hücrelerinde görülen apoptoz  ekil 4.10’da gösterilmektedir.



Şekil 4.10. AFB₁(100 μ M) uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj – etidyum bromür filtresi  akı ık; (b) Etidyum bromür filtresi

Pozitif kontrol olarak 100 μ M AFB₁ uygulanan HT-29 hücrelerinde, negatif kontrol grubundan farklı olarak her iki filtrede de HT-29 hücrelerinde artan sayıda

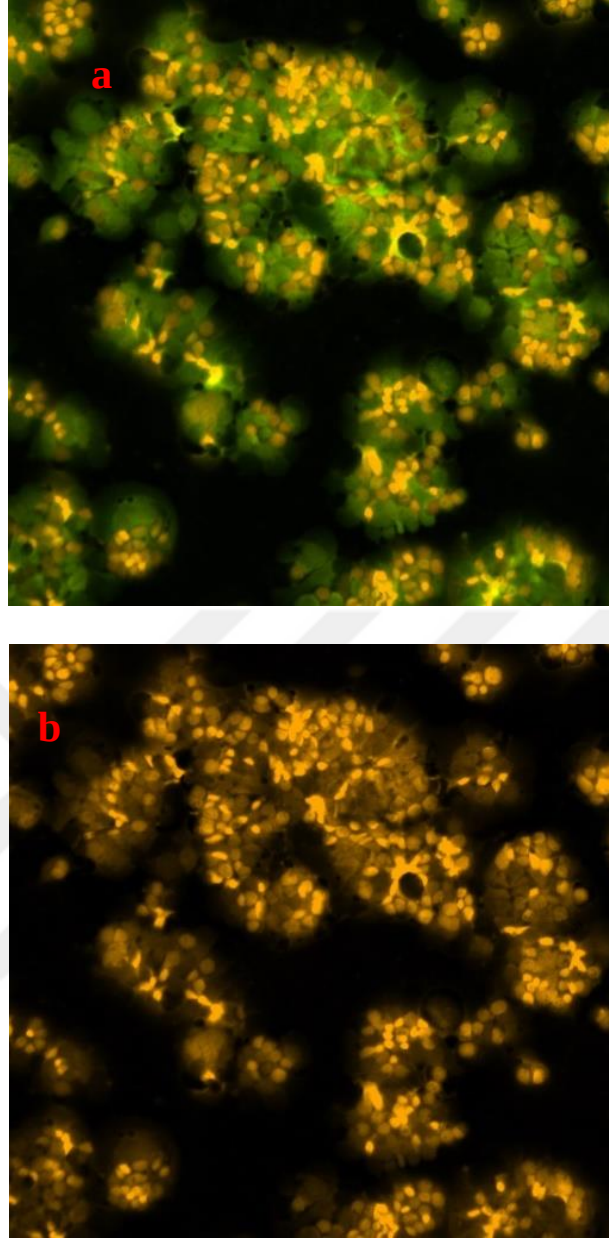
apoptotik hücre gözlenmeye başlamıştır. Akridin oranj filtresi kullanılarak elde edilen görüntüde turuncu floresan veren hücreler genellikle erken apoptotik, kahverengi/koyu turuncu renkli hücreler ise geç apoptotik hücreleri ifade etmektedir. Etidyum bromür filtresi kullanıldığında ise apoptotik hücreler parlak turuncu renkte görülmektedir. Fakat bu test ile uygulanan genotoksinlerin hangi yolak aracılığı ile apoptoza yol açtığı tespit edilememektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar araştırıldığında hem AFB₁ hem de PAH'ların dâhili yolak aracılığıyla ile apoptoza yol açtığı bilirse de bu testin gen ifadesi ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca hücrenin ölüm şeklinin ne olduğu da yine gen ifadesi ile belirlenebilmektedir. Nitekim bunu destekleyen, yapılmış farklı çalışmalar bulunmaktadır. DNA hasarı, onkogenlerin aktivasyonu veya ksenobiyotik maruziyeti nedeniyle, tümör baskılayıcı gen p53, hücre döngüsünde tutuklanma ve/veya apoptozu indükleyebilmektedir. Bu kapsamda Bensassi vd. (2009), deoksinivalenol (DON) tarafından tetiklenen hücre ölümünün şeklinin belirlenmesi için, mikotoksin maruziyetine yanıt olarak p53 ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. DON uygulamasının HT-29 hücrelerinde p53 protein miktarının zamana bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, apoptoz indikatörü olan kaspaz-3 etkinliğinin, HT-29 hücrelerinde DON maruziyetine bağlı olarak, 12 saatlik maruziyet süresince yaklaşık 7 kat arttığı belirlenmiştir. Riberio vd. (2010), fumonisin B₁ ve AFB₁'in apoptotik etkisini birlikte ve kombinasyon halinde rat primer karaciğer hücrelerine uygulayarak test etmişlerdir. AFB₁ veya fumonisin B₁'in kombinasyon şeklinde uygulanmasının, tek başına uygulanmaya göre karaciğer hücrelerinde daha fazla toksik etki gösterdiği ve hücrelerde apoptozu tetiklediği belirlenmiştir. Bu çalışmada, apoptozda görülen morfolojik değişimler olan, elektroforezde DNA'nın merdiven görüntüsünde olması, nükleer fragmentasyona eşlik eden kromatin kondenzasyonunun görülmesi ve hücre ölümüyle sonuçlanan kromatinin kırılması tespit edilmiştir.

AFB₁ maruziyeti ve sodyum selenit takviyesinin broiler jejunum hücrelerine apoptotik etkisi araştırılmış; diyetinde 0,3 mg/kg AFB₁ ile beslenen deney hayvanlarında jejunum hücrelerinde Bcl-2 mRNA ekspresyonunun azalması ve Bax ile kaspaz-3 mRNA ekspresyonlarının artması nedeniyle, hücrelerde görülen apoptoz da arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada diyetinde 0,4 mg/kg sodyum selenit takviye edilmiş grupta ise AFB₁'nin yol açtığı apoptoz, ilave edilen sodyum selenit sayesinde artan Bcl-2 ekspresyonu ve azalan Bax ile kaspaz-3 ekspresyonu nedeniyle azalmıştır.

(Peng vd., 2008). Benzer şekilde, broilerlerde yine selenyum takviyesi yapılmış böbrek hücrelerinde AFB₁'in oluşturduğu apoptotik etki apoptozu tetikleyen (Bax ve kaspaz-3 mRNA) ve baskılayan (Bcl-2) enzimlerin ekspresyon seviyelerine bakılarak belirlenmiştir (Yu vd., 2015).

Çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde gerçekleştirilen *in vitro* çalışmada ise Abid-Essefi vd. (2003), Caco-2 ve DOK hücrelerine uygulanan Zearalenon (ZEN) nedeniyle 24 saatlik inkübasyon sonunda, uygulanan konsantrasyona bağlı olarak apoptotik hücrelerin sayısında artış görüldüğünü hem DNA fragmentasyon testi hem de akridin oranj-etidyum bromür boyaması ile göstermişlerdir.

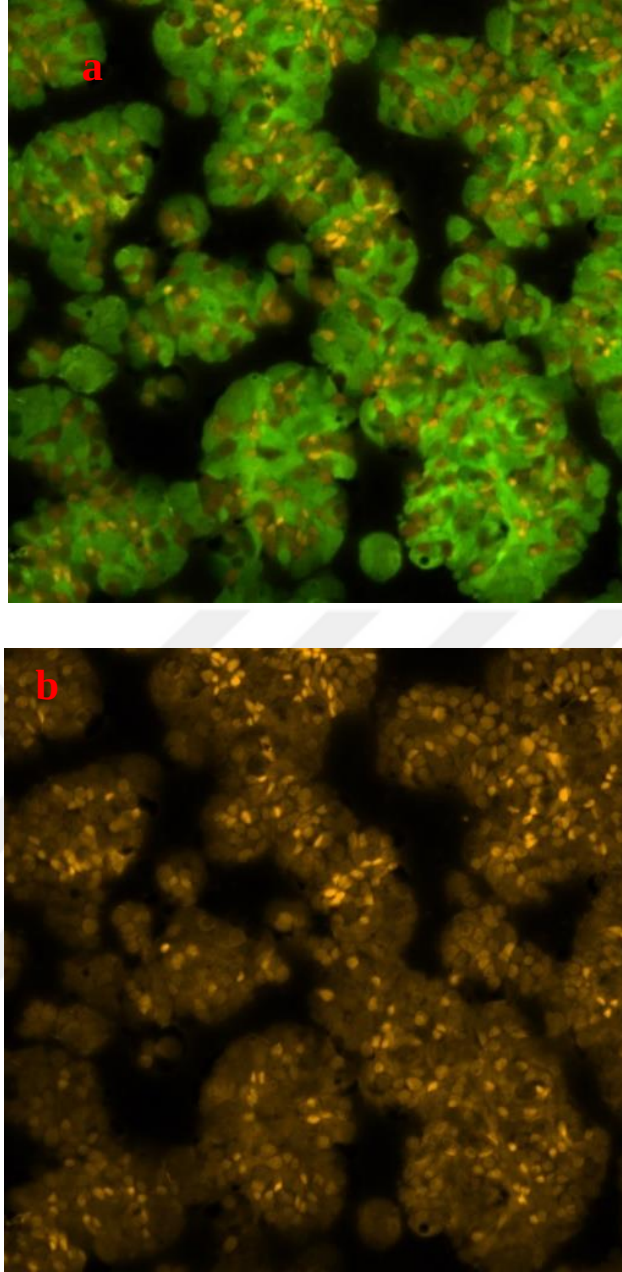
Yukarıda belirtilen *in vivo* çalışmalarda, sağlıklı hayvanlara uygulanan AFB₁ ile sağlıklı hücrelerde oluşturduğu hasar çalışılmıştır. Bunun yanı sıra, model hücre hatları olarak kolon kanser hücre hattı, (Caco-2, HT-29) böbrek kanser hücre hattı (Vero) ve dil kanser hücre hattı (DOK) da kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada ise, diğer *in vitro* çalışmalardakine benzer şekilde kolon kanser hücre hattı olan HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda yalnızca AFB₁ uygulanan hücrelerde apoptoz görülmesinin yanı sıra, çalışmada hücreleri koruyucu etki göstermesi beklenen laktik asit bakterilerinin de apoptoza yol açtığı belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde, genotoksinler tarafından tetiklenen apoptozun yanı sıra laktik asit bakterilerinin yol açtığı apoptotik etki de elde edilen önemli sonuçlardan biri olmuştur. Kullanılan laktik asit bakterisi suşlarının, kolon kanseri hücrelerini apoptoza yönlendirmesi ve bir önceki çalışma ile AFB₁'i yüksek oranda bağlayabilme özellikleri belirlenmesi nedeniyle, özellikle beslenmede probiyotik takviyesinin önem arz ettiği görülmektedir. Kullanılan laktik asit bakterilerinden *L. plantarum* tarafından HT-29 hücrelerinde tetiklenen apoptoza ait görüntüler Şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11. *L. plantarum* uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj – etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

Her iki görüntüde de PBS içinde süspansiyon halinde bulunan *L. plantarum*'un şırınga ucu filtreden süzülerek elde edilen süzüntünün uygulanmasının ardından turuncu floresans veren hücre sayısının artması nedeniyle HT-29 hücrelerinde canlılığın azalmaya başladığı tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bir diğer probiyotik laktik asit bakterisi olan *L. rhamnosus* NRRL B-442'nin HT-29 hücrelerinde yol açtığı apoptozun görüntüleri ise Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

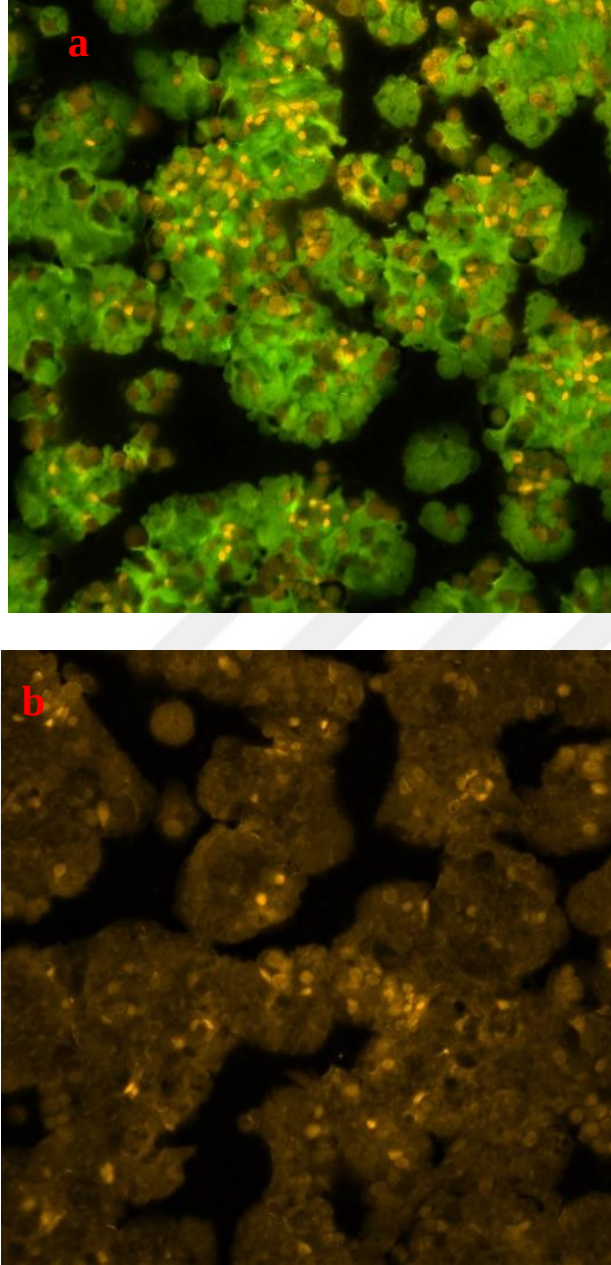


Şekil 4.12. *L. rhamnosus* NRRL B-442 uygulanan HT-29 hücreleri
(a) Akridin oranj - etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

L. rhamnosus NRRL B-442 de *L. plantarum* ile benzer şekilde hazırlanarak elde edilen süzüntü HT-29 hücrelerine uygulandığında, turuncu floresan ışıma veren hücre sayısındaki artış nedeniyle hücrelerdeki canlılığın azalmaya başladığı belirlenmiştir. Alınan sonuçlar ile her iki laktik asit bakterisinin de HT-29 hücre hattında apoptoza yol açtığı görülmektedir. Laktik asit bakterileri, kanser hücrelerine karşı gösterdikleri bu apoptotik etki farklı mekanizmalar sayesinde gerçekleşmektedir. Biffi vd. (1997) tarafından, fermente süt ürünlerinin meme kanseri hücre hattı olan MCF7'nin proliferasyonunu inhibe ettiği ifade edilmektedir.

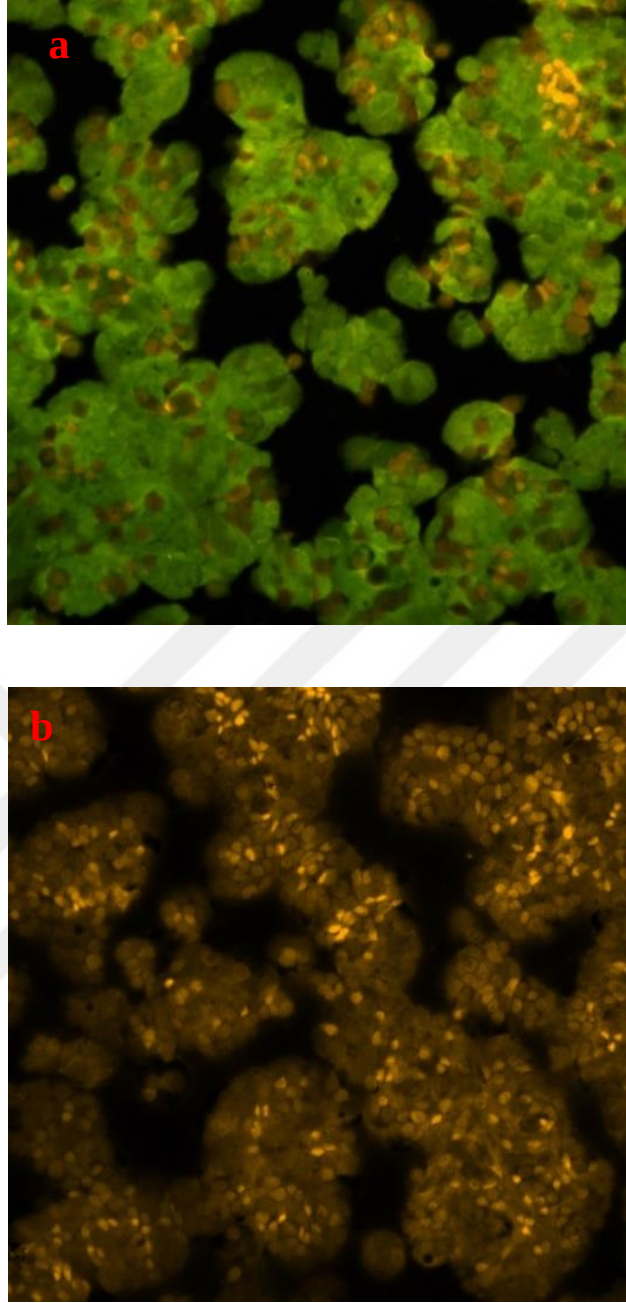
Fermente süt ürünlerinin bu anti-proliferatif özelliği, fermentasyon süresince laktik asit bakterileri tarafından bazı süt bileşenlerinin biyolojik olarak aktif hale gelmesinden veya başından beri ortamda bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilen bileşenler yolu ile olabileceği belirtilmektedir. Wang vd. (2014) yaptığı çalışmada ise geleneksel fermente ürünlerden izole edilmiş 138 laktobasil suşunun HT-29 hücrelerine anti-proliferatif etkisi araştırılmış ve 4 farklı suştan elde edilen hücre duvarı ve sitoplazma ekstraktlarının HT-29 hücrelerinin çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca bu ekstraktların, hücrede dâhili yolak aracılığıyla, mitokondri membranının geçirgenliğini arttıracak apoptoza yol açtığı tespit edilmiştir. Er vd. (2015) tarafından elde edilen veriler ise *P. pentaosaceus*, *L. plantarum* ve *Weissella confusa*'nın hücresiz süpernatantları ve hücresiz liyofilize filtratları, insan kolon adenokarsinom hücre hattı olan Caco-2 hücrelerine anti-proliferatif etki göstererek bu hücrelerin gelişimini inhibe ettiği şeklindeyir. Tsai vd. (2015), *L. casei* ATCC 334 tarafından üretilen iki farklı antimikrobiyal peptidin (m2163 ve m2386) insan kolorektal kanser hücre hattı olan SW480'de apoptozu başlattığını tespit etmişlerdir. Bakteryiosin benzeri bir peptid olan m2163'n, bazı laktobasillerin ve *Listeria* türlerinin gelişimine engel olduğu; m2386'nın ise, *Listeria* türlerini öldürme yeteneğine sahip, feromon benzeri bir peptit olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Chen vd. (2017) ise, laktobasillerin ve hücresiz süpernatantlarının, HT-29 kolon kanser hücre hattının gelişimi üzerine etkisi araştırılmış; *L. reuteri* BCRC14625'in HT-29 hücrelerinde laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinde önemli artışa yol açtığı, hücre membranına zarar verdiği, 8 saatlik ko-inkübasyon sonunda HT-29 hücrelerinde nitrik oksit sentezinin indüklendiği belirlenmiştir. Ayrıca bazı laktik asit bakterilerinin HT-29 kolorektal kanser hücre hattının gelişimini Bax/Bcl-2 yolağı veya nitrik oksit üretimi nedeniyle inhibe ettiği tespit edilmiştir.

L. plantarum ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile birlikte inkübasyonunun sonunda bu bakteriler tarafından bağlanarak ortamda serbest olarak bulunan miktarı azalan AFB₁'in apoptotik etkisi şekil 4.13 ile şekil 4.14'te gösterilmektedir.



Şekil 4.13. *L. plantarum*+AFB₁ karışımı uygulanan HT-29 hücreleri
(a) Akridin oranj - ethidium bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

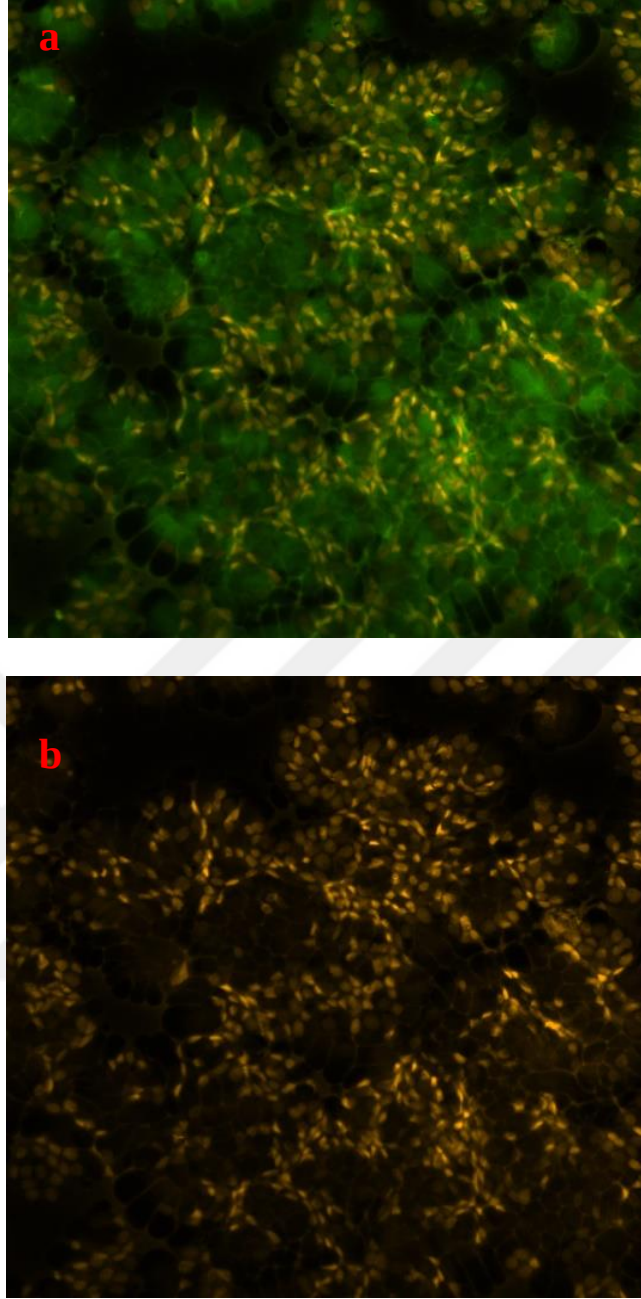
L. plantarum ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile birlikte AFB₁'in uygulandığı HT-29 hücrelerinde, her birinin HT-29 hücrelerine tek tek uygulandığı gruplar ile benzer görüntüler elde edilmiştir. Her iki laktobasil de AFB₁ ile birlikte uygulandığında HT-29 hücreleri içinde apoptotik olanların sayısı artış göstermektedir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *L. rhamnosus*+AFB₁ karışımı uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj - etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

4.4.1.2 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Yol Açtığı Apoptoz

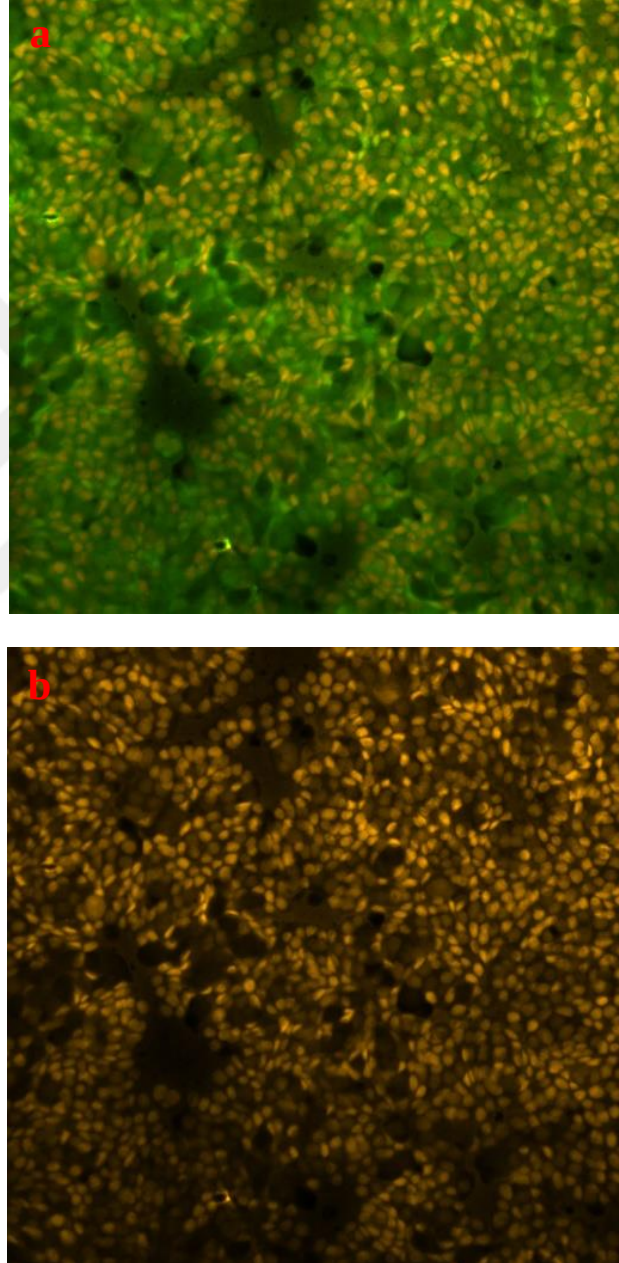
PAH'ların suda çözülebilir duruma getirilmesi için kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO), besin ortamında son konsantrasyonu $\leq$ %0,5 olacak şekilde ilave edilmiştir. Negatif kontrol grubuna ait görseller Şekil 4.15'de gösterilmektedir.



Şekil 4.15. Negatif kontrol (PBS içinde %0,5 DMSO) (a) Akridin oranj – etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

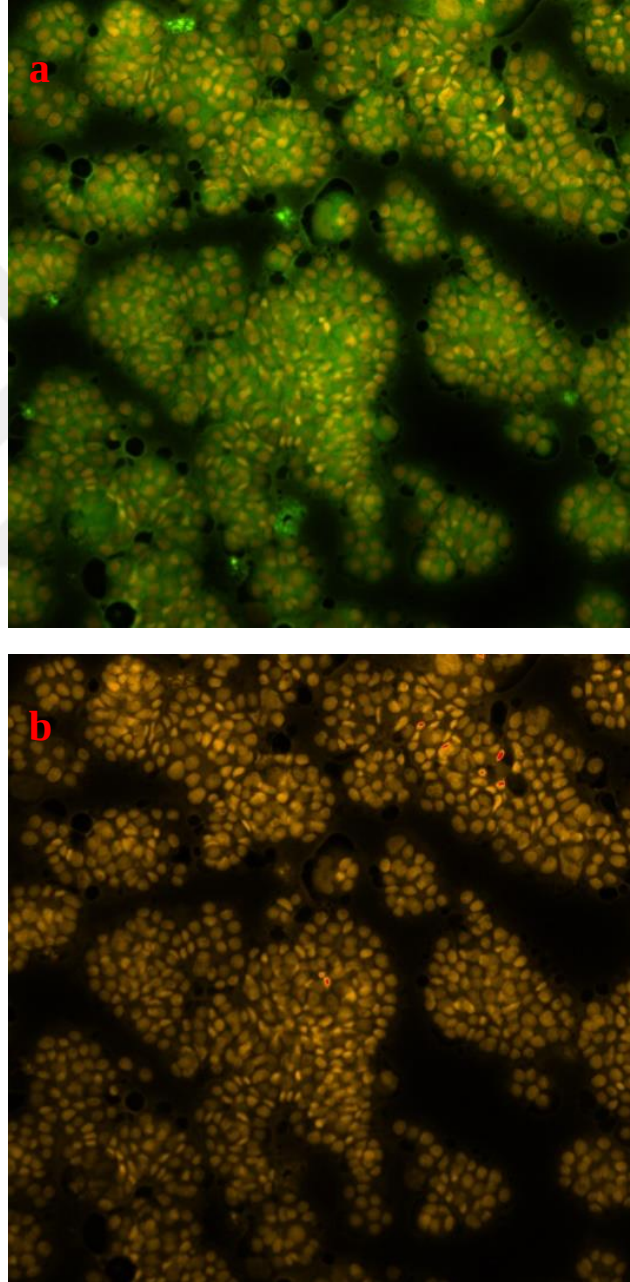
PAH'ların suda çözünmesin yardımcı olan DMSO'nun, hücre canlılığının korunması için kültür ortamına ilave edilebilecek en yüksek miktarı, farklı araştırmacılar tarafından farklı miktarlarda (%0,01 (Harris vd., 2013), %0,05 (Lin vd., 2007), %0,25 (Ribeiro vd., 2010) ve $\leq$ %0,5 (Solhaug vd., 2004)) önerilmektedir. Bu çalışmada ise PAH bileşenleri lipofilik karakterde olduğundan ve moleküle ağırlıkları arttıkça suda çözünme özelliklerini kaybettiklerinden, çözünür hale getirmek için daha yüksek miktarda DMSO'ya ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle

Çalışma genelinde, çözücü kontrol ve uygulama gruplarında son DMSO konsantrasyonu Solhaug vd. (2004) tarafından da kullanıldığı şekilde %0,5 olacak ayarlanmıştır. Fakat bu konsantrasyonda da kontrol hücrelerinde, yalnızca PBS uygulanan hücrelere göre, önemli miktarda apoptozun görülmesine yol açmıştır. Apoptotik hücreler turuncu renkte görülmektedir. PAH karışımının (0,250 ppm) uygulandığı HT-29 hücrelerine ait sonuçlar ise şekil 4.16'da gösterilmektedir.

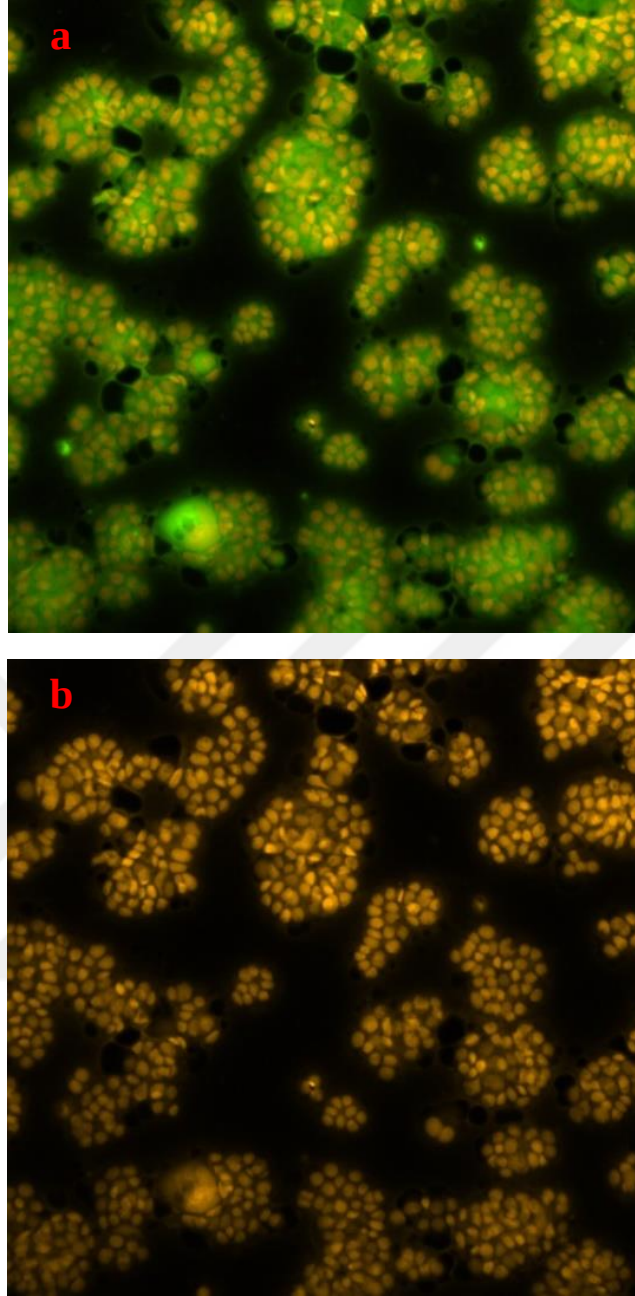


şekil 4.16. PAH (0,250 ppm) uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj – etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

HT-29 hücrelerine 0,250 ppm konsantrasyonda uygulanan PAH karışımı, hücrelerdeki apoptoz yollarını uyarak hücrelerin bu sürece girmesine neden olmuştur. Görüntü alanındaki hücrelerde fazla sayıda apoptotik turuncu renkli hücre gözlenmektedir. AFB₁ çalışması ile benzer şekilde PBS içinde süspanse edilmiş *L. plantarum* ve *L. rhamnosus*'un, HT-29 hücrelerinde gösterdiği apoptotik etki Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de gösterilmektedir.



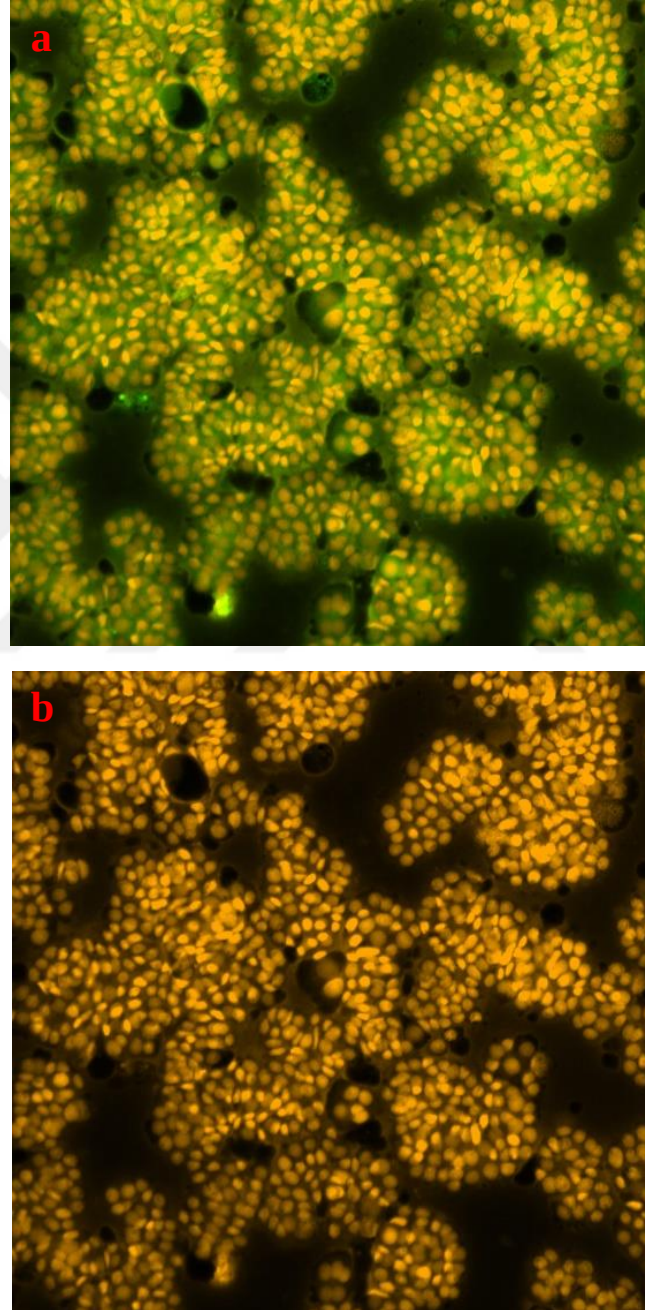
Şekil 4.17. *L. plantarum* uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj – etidyum Bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi



Şekil 4.18. *L. rhamnosus* uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj – etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

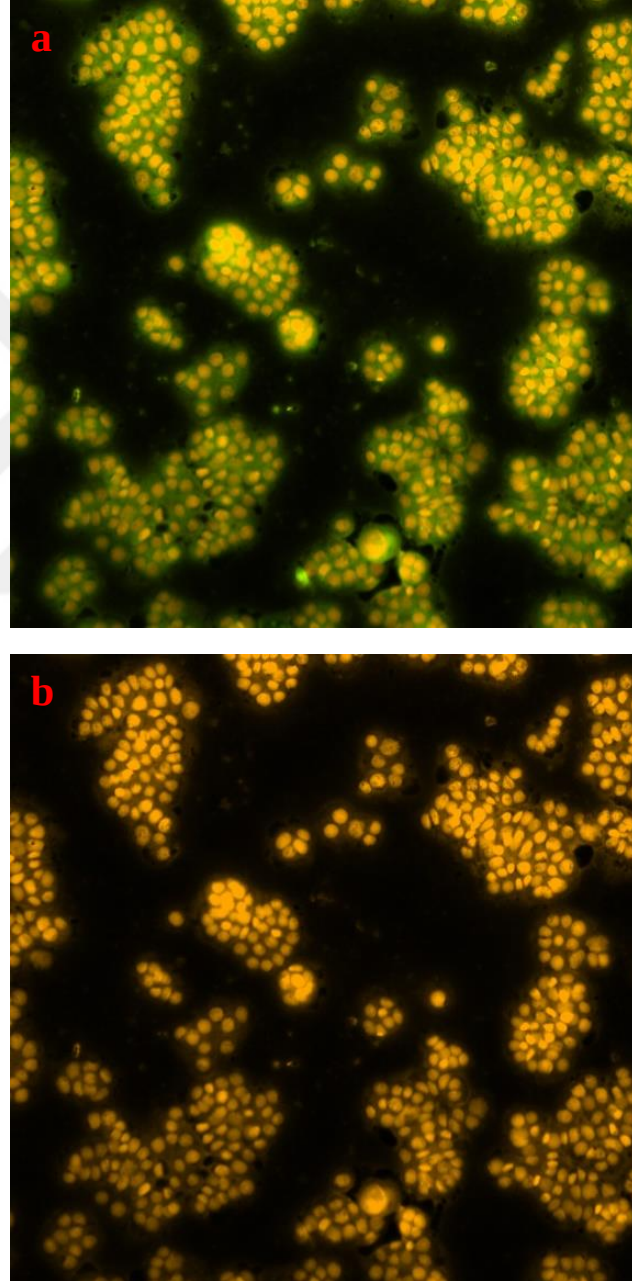
Çalışmada kullanılan *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* kolon adenokarsinoma hücre hattı olan HT-29 hücrelerinin önemli kısmında apoptoza yol açmıştır. HT-29 hücreleri üzerine doğrudan laktik asit bakterileri inoküle edilmediğinde bu apoptotik etkinin hücre dışı metabolitlerinden ve pH düşürücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada, Barron Gonzalez vd. (2014), *L. acidophilus* ve *B. longum*'un hücre dışı metabolitlerinin HT-29 kolon hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada, 10^9 kob/mL konsantrasyonundaki

L. casei'nin kolon kanser hücrelerinin canlılığında (HT-29 %78; CT26 %52) önemli azalışa yol açtığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *in vivo* çalışma ile 10^9 kob/mL *L. casei* ile beslenen farelerde, kolon karsinom hücrelerinin gelişimi önlenerek, tümör hacminin azalmasını sağlamıştır (Tiptiri-Kourpeti vd., 2016). *L. plantarum*-PAH karışımının birlikte uygulandığı hücreler Şekil 4.19'da görülmektedir.



Şekil 4.19. *L. plantarum*+PAH karışımı uygulanmış HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj - etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

Her biri ayrı ayrı apoptotik etkili olan bileşenler kombine olarak uygulandığında, hücrelerde yol açtıkları apoptotik etkinin de kuvvetlendiği görülmektedir. Etkilenmeden kalan hücrelerin (yeşil renkli) sayısının çok az olduğu, parlak turuncu apoptotik hücre sayısında artış olduğu bu çalışmada da gözlenmiştir. Benzer şekilde *L. rhamnosus*-PAH uygulanan hücrelere ait görsel Şekil 4.20’de gösterilmektedir.



Şekil 4.20. *L. rhamnosus* NRRL B-442+PAH karışımı uygulanan HT-29 hücreleri (a) Akridin oranj - etidyum bromür filtresi çakışık; (b) Etidyum bromür filtresi

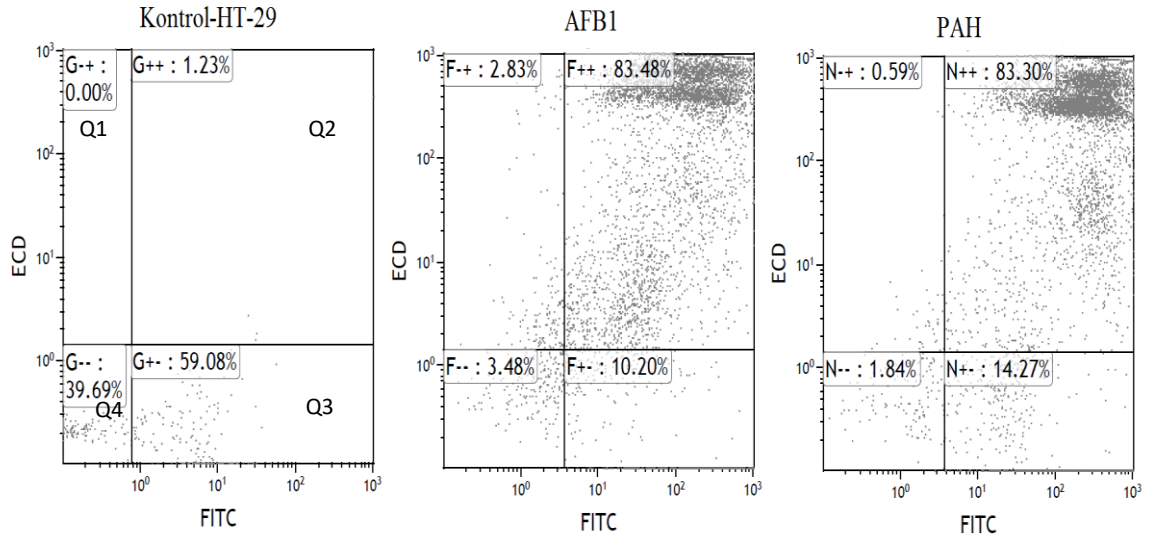
HT-29 hücrelerine *L. plantarum*-PAH kombine uygulamasına benzer şekilde, *L. rhamnosus*-PAH karışımı uygulandığında hücrelerde apoptozun önemli ölçüde artış gösterdiği görülmektedir.

4.4.2 Akım Sitometri-Apoptoz Testi

Fosfatidilserinin plazma iç membranından dış membran yüzeyine translokasyonu olan apoptoz; HT-29 hücrelerinin Annexin V-FITC ve propidyum iyodür kombinasyonu ile boyanmasının ardından akım sitometride analiz edilmiştir

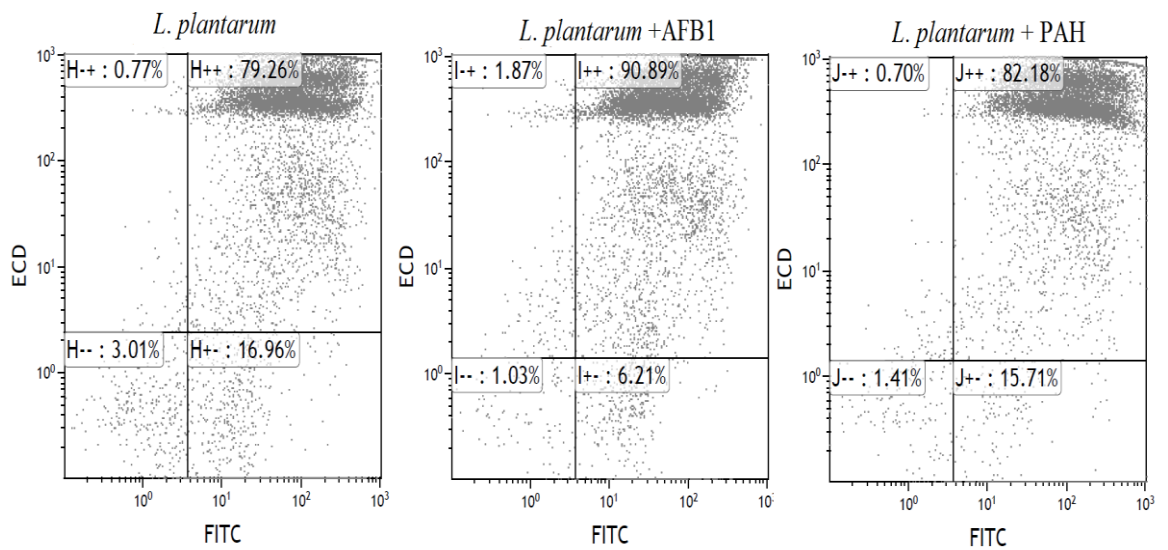
Testte hücreler uygulanan iki farklı boya olması nedeniyle hücreler, boyandıkları ya da bağlandıkları boyaya göre farklı dalga boyları ışına vermekte ve grafik üzerinde farklı bölgelerde görülmektedirler. Bu nedenle akım sitometri sonuçlarında incelenmesi gereken 4 adet kadran bulunmaktadır. 1. kadran (Q1), yalnızca propidyum iyodür ile boyanan, membran bütünlüğünü kaybederek bu boyayı tamamen hücre içine alan ve canlılığını kaybetmiş hücrelerin hesaplandığı bölgedir. İnflamasyon sonucu ölen nekrotik hücreler bu gölgede görülmektedir. İkinci kadran (Q2), geç apoptoz olarak da isimlendirilen hücrelerin her iki boya ile boyanabildiği bölgedir. Bu bölgede hücreler hem Annexin V hem de propidyum iyodür ile boyanmaktadır. Üçüncü kadran ise erken apoptozun tespit edilebildiği, hücrelerin yalnızca Annexin V ile boyandığı, fosfatidil serin translokasyonunun tamamlanmadığı bölgedir. Son olarak dördüncü kadran ise (Q4), herhangi bir boyaya ilgi göstermeyen, canlı hücrelerin bir arada olduğu bölgedir.

Genotoksinler, laktik asit bakterileri ve bunların kombinasyonunun uygulandığı HT-29 kolon kanseri hücreleri, erken apoptotik süreçte yalnızca fosfatidilserin translokasyonu nedeniyle Annexin V ile boyanmış (2. Kadran; Q2); ardından hem Annexin V hem de propidyum iyodür (PI) ile boyanmasıyla (3. kadran; Q3) hücrelerin membran bütünlüğünün kaybolmaya başladığı görülmüştür. Kontrol grubu, AFB₁ (100 µM) ve PAH (0,25 ppm) 'ın uygulandığı HT-29 hücrelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.21'de gösterilmektedir.



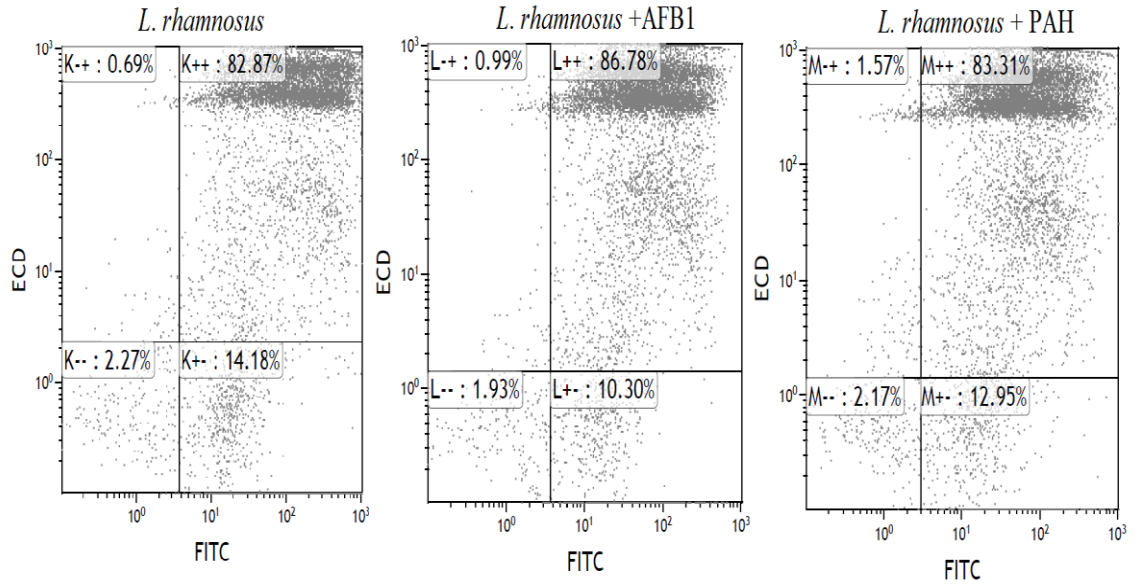
Şekil 4.21. Kontrol, AFB₁ ve PAH uygulanan HT-29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M AFB₁ uygulanan HT-29 hücrelerinde, 3. kadranda membran bütünlüğünü kaybetmeye başlayarak her iki boya ile boyanan geç dönem apoptotik hücrelerin sayısında artış görülmektedir (%83,48). Aynı durum 0,250 ppm PAH uygulanan hücrelerde de görülmektedir. Kontrol grubunda nekrotik hücre bulunmazken, genotoksinlerin uygulandığı HT-29 hücrelerinde az da olsa nekrotik hücre gözlenmektedir. *L. plantarum* ve genotoksinler ile kombinasyonlarının uygulandığı HT-29 hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimler Şekil 4.22’de gösterilmektedir.



Şekil 4.22. *L. plantarum*, *L. plantarum* + AFB₁ ve *L. plantarum* + PAH uygulanan HT- 29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *L. plantarum* uygulanan HT-29 hücrelerinin önemli bir kısmının (%79,6'sının) membran bütünlüğünü kaybetmeye başlayarak hem propidyum iyodür hem de Annexin V boyası ile boyanarak geç apoptotik evreye girmeye başladığı görülmektedir. Hücrelere AFB₁+*L. plantarum* karışımı birlikte uygulandığında bu süreçteki hücre sayısı, yalnızca *L. plantarum* uygulanan hücrelere göre artış göstererek popülasyondaki hücrelerin %90,89'unun geç apoptoz evresinde olduğu belirlenmiştir. Tüm hücrelerin %6,21'i ise yalnızca Annexin V ile boyanarak erken apoptoz sürecinde olduğu görülmektedir. PAH+*L. plantarum* uygulanan HT-29 hücrelerinde ise, *L. plantarum*'a göre daha yüksek fakat AFB₁ ile karşılaştırıldığında daha az sayıda hücre geç apoptotik evrede bulunmaktadır. Her üç çalışma grubunda da çok az sayıda hücrenin nekrotik süreç ile öldüğü görülmektedir. Benzer şekilde *L. rhamnosus* ve *L. rhamnosus*-AFB₁ ve *L. rhamnosus*+PAH uygulamalarının HT-29 hücrelerine gösterdiği etki Şekil 4.23'te gösterilmektedir.



Şekil 4.23. *L. rhamnosus*, *L. rhamnosus*+AFB₁, *L. rhamnosus*+PAH uygulanan HT-29 hücrelerinin akım sitometri sonuçları

L. rhamnosus ve genotoksinlerin kombinasyonlarının uygulandığı HT-29 hücrelerinde *L. plantarum* ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. *L. rhamnosus* ve genotoksinler ile birlikte yapılan tüm gruplarda hücrelerin önemli kısmının membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığı görülmektedir.

HT-29 hücrelerine, *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 uygulaması süresince, hücrelerin büyük bir kısmı (<%80), hem AnnexinV hem de propidyum iyodür ile boyanarak geç apoptotik evreye girdikleri görülmüştür. Genotoksinler ile ko-inkübe edilen laktik asit bakterisi filtratlarının uygulandığı HT-29 hücrelerinde Annexin V ve PI ile boyanma oranları, yalnızca laktik asit bakterisi uygulama grubuna göre artarak %90'a kadar çıkmış ve popülasyondaki canlı ve sağlıklı hücre sayısında önemli azalış gözlenmiştir. Hem genotoksinler hem de laktik asit bakterileri ile bunların kombinasyonları, hücreleri inflamasyona uğratmadan yani nekroza neden olmadan apoptotik süreçte elemine edilmelerini sağlamıştır. Çalışma ile benzer sonuçlar, Jan vd. (2002) tarafından da elde edilmiştir. *Propionibacterium* spp. ile yaptıkları çalışmada, bu laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının HT-29, Caco-2 ve Jurkat lenfoma hücrelerinin ölümüne yol açtığı; dolayısıyla kanser hücrelerinin ölüm nedeninin besin ortamı içerisinde bulunan çözünür bileşenler olduğu belirtilmektedir. Gastrik (AGS), hepatoma (Hep-G2) ve kolon (Caco-2 ve HT-29) kanseri hücre hatları ile sağlıklı insan epitel hücresi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise, süt ürünlerinden izole edilen ve probiyotik özelliği belirlenmiş *Kluyveromyces marxianus*'un salgıladığı metabolitlerin, bu hücrelerde yarattığı apoptotik etki araştırılmıştır. *K. marxianus*'un iyi bir anti-kanserojen etki göstererek AGS hücrelerinde canlılığın %53,8 azalmasına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca metabolitlerinin, AGS kanser hücrelerinde Bcl-2 grubunun gen ekspresyonunu azalttığı, BAD ve CASP-9 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak *K. marxianus*'un ürettiği metabolitlerin; epitel kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği, fakat normal hücrelerde önemli etki göstermediği görülmüştür (Saber vd. 2017). Mikrobiyotada yer alan probiyotikler sağlıklı hücrelerde apoptoz oluşumunu önlemektedir. Tedavi amacıyla kullanılan probiyotikler, bağırsak epitellerinde homeostazı sağlayarak, hücre canlılığının devamını ve bariyer fonksiyonun iyileşmesini sağlar. Bağırsak epitellerinin bütünlüğünün sürekliliği, *E. coli* gibi invaziv patojenlere karşı koruyucu etki sağlamaktadır (Hausmann 2010).

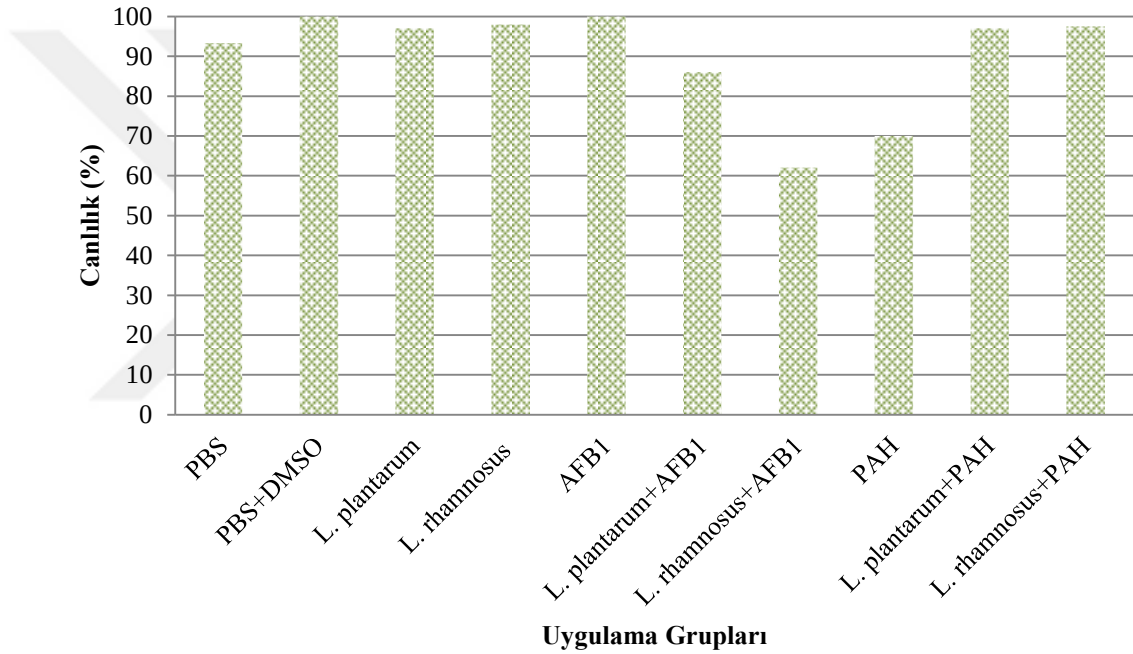
4.5 Comet ve Tripan Mavisi Testi

Comet testti, ökaryot hücre temelli tek hücrede oluşan DNA hasarını göstermek amacıyla tasarlanmış bir analiz yöntemidir. Bu test yapılmaya başlamadan

önce hatalı pozitif sonuçların önüne geçmek için hücre canlılıklarının kabul edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada hücre canlılıkları, membran geçirgenliğine dayalı bir yöntem olan tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiştir.

4.5.1 Tripan Mavisi Testi

Tripan mvisi ile boyandıktan sonra Neubauer hemositometresinde sayılan hücrelerin % canlılık değerleri Şekil 4.24’de grafik üzerinde gösterilmiştir. Teste devam etmek için hücre canlılığının %70 ve üzeri olması gerekmektedir.



Şekil 4.24. Comet testi öncesi HT-29 hücrelerinin tripan mavisi testi canlılık yüzdeleri

Tripan mavisi test sonuçlarına göre HT-29 hücrelerine genotoksini laktik asit bakterisi ve bunların kombinasyonu uygulandığında tripan mavisi testine göre canlılıklarını koruduklarını belirlenmiştir. Akım sitometri testinde kullanılan canlılık boyası olan propidyum iyodür, tripan mavisi ile benzer özellik gösteren bir boyadır. Bu tip testlerde membran bütünlüğü bozulan hücreler, hücre içine giren boya nedeniyle hücre boyanın renginde görülmektedir. Comet testi, tek hücrede çekirdek DNA’sında oluşan hasarları görüntüleme/ölçmeye yarayan bir test tekniği olduğu için, canlılık yüzdesi %70’in altında olduğu durumlarda hücrelerin büyük kısmı ölü

ve hasarlı olacağından hatalı pozitif sonuçlar alınmasına neden olmaktadır. Buradan çıkarılacak bir diğer sonuç ise kullanılan genotoksinlerin HT-29 hücre hattında sitotoksik etkiye yol açmamış olmasıdır.

4.5.2 Comet Testi

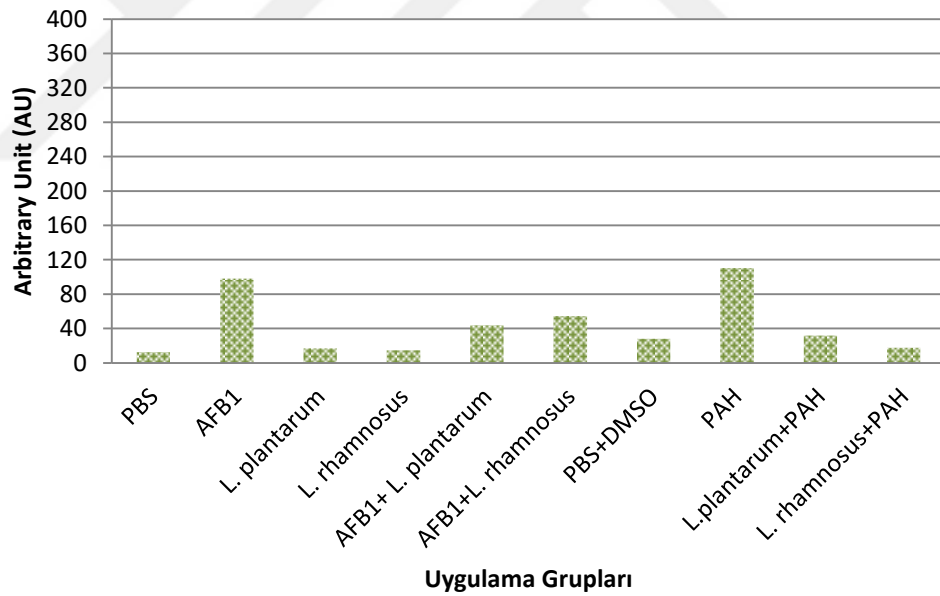
Genotoksinlerin HT-29 hücrelerinin DNA'larında oluşturdukları hasarın gösterilebilmesi için gerçekleştirilen comet testinde uygulama grupları negatif kontrol, genotoksin grubu (100 μ M AFB₁ ve 0,25 ppm PAH karışımı), laktik asit bakterileri kontrol grubu ve genotoksin+laktik asit bakterisi karışımından oluşmaktadır. HT-29 hücreleri, sitokrom c enzim grubuna sahip olduklarından dışarıdan S9 enzim ilavesine gerek kalmadan hasarın tespiti sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Comet testi skorları (Hasar Miktarı (AU)±Standart Sapma)

Grup	Hasar Miktarı	Grup	Hasar Miktarı
PBS	12,5 ^c ±8,94	AFB ₁ + <i>L. rhamnosus</i>	48,26 ^b ±14,09
AFB ₁	98,11 ^a ±19,65	PBS+DMSO	28,33 ^{b,c} ±4,71
<i>L. plantarum</i>	16,99 ^c ±8,98	PAH	115,69 ^a ±2,55
<i>L. rhamnosus</i>	14,85 ^c ±3,33	<i>L. plantarum</i> +PAH	31,77 ^{b,c} ±5,38
AFB ₁ + <i>L. plantarum</i>	43,84 ^b ±1,39	<i>L. rhamnosus</i> +PAH	17,68 ^c ±6,43

Yapılan uygulamalarda PBS içeren negatif kontrol ile uygulama grupları olan *L. plantarum*, *L. rhamnosus* NRRL B-442 ile *L. rhamnosus*+PAH uygulama gruplarında tespit edilen hasarın büyüklüğü bakımından aralarında istatistiksel olarak önemli fark oluşmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Yalnızca AFB₁ ile PAH uygulanan hücrelerde ise oluşan hasarın derecesi diğer uygulama gruplarına göre çok yüksektir. Yalnızca genotoksinlerden oluşan bu iki grup kendi arasında önemli fark göstermezken ($p>0,05$), diğer uygulama ve kontrol grupları ile aralarında oluşan farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bir diğer kontrol grubu olan DMSO içeren negatif kontrol grubu ve *L. plantarum*+PAH uygulama grubunda da hasar miktarı, yalnızca genotoksin içeren uygulama grupları kadar yüksek olmasa da bir miktar artış göstermiştir. Bu artış diğer kontrol grupları ve

yalnızca laktik asit bakterisi uygulanan gruplar ile arasındaki hasar farkı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ancak AFB₁+*L. plantarum* ve AFB₁+*L. rhamnosus* gruplarında laktik asit bakterileri, yalnızca genotoksin içeren gruplara göre hasar miktarı azaltsa da hasarın tamamen önüne geçememiş ve kontrol gruplarına göre istatistik olarak önemli farkın oluşmasına yol açmıştır ($p<0,05$). BLaktik asit bakterilerinin önleyemediği bu hasar, AFB₁ ile karıştırılan laktik asit bakterilerinin, hücre kültürü içerisine uygulanacak son konsantrasyonun 100 µM AFB₁ olacak şekilde ayarlanacak olması nedeniyle, başlangıçta 100 µM'dan daha yüksek konsantrasyonda AFB₁'e maruz bırakılması ve bu nedenle sayılarının yetersiz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çünkü öncesinde yaptığımız HPLC çalışmasında kullanılan laktik asit bakterilerinin AFB₁'i oldukça yüksek oranlarda bağlayabildiği belirlenmiştir. Hesaplanan hasar değerleri grafik üzerinde Şekil 4.25'de gösterilmiştir



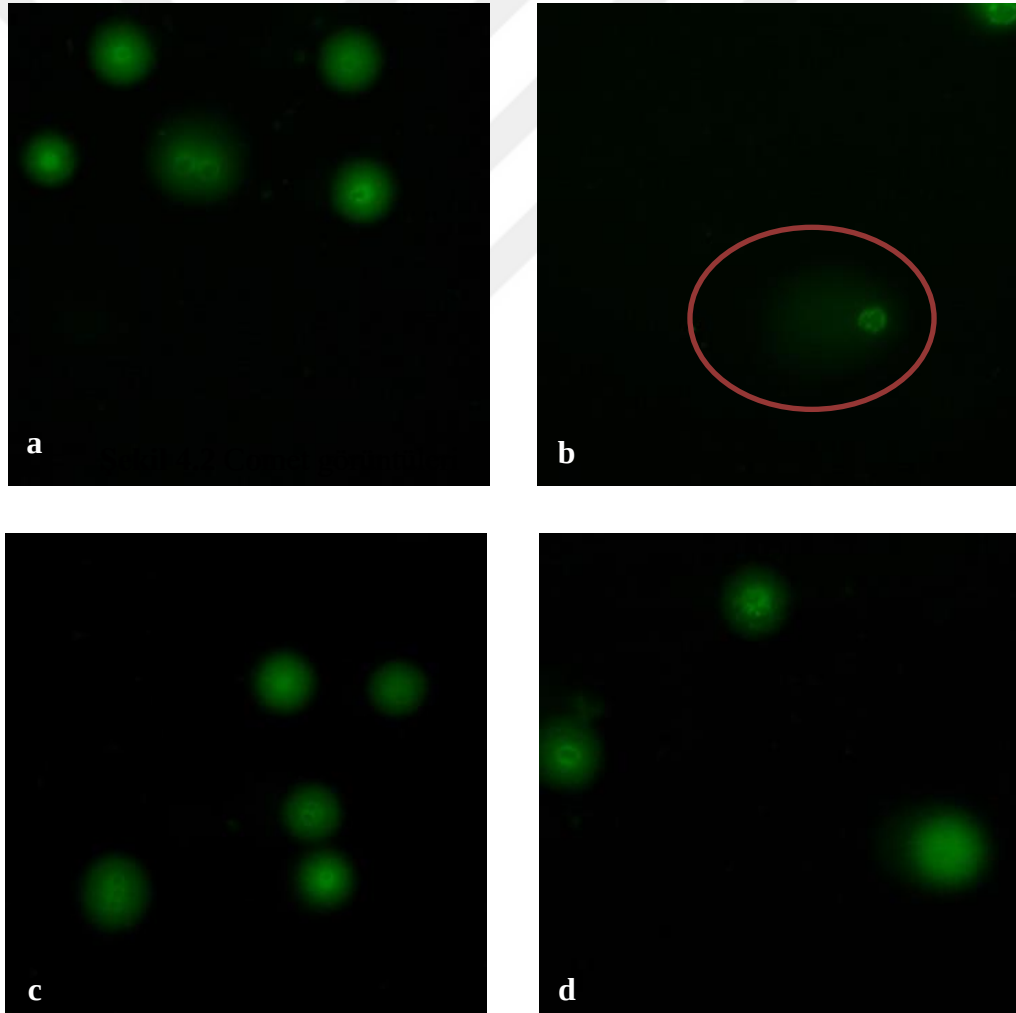
Şekil 4.25. Genotoksin uygulaması sonucu elde edilen comet skorları

Comet testi skorlarının görsel hesaplanmasında hücreler hasar/hasarsızlık durumuna göre beş ayrı kategoride toplanmaktadır. Her bir kategorideki hücrelerin toplam sayı içindeki yüzdeleri belirlenerek, kategorilere ait katsayılar ile çarpılmaktadır. Yani grafikte “Arbitrary Unit” olarak gösterilen skalada 0, sayılan tüm hücrelerin hasarsız; 400 ise sayılan tüm hücrelerin hasarlı olduğunu

varsaymaktadır. Bu şekilde grafik incelendiğinde AFB₁ ve PAH uygulanan hücrelerde oluşan hasar değerleri ile diğer gruplar arasında hasar bakımından önemli fark oluşmuştur. Benzer bir çalışmada; ratların kolon hücrelerinde 1,2-dimetilhidrazin tarafından indüklenen DNA kırıklarının, oral olarak tükettikleri *L. bulgaricus* 191R tarafından önlendiği; fakat *S. thermophilus* CH3'ün DNA kırıklarını önlemede etkili olmadığı belirlenmiştir (Wollowski vd., 1998).

4.5.2.1 AFB₁ Genotoksisite Sonuçları

AFB₁ tarafından tetiklenen DNA hasarı ve laktik asit bakterileri tarafından bu hasarın önlenmesine ait comet testi görselleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



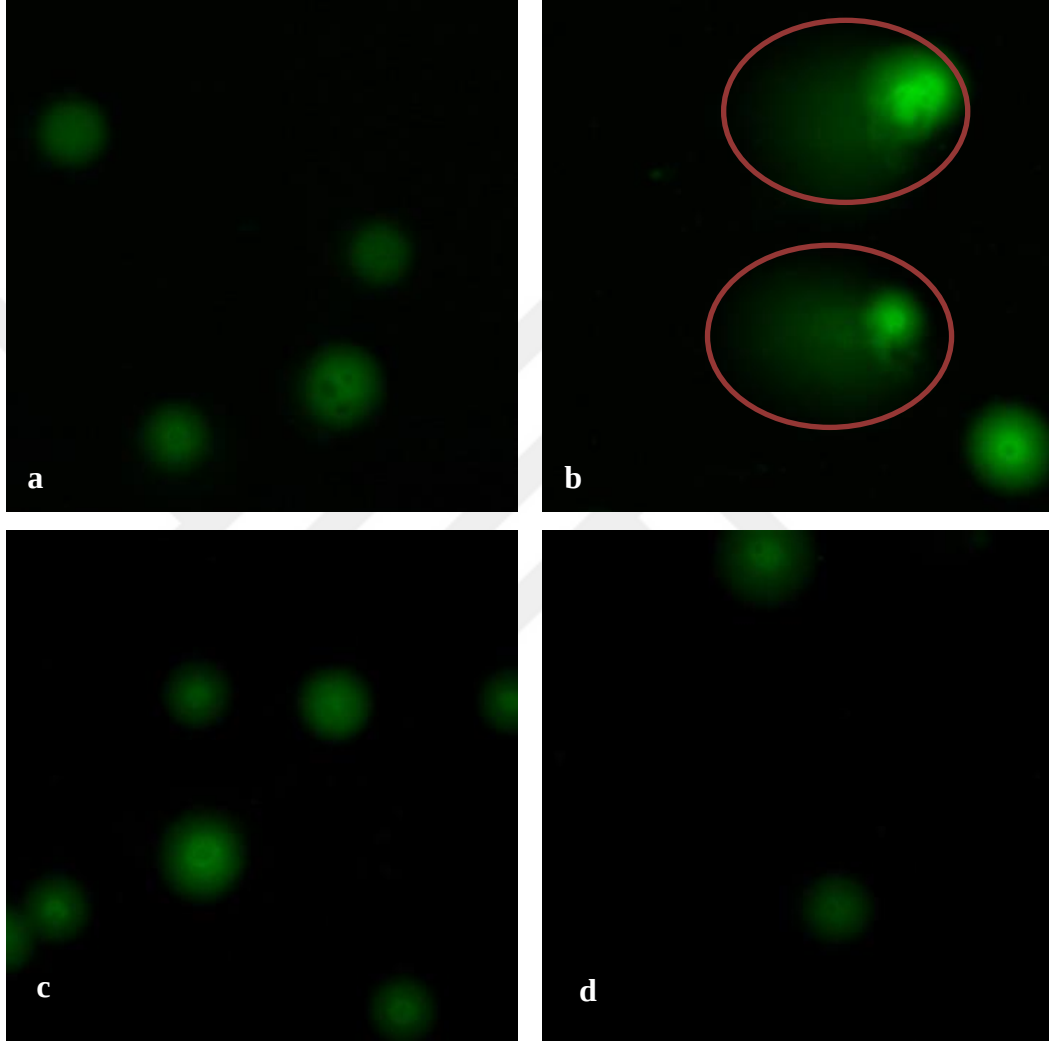
Şekil 4.26. AFB₁, AFB₁+laktik asit bakterisi ve PBS'e ait comet testi görüntüleri (a) PBS; (b) AFB₁ (100 µM); (c) *L. plantarum*+AFB₁; (d) *L. rhamnosus* +AFB₁ uygulanan HT-29 hücreleri

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde AFB₁ uygulanan hücrelerde, comet testinde hasarın tespitini sağlayan kuyruk oluşumu yuvarlak içine alınarak gösterilmiştir. Burada çekirdekte DNA'sında oluşan kırıklar uygulanan elektrik akımı nedeniyle agaroz içerisinde sürüklenerek bu görüntüyü oluşturmaktadır. PBS uygulanmış olan negatif kontrol grubunda ise hücre DNA'sında hasar gözlenmemekte, çekirdek bütünlüğünü korumaktadır. AFB₁ ile birlikte süspanse edildikten sonra HT-29 hücrelerine uygulanan örneklerde ise negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerin DNA bütünlüğünde daha fazla bozulma olduğu görülmektedir. Bu çalışma ile benzer bir araştırma Caldini vd. (2005) tarafından gerçekleştirilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *L. acidophilus* suşlarının 4-NQO ve MNNG karşı DNA biyokoruyucu özelliklerini hem kısa süreli prokaryot temelli (SOS-Kromotest ve Ames Testi) hem de ökaryot temelli comet testi ile Caco-2 enterositlerinde test etmişlerdir. Mozarella peynirinden izole edilen 6 farklı *L. rhamnosus* ile 3 farklı *L. plantarum* suşunun, 4-NQO'nun genotoksitesini %75'in üzerinde engellediği hem SOS kromotest hem de comet testi ile tespit etmişlerdir. Aynı laktobasillerin ise, 4-NQO'nun mutajenitesinin neredeyse tamamını engellediği belirlenmiştir. Laktobasiller ile MNNG ko-inkübasyonunda, SOS-Kromotest veya Ames testi ile belirlenebilen bir inhibisyon etki gözlenmemiştir.

Cenci vd. (2005) tarafından, spor oluşturan probiyotik (*Bacillus clausii* 4 suş, *B. subtilis* *B. lentus* 2 suş) ve probiyotik olmayan *Bacillus*'ların (*B. clausii* 3 suş, *B. subtilis* 4 suş, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. megaterium* ve *Bacillus* sp.) 4-NQO, MNNG, MelQ ve AFB₁'nin genotoksik etkinliğini düşürme özelliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan tüm *Bacillus* suşlarının, hem 4-NQO hem de MNNG'nin SOS-kromotestte ölçülen indüksiyon faktörünü eşik değerinin altına indirdiği belirlenmiştir. Fakat referans olarak kullanılan laktik asit bakterisi *L. rhamnosus* GG suşunun, 4-NQO'ı indirmede başarılı olduğu ancak MNNG tarafından oluşturulan genetik toksisiteyi önleyemediği bildirilmektedir. Kullanılan tüm suşların AFB₁ ve MelQ'yu indirgeme etkinlikleri ise diğer genotoksinlere göre çok daha zayıftır. AFB₁ ko-inkübasyonunda yalnızca *L. rhamnosus* GG, indüksiyon faktörünü eşik değerinin altına çekmiştir.

4.5.2.2 PAH Genotoksisite Sonuçları

PAH karışımının HT-29 hücrelerinde yol açtığı DNA hasarı ile PAH karışımının, *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442 tarafından tutularak HT-29 hücrelerinde önlediği DNA hasarına ait sonuçlar Şekil 4.27’de gösterilmiştir.

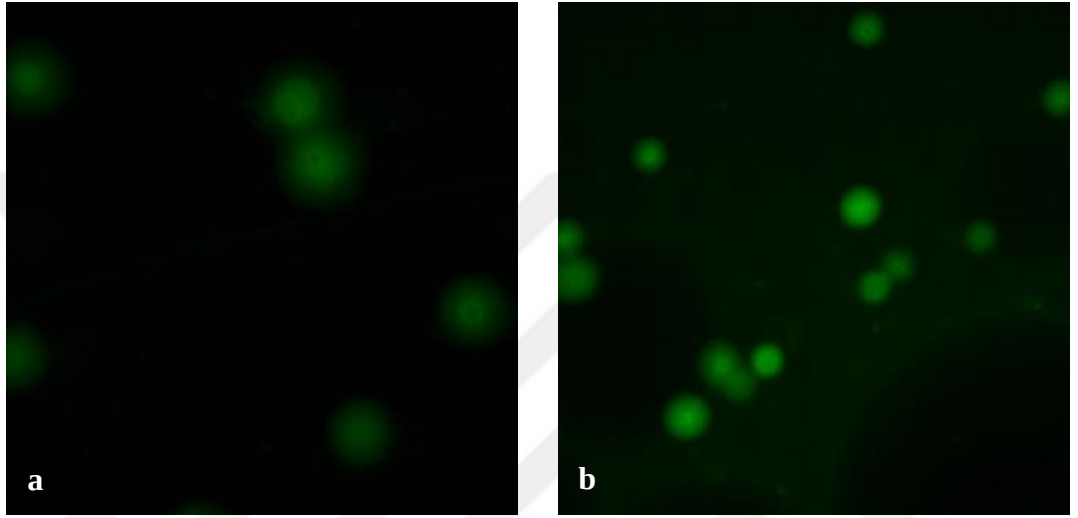


Şekil 4.27. PAH, PAH+laktik asit bakterisi ve negatif kontrole ait comet testi Sonuçları (a) Negatif kontrol (PBS içinde %0,5 DMSO); (b) PAH (0,25 ppm); (c) *L. plantarum*+PAH; (d) *L. rhamnosus* NRRL B- 442+PAH

AFB₁ ile benzer şekilde PAH karışımı da HT-29 hücrelerine uygulandığında hücre DNA'sında önemli miktarda kuyruk oluşumuna neden olmuştur. PAH karışımının neden olduğu DNA hasarı görsel üzerinde kırmızı daire içinde gösterilmektedir. Kuyruktaki kırık DNA yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu hasarın derecesinin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Fakat PAH+laktik asit bakterisi karışımları

hücelere uygulandığında oluşan hasar miktarı negatif kontrol ile benzer karakteristik göstermiş, hücrelerin bir çoğunda DNA kırığı gözlenmemiştir.

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* NRRL B-442'nin HT-29 hücrelerine genotoksik etki gösterip göstermediği de araştırılarak sonuçlar bir diğer kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu testte alınan sonuçlar Şekil 4.28'de gösterilmektedir.



Şekil 4.28. Yalnızca laktik asit bakterilerinin uygulandığı comet testi görselleri (a) *L. plantarum*; (b) *L.rhamnosus* NRRL B-442

Elde edilen sonuçlara göre kullanılan laktik asit bakterilerinin HT-29 hücrelerine herhangi bir genotoksik etki göstermediği ve kullanımı güvenli suşlar olduğu tespit edilmiştir.

Bakteriyel genotoksisite sistemlerinde yüksek genotoksisite gösteren maddeler, memeli hücre kültürlerinde daha düşük genotoksisite göstermektedir. Toksisitesi araştırılan bu bileşenler etkinliklerini, sitokrom P450'ye bağımlı enzimler tarafından metabolik dönüştürülerek göstermektedir (Pool-Zobel ve Leucht, 1997). Pei-Ren vd. (2002), B[a]P'in mutajenitesinin bifidobakter suşları tarafından giderimini, prokaryot temelli mutajenite testi olan Ames testi ile çalışmıştır. Kullandığı bifidobakter suşlarının birçoğu, B[a]P'in mutajenitesini %50'nin üzerinde inhibe etmiştir. Kullandığı suşlardan *B. bifidum* (%85,6), *B. lactis* (%83,3) ve *B. longum*'un (%87,8); *B. adolescentis* (%48,9), *B. breve* (%66,7) ve *B. infantis*'e (%66,7) göre daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Wang vd. (2014) tarafından DNA

hasarı apoptoz belirteci olarak ifade edilmektedir. Bileşiminde 80 µg /mL protein bulunan laktik asit bakterisi hücre duvarı ve sitoplazma ekstraktının, HT-29 hücrelerinin DNA'sına önemli miktarda zarar verdiği ve kuyruktaki DNA miktarını arttırdığı belirtilmektedir. Çekirdek DNA'sının %80'den fazlasının comet kuyruğunda görülmesi "hedgehog" olarak adlandırılmaktadır (Lorenzo vd., 2013). Fakat Collins ve Brunberg (2017), Comet testinde görülen ve "hedgehog" oluşumu olarak tanımlanan bulutsu kuyruk görüntüsü, bir kısım araştırmacılar tarafından apoptoz indikatörü olarak görülse de, comet testinin bir apoptoz testi olmadığını belirtmektedirler. Çünkü comet testi fragment büyüklüğü hakkında bilgi vermediği gibi bu fragmentler kısa elektroforez süresince ayrılmasına olanak tanımamaktadır (Olive ve Banáth, 2006). Bu görüntü apoptozun aksine, sitotoksitenin bir göstergesidir (Lorenzo vd., 2013)

Bu nedenle bizim çalışmamızda da, apoptoz testlerinde yalnızca laktik asit bakterilerinin uygulandığı gruplarda da görülen apoptoz, comet testinde hücrelerin hasarsız ya da az hasarlı görünmesini sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca apoptozda oluşan 180-200 bp uzunluğundaki DNA fragmentlerinin, comet testinde uygulanan düşük voltaj ve kısa süreli elektroforez işlemi ile ayrılamayacak kadar büyük olduğu bilinmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma süresince, hem PBS içinde hem de genotoksin içinde çözünmüş laktik asit bakterilerinin sayısında uygulamalar boyunca önemli değişiklik tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, endüstride kullanıldıkları alanlar ve probiyotik özellikleri düşünüldüğünde kullanılan suşların üstün özelliklerini göstermektedir.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), insan tüketimine sunulan gıdalarda (süt hariç) izin verilen en yüksek aflatoksin miktarı 20 ppb olarak belirlemiştir. Codex Alimentarius, Avrupa Birliği ülkelerinde süt ve süt ürünlerinde AFM₁ cinsinden en yüksek kalıntı miktarının 0,05 µg/kg (ppb) düzeyini aşmaması gerektiğini belirtmektedir (Codex Alimentarius Commision 2001, Serrano-Niño vd., 2013). Bu kapsamda çalışılan laktik asit bakterilerinden *L. rhamnosus* NRRL B-442, 5 ppm aflatoksin içeren PBS ile karıştırıldığı anda (0. saatte) %78,10±7,24 oranında, *L. plantarum* ise 12 saat ko-inkübasyon sonunda %75,93±3,42 oranında serbest AFB₁ miktarında azalışa yol açtığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında normal koşullarda, çalışılan bu yüksek dozlarda AFB₁'e maruziyet çok sık karşılaşılabilecek bir durum olmadığından, belirli aralıklarla düşük dozlarda maruz kalınan AFB₁'in bağırsak florasında yer alan probiyotik laktik asit bakterileri tarafından önemli ölçüde etkisiz hale getirilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada aynı miktarda inoküle edilmelerine rağmen, genellikle sayı bakımından (~1 log) üstün olan tür *L. rhamnosus* NRRL-B442 olmuştur. Suşun daha yüksek miktarda AFB₁ uzaklaştırmasının nedeninin sayısının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dolayısıyla yüksek sayıdaki laktik asit bakterilerinin, AFB₁ bağlanma miktarı ve hızının artmasını sağladığı bu nedenle *in vitro* çalışmalarda uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç olmadığı tespit edilmiştir.

Sağlıklı bir bireyin (19-50 yaşları arasında, sigara içmeyen) günlük PAH maruziyetinin %96,2'si gıda, %1,6'sı hava, %0,2'si su ve %0,4'ü toprak kaynaklıdır (WHO, 2000). Türk Gıda Kodeksi Kalını ve Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre benzo[a]piren, benzo[a]antrasen, benzo[b]floranten ve krizen toplamı yetişkin ürün grupları için en düşük 10 µg/kg, en yüksek 35 µg/kg olarak belirlenmiştir (TGK,

2011). Gıda yoluyla maruz kalınan PAH bileşenleri, çalışma kapsamında kullanılan PAH değerlerinden çok daha düşük konsantrasyondadır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, hem mikrobiyotada bulunan laktik asit bakterileri hem de dışarıdan takviye olarak tüketilecek fermente ve probiyotik ürünlerde bulunan bazı laktik asit bakterilerinin genotoksin maruziyetin önemli ölçüde önleyebileceği anlaşılmaktadır.

Beslenme yoluyla tüketilen AFB₁ ile kontamine gıdaların yanında, yüksek sayıda laktik asit bakterisi içeren gıda katkısı ve/veya fermente ürünlerin tüketilmesi intestinal sistemden emilen AFB₁ miktarının azaltılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Bu bileşenlerin kendi aralarında antagonistik veya sinerjik etki gösterme ihtimali nedeniyle hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuçlar alınabilme ihtimali olabileceği dikkate alınarak bundan sonraki çalışmalarda tek bir bileşen kullanılarak da bu konuda çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Genotoksinlerin yol açtığı tümör ve laktik asit bakterileri tarafından engellenen tümör oluşumu *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir. Bu çalışmada, kolon kanser hattı olan HT-29 hücrelerinde genotoksinlerin yol açtığı apoptozdan daha çok laktik asit bakterilerinin indüklediği apoptoz önemlidir. Çünkü kanser hattı olan HT-29'da görülen bu apoptoz; laktik asit bakterisi ve probiyotiklerin, özellikle kolon kanseri ile mücadele eden hastaların tedavisinde ulaşabilecekleri en kolay desteği sağlayacak potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen apoptoz ve tek hücre DNA hasarı sonuçlarının gen ekspresyonu seviyesinde belirlenmesi, burada kullanılan yöntemlerin ve elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır. Ayrıca apoptotik etkiyi yaratacak olan kimyasal/biyolojik ajanların kullanılacak etkili miktarının, doz-cevap uygulaması daha hassas teknikler ile belirlenmesi çalışmaların güvenilirliğini arttıracaktır. Bu kapsamda yapılacak bir çalışma sonraki hedefler arasında yer almaktadır.

In vitro çalışmalarda yüksek konsantrasyonda probiyotik içeren kültürler ile gerçekleştirilmekte olup, gıda matriksi içerisinde saf kültür olarak bu kadar yüksek sayıda probiyotik yer alamayacağından, bundan sonra yapılacak çalışmalarda, gıda

matriksi veya uygun probiyotik karışımları/kombinasyonları ile birlikte arařtırmaların gerçekleřtirilmesinin elde edilen bilgi birikimine katkı saęlayacaęı dūřūnūlmektedir.

Bu çalıřmadan da anlařılabileceęi ūzere, yaygın gıda kontaminantı olan AFB₁'in ve PAH bileřenlerinin gıda ūretiminde kullanılan, insan mikrobiyotasında doęal olarak bulunan ve gerektięinde gıda takviyesi olarak tūketilebilen laktik asit bakterileri tarafından etkin bir řekilde baęlanarak etkisiz hale getirebileceęi gōrūlmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abd-Allah GA, El-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA and O'Neill KL (1999) "A comparative evaluation of aflatoxin B₁ genotoxicity in fish models using the Comet assay", *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446(2), 181-188.
- Abid-Essefi S, Baudrimont I, Hassen W, Ouanes Z, Mobio TA, Anane R, Bacha H (2003) "DNA Fragmentation, Apoptosis and Cell Cycle Arrest Induced by Zearalenone in Cultured DOK, Vero and Caco-2 Cells: Prevention by Vitamin E", *Toxicology*, 192(2-3): 237-48.
- Abou-Arab AAK, Salim A-B, Maher RA, El-Hendawy HH and Awad A (2010) "Degradation of Some Lactic Acid Bacteria As Affected By Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" *Journal of American Science*, 6(10), 1237-1246.
- Abou-Arab AAK (2015) "Persistence of Some Lactic Acid Bacteria As Affected By Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Journal of Microbiology & Experimentation* 2(5):1-6.
- Adams MR and Marteau P (1995) "On the safety of lactic acid bacteria from food", *International Journal of Food Microbiology*, 27: 263-264.
- Adebola O, Corcoran O and Morgan W A (2013) "Protective Effects of Prebiotics Inulin and Lactulose from Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Colon Adenocarcinoma Cells", *Food Research International*, 52(1): 269-74.
- Ahlberg S, Korhonen H, Joutsjoki V and Grace D (2013) "Creating Novel Approaches to Mitigate Aflatoxin Risk in Food and Feed with Dairy Derived Proteins and Lactic Acid Bacteria", *Ecohealth*, 1-3 October Côte d'Ivoire Africa.
- Alenzi FQ (2004) "Links between Apoptosis, Proliferation and the Cell Cycle", *Br J Biomed Sci*, 61(2): 99-102.
- Ambalam P, Raman M, Purama RK, and Doble M (2016) "Probiotics, Prebiotics and Colorectal Cancer Prevention", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1): 119-31.
- Anonim (2015) http://ilachakkinda.com/t/74928/ksenobiyyotik%C2%A0anlami_nedir.html, 15.11.2015.
- Anonim (2017) <http://www.crios.be/PAHs/toxicology.htm>, 20.01.2017.
- Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sa Junior PL, Nozima BHN, Ito ET, de Carvalho RF, de Souza EB, de Cassia Stocco R (2015) "Using the Comet and

Micronucleus Assays for Genotoxicity Studies: A Review”, Biomedicine and Pharmacotherapy, 72: 74-82.

Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G and Fiocco D (2016) “Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms” Frontiers in Microbiology, 7(APR), 1-10.

Arıgöl M ve Zorba M (2014) “Mikotoksin Detoksifikasyon Yöntemleri” 1. Ulusal Mikoloji Günleri, 1-4 Eylül 2014, Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum, Türkiye.

ATCC (American Type Culture Collection) (2016)
https://www.lgcstandardsatcc.org/Products/All/HTB38.aspx?geo_country=tr#characteristics, 29.07.2017

Ayhan B (2013) İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Emodinin Mitokondriyal Sinyal İletim Yolağı Aracılığı ile Apoptoza Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Azqueta A, Meier S, Priestley C, Gutzkow KB, Brunborg G, Sallette J, Soussaline F and Collins A (2011) “The Influence of Scoring Method on Variability in Results Obtained with the Comet Assay”, Mutagenesis, 26(3): 393-99.

Azqueta A and Collins A R (2013) “The Essential Comet Assay: A Comprehensive Guide to Measuring DNA Damage and Repair”, Archives of Toxicology, 87(6): 949-68.

Barron Gonzalez MP, Mendoza Flores P, Garza Aguirre R, Monreal Cuevas E, Moreno Limon S, Tamez Guerra P, Gomez Flores R and Morales Vallarta MR (2014) Biological activity of probiotics metabolites in human tumor cells HT-29. 5th World Congress on Biotechnology, June 25-27 2014, Valencia Conference Centre, Valencia, Spain.

Bartkiene E, Bartkevics V, Mozuriene E, Krungleviciute V, Novoslavskij A, Santini A, Rozentale I, Juodeikiene G and Cizeikiene D (2017) “The Impact of Lactic Acid Bacteria with Antimicrobial Properties on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Biogenic Amines in Cold Smoked Pork Sausages”, Food Control, 71: 285-292.

Başbayraktar V 2009 “Soğutma ve Radurizasyonun Tavuk Eti Kalitesine Etkisinin DNA Comet Assay Yöntemi ile Belirlenmesi”, Doktora tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z ve Gürsel B (2004) “DNA Hasarı Analizinde M-FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması”, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2(3): 97-103.

Ben Salah-Abbès J, Abbès S, Jebali R, Haous Z and Oueslati R (2014) “Potential Preventive Role of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin M₁

Immunotoxicity and Genotoxicity in Mice”, Journal of Immunotoxicology, 6901:1-8.

Bensassi F, El Golli-Bennour E, Abid-Essefi S, Bouaziz C, Hajlaoui M R and Bacha H (2009) “Pathway of Deoxynivalenol-Induced Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells”, Toxicology, 264(1-2): 104-9.

Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L and G Di Fronzo (1997) “Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line”, Nutrition and Cancer, 28(1): 93-99.

Biology Noteshelp, Cell Cycle Checkpoints;
<http://www.biologynoteshelp.com/cellcycle-checkpoint/>, 22.05.2017

Bocci A, Sebastiani B, Trotta F, Federici E and Cenci G (2015) “In vitro inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* imc501”, Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(10): 1680-1686

Bolognani F, Rumney CJ and Rowland IR (1997) “Influence of Carcinogen Binding by Lactic Acid-Producing Bacteria on Tissue Distribution and in Vivo Mutagenicity of Dietary Carcinogens”, Food and Chemical Toxicology, 35(6): 535-45.

Caldini G, Trotta F, Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G and Cenci G (2005) “Screening of Potential *Lactobacilli* Antigenotoxicity by Microbial and Mammalian Cell-Based Tests”, International Journal of Food Microbiology, 102(1): 37-47.

Caldini G, Trotta F and Cenci G (2002) “Inhibition of 4-Nitroquinoline-1-Oxide Genotoxicity by *Bacillus* Strains”, Research in Microbiology 153(3): 165-71.

Cebeci A and Gürakan C (2003) “Properties of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains”, Food Microbiology, 20(5): 511-18.

Cenci G, Caldini G, Trotta F and Bosi P (2008) “In Vitro Inhibitory Activity of Probiotic Spore-Forming *Bacilli* against Genotoxins”, Letters in Applied Microbiology, 46(3): 331-37.

Cenci G, Caldini G, Trotta F and Bosi P (2005) “In vitro Inhibitory Activity of Probiotic Spore Forming *Bacilli* against Genotoxins”, Letters in Applied Microbiology, 45: 331-337.

Cenci G, Rossi J, Trotta F and Caldini G (2002) “Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products Inhibit Genotoxic Effect of 4-Nitroquinoline-1-Oxide in SOS-Chromotest”, Systematic and Applied Microbiology, 25(4): 483-90.

Chang I and Kim J-d (2007), “Inhibition of Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus casei*”, Mycobiology, 35(2): 76-81.

- Chen R, Lee W, Liang Y, Lin J, Wang Y, Lin C and Lines C (2000) “Ketoconazole Induces G0 / G1 Arrest in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141: 132- 41.
- Chen Z-Y, Hsieh Y-M, Huang C-C and Tsai C-C (2017) “Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29”, *Molecules*, 22(1): 107.
- Chiu Y-H, Hsieh Y-J, Liao K-W, Peng K-C (2010) “Preferential Promotion of Apoptosis of Monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* Soluble Factors”, *Clinical Nutrition*, 29(1): 131-40.
- Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S and Kim SH (2006) “Effects of *Lactobacillus* Strains on Cancer Cell Proliferation and Oxidative Stress in Vitro”, *Letters in Applied Microbiology*, 42(5): 452-58.
- Ciegler A, Lillehoj EB, Peterson RE and Hall HH (1966) “Microbial Detoxification of Aflatoxin”, *Applied Microbiology*, 14(6): 934-39.
- Coconnier M-H, Lievin V, Bernet-Camard M-F, Hudault S and Servin AL (1997) “Antibacterial Effect of the Adhering Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5): 1046-52.
- Codex Alimentarius Commission (2001), Comments Submitted on the Draft Maximum Level for AFM₁ in Milk, Codex Committee on Food Additives and Contaminants Thirty third Session, The Hague, The Netherlands, 12-16 March 2001.
- Collins AR and Brunborg G http://cometassay.com/index_files/Page345.htm, 11.08.2017
- Collins AR (2004) “The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications and Limitations”, *Molecular Biotechnology*, 26(3): 249-61.
- Collins AR, Ai-guo M and Duthie SJ (1995) “The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells”, *Mutation Research-DNA Repair*, 336(1): 69-77.
- Contreras-Govea FE, Muck RE, Broderick GA and Weimer PJ (2013) “*Lactobacillus plantarum* Effects on Silage Fermentation and in Vitro Microbial Yield”, *Animal Feed Science and Technology*, 179(1-4): 61-68.
- Conway PL, Gorbach SL and Goldin BR (1987) “Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells”, *Journal of Dairy Science*, 70(1): 1-12.
- Corcuera LA, Arbillaga L, Vettorazzi A, Azqueta A and López de Cerain A (2011) “Ochratoxin A Reduces Aflatoxin B₁ Induced DNA Damage Detected by the Comet Assay in Hep G2 Cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 49(11): 2883-89.

- Corsetti A, Caldini G, Mastrangelo M, Trotta F, Valmorri S and Cenci G (2008) "Raw Milk Traditional Italian Ewe Cheeses as a Source of *Lactobacillus casei* Strains with Acid-Bile Resistance and Antigenotoxic Properties", International Journal of Food Microbiology, 125(3): 330-35.
- Coşkun G ve Özgür H (2011) "Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması I", Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20: 145-58.
- Çetinkaya Ö ve Pınarbaşı H (2006) Ders Notu: İlaç metabolize eden enzim sistemleri polimorfizmleri ve kanser ilişkisi. Biyokimya ABD, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.
- Çakmakçı ML, Karahan G ve Çakır İ (2011) Mikrobiyoloji, s 197, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 36, Ankara.
- Daeschel MA, Andersson RE and Fleming HP (1987) "Microbial Ecology of Plant Materials", FEMS Microbiology Reviews, 46: 357-67.
- De Kok TCM and Van Maanen JMS (2000) "Evaluation of Fecal Mutagenicity and Colorectal Cancer Risk", Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 463(1): 53-101.
- DeMuro R (2004) "HPLC Detection of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons LC-022)", Shimadzu Application Note, <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/lc/lc022.pdf>, 14.04.2017.
- Diggs D, Huderson AC, Harris KL, Myers JN, Banks LD, Rekhadevi PV, Niaz MS and Ramesh A (2011) "Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers- a perspective", J Environmental Science Health C Environ, 29(4), 324-357.
- dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL and Peluzio M, do CG (2017) "Review of the Mechanisms of Probiotic Actions in the Prevention of Colorectal Cancer", Nutrition Research, 37: 1-19.
- Ducrotté P, Sawant P and Jayanthi V (2012) "Clinical Trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) Improves Symptoms of Irritable Bowel Syndrome", World Journal of Gastroenterology, 18(30): 4012-18.
- Elmore S (2007) "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death", Toxicol Pathol., 35(4): 495-516.
- El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S and Ahokas J (1998) "Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Common Food Carcinogen Aflatoxin B₁", Food and Chemical Toxicology, 36: 321-26.
- El-Nezami HS, Polychronaki NN, Ma J, Zhu H, Ling W, Salminen EK, Juvonen RO, Salminen SJ, Poussa T and Mykkänen HM (2006) "Probiotic Supplementation Reduces a Biomarker for Increased Risk of Liver Cancer in Young Men from Southern China", The American Journal of Clinical Nutrition, 83(5): 1199-1203.

- Er S, Koparal AT and Kıvanç M (2015) "Cytotoxic Effects of Various Lactic Acid Bacteria on Caco-2 Cells", Turkish Journal of Biology, 39: 23-30.
- Escamilla J, Lane MA, and Maitin V (2012) "Cell-Free Supernatants from Probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion In Vitro", Nutrition and Cancer, 64(6): 871-78.
- FAO/WHO (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1,2002.
- Fazeli MR, Hajimohammadali M, Moshkani A and Samadi N (2009) "Aflatoxin B₁ Binding Capacity of Autochthonous Strains of Lactic Acid Bacteria", Journal of Food Protection, 72(1), 189-192.
- Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M and Knasmüller S (2008) "Detoxification of Patulin and Ochratoxin A, Two Abundant Mycotoxins, by Lactic Acid Bacteria", Food and Chemical Toxicology, 46(4): 1398-1407.
- Friman V, Adlerberth I, Connell H, Svanborg C, Hanson LÅ and Wold AE (1996) "Decreased Expression of Mannose-Specific Adhesins by *Escherichia coli* in the Colonic Microflora of Immunoglobulin A-Deficient Individuals", Infection and Immunity, 64(7): 2794-98.
- Gagnon M, Berner AZ, Chervet N, Chassard C and Lacroix C (2013) "Comparison of the Caco-2, HT-29 and the Mucus-Secreting HT29-MTX Intestinal Cell Models to Investigate *Salmonella* Adhesion and Invasion", Journal of Microbiological Methods, 94(3): 274-79.
- Gamallat Y, Meyiah A, Kuugbee ED., Hago AM, Chiwala G, Awadasseid A, Bamba D, Zhang X, Shang X, Luo F and Xina Y (2016) "*Lactobacillus rhamnosus* Induced Epithelial Cell Apoptosis, Ameliorates Inflammation and Prevents Colon Cancer Development in an Animal Model", Biomedicine and Pharmacotherapy, 83: 536-41.
- Gao YN, Wang JQ, Li S L, Zhang YD and Zheng N (2016) "Aflatoxin M₁ Cytotoxicity against Human Intestinal Caco-2 Cells Is Enhanced in the Presence of Other Mycotoxins", Food and Chemical Toxicology, 96: 79-89.
- Garcia O, Romero I, González JE and Mandina T (2011) "Visual Estimation of the Percentage of DNA in the Tail in the Comet Assay: Evaluation of Different Approaches in an Intercomparison Exercise", Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 720(1-2): 14-21.
- Ghoneum M and Felo N (2015) "Selective Induction of Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells by *Lactobacillus kefir* (PFT), a Novel Kefir Product." Oncology Reports 34(4): 1659-66.

- Ghonaïmy G A and Yonis A A M (2007), "Inhibition of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* fungal growth and its aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) production by *Lactobacillus Acidophilus*." J. Egypt. Soc. Toxicol 37: 53-60
- Girgin G, Başaran N ve Şahin G (2001) "*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*", Türk Hij Den Biyol Derg, 58(3): 97–118.
- Görbe A (2011) "Basics of Cell Culture" Ders Notu, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged.
- Gratz S, Wu QK, El-Nezami H, Juvonen RO, Mykkänen H and Turner P C (2007) "*Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Reduces Aflatoxin B₁ Transport, Metabolism, and Toxicity in Caco-2 Cells", Applied and Environmental Microbiology, 73(12): 3958-64.
- Guan S, Ji C, Zhou T, Li J, Ma Q and Niu T (2008) "Aflatoxin B₁ Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium", International Journal of Molecular Sciences, 9(8): 1489-1503.
- Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H and Langouët S (1998) "Activation and Detoxication of Aflatoxin B₁", Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 402(1-2):121-28.
- Hair M and Sharpe J (2014) "The Facts About The Human Microbiome", The Center for Ecogenetics and Environmental Health, University of Washington, Washington.
- Harris KL, Myers JN and Ramesh A (2013) "Benzo(a)pyrene Modulates Fluoranthene-Induced Cellular Responses in HT-29 Colon Cells in a Dual Exposure System", Environmental Toxicology and Pharmacology, 36(2): 1-17.
- Hartmann A and Speit G (1997) "The Contribution of Cytotoxicity to DNA Effects in the Single Cell Gel Test (Comet Assay)", Toxicology Letters, 90(2-3):183-88.
- Haskard C, Binnion C and Ahokas J (2000) "Factors Affecting the Sequestration of Aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG", Chemico Biological Interactions, 128(1): 39-49.
- Haskard CA, El-nezami HS, Kankaanpää E, Salminen S and Ahokas JT (2001) "Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria", Applied and Environmental Microbiology, 67(7): 3086-3091.
- Hausmann M (2010) "How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation", International Journal of Inflammation, 2010: 9 pages.

- Hemarajata P and Versalovic J (2013) "Effects of Probiotics on Gut Microbiota: Mechanisms of Intestinal Immunomodulation and Neuromodulation", *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1): 39-51.
- Hernandez-Mendoza A, Garcia HS and Steele JL (2009) "Screening of *Lactobacillus casei* Strains for Their Ability to Bind Aflatoxin B₁", *Food and Chemical Toxicology*, 47(6): 1064-68.
- Hingorani R, Deng, J, Elia J, McIntyre C and Mittar D (2011) "Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System" BD Biosciences, August, 1-12.
- Hirayama K and Rafter J (2000) "The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention", *Microbes and Infection*, 2(6): 681-86.
- Hsieh ML and Chou CC (2006) "Mutagenicity and Antimutagenic Effect of Soymilk Fermented with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria", *International Journal of Food Microbiology*, 111(1): 43-47.
- Huang L, Duan C, Zhao Y, Gao L, Niu C, Xu J and Li S (2017) "Reduction of Aflatoxin B₁ Toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: A Potential Probiotic Strain Isolated from Chinese Traditional Fermented Food Tofu", *PloS one*, 12(1): e0170109.
- IARC 2002 (International Agency for Research on Cancer World Health Organization) "IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans", 82:168-171.
- Invitrogen (2010) *Cell Culture Basics Handbook*. ThermoFisher Scientific Inc. <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>, 01.08.2017
- Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (2017) "eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC" Catalog Number : 88-8005.
- Istiqomah L, Damayanti E, Julendra H, Suryani AE, Sakti AA and Anggraeni AS (2017) "Effect of Methionine and Lactic Acid Bacteria as Aflatoxin Binder on Broiler Performance", In *Proceeding of International Biology Conference* 1-7 Jakarta.
- Jakoby WB and Ziegler DM (1990) "The Enzymes of detoxification" *The Journal of Biological Chemistry*, 265(34): 20715–20718.
- Jan G, Belzacq A-S, Haouzi D, Rouault A, Me D, Metivier Â, Kroemer G, Brenner, C (2002) "Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria", *Cell Death and Differentiation*, 9: 179-188.
- Jebali R, Abbes S, Salah-Abbes JB, Younes BR, Haous Z and Oueslati R (2015) "Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to Mitigate Aflatoxins (B₁ and

- M₁) Immunotoxicities in Mice”, Journal of Immunotoxicology, 12(3):290-99.
- Johansson ML, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Björck I, Ahrne S, Molin G (1998) “Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v) and Effect on the Short-Chain Fatty Acid Content of Faeces after Ingestion of a Rose-Hip Drink with Fermented Oats”, International Journal of Food, 42: 29-38.
- Kabak B (2002) “*Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*’un *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin M₁ Üzerine Etkisinin In Vitro Şartlarda Araştırılması”, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Kabak B ve Var I (2004) “Mikotoksin Biyosentezinin Engellenmesinde ve Mikotoksinlerin Detoksifikasyonunda Biyolojik Ajanların Kullanımı”, Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi, 5: 39-45.
- Kachouri F, Ksontini H and Hamdi M (2014) “Removal of Aflatoxin B₁ and Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth by the Use of *Lactobacillus plantarum* on Olives”, J FoodProt, 77(10): 1760-7.
- Karakaş D, Pekey B, Telli-Karakoç F, Tolun L, Morkoç E, Tüfekçi H, Yakupoğlu G ve Yakan H (2004) “İzmit Körfezine Giren Kanserojenik Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH): Kaynak ve Seviye Tespiti”, TÜBİTAK YDABAG.
- Kaya S (a) (2014) “Mikotoksinler” 393-433 Veteriner Toksikoloji. 3. Baskı. Medisan. Ankara
- Kaya S (b) (2014) “Su ve Toprak Kirleticileri: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar”, 589-590, 3. Baskı, Medisan. Ankara.
- Khoo KK, Verma CS and Lane DP (2014) “Box 1: Cell fate outcomes after p53 induction: apoptosis, cell cycle arrest or senescence?”, Nature Reviews Drug Discovery, 13: 217-236.
- Kim Y, Lee D, Kim D, Cho J, Yang J, Chung M, Kim K and Ha N (2008) “Inhibition of Proliferation in Colon Cancer Cell Lines and Harmful Enzyme Activity of Colon Bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212”, Archives of Pharmacal Research, 31(4): 468–73.
- Khorshidian N, Asli MY, Hossein H and Shadnoush M (2016) “Potential Anticarcinogenic Effects of Lactic Acid Bacteria and Probiotics in Detoxification of ProcessInduced Food Toxicants”, Iran J Cancer Prev, 9(5): e7920.
- König H, Uden G and Frölich J (2009) “Biology of Microorganisms on Grapes in Must and in Wine”, Hardcover, Germany. ISBN: 978-3-540-85462-3.

- Kramer PJ (1998) "Genetic Toxicology", J. Pharm. Pharmacol, 50: 395-405.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P and Georgakilas AG (2011) "Role of Oxidative Stress and DNA Damage in Human Carcinogenesis", Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 711(1-2): 193-201.
- Kumar M, Babaei P, Ji B and Nielsen J (2016) "Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective", Nutrition and Healthy Aging, 4: 3-16.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP and Jha AN (2009) "Comet Assay Measurements: A Perspective", Cell Biology and Toxicology, 25(1): 53-64.
- Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Ichwan SJA, Soundharrajan I and Govindan N (2014) "Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review", Acta Pharmaceutica Sinica B, 4(3); 173-181.
- Kurhan S and Cakir I (2016) "DNA-Bioprotective Effects of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin B₁" Current Research in Nutrition and Food Science, 4(SI.2): 87-91.
- Lederberg J and McCray A (2001) "'Ome Sweet' Omics-A Genealogical Treasury of Words", The Scientist, 8.
- Lee DK, Jang S, Kim MJ, Kim JH, Chung MJ, Kim KJ and Ha NJ (2008) "Anti Proliferative Effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 Extract on Human Colon Cancer Cell Lines", BMC cancer, 8: 1-8.
- Lee D, Kim IY, Saha S, and Choi KS (2016) "Paraptosis in the Anti-Cancer Arsenal of Natural Products", Pharmacology and Therapeutics, 162: 120-33
- Lin J-C, Ho Y-S, Lee J-J, Liu C-L, Yang T-L and Wu C-H (2007) "Induction of apoptosis and cell-cycle arrest in human colon cancer cells by meclizine", Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 45(6), 935-44.
- Lin Y-Y, Hsieh P-S, Cheng Y-J, Cheng S-M, Chen C-N, Huang C-Y, Kuo CH, Kao C-L, Shyu W-C, Lee S-D (2017) "Anti-Apoptotic and Pro-Survival Effects of Food Restriction on High-Fat Diet-Induced Obese Hearts" Cardiovascular Toxicology, 17(2): 163-74.
- Liu Y and Bodmer WF (2006) "Analysis of P53 Mutations and Their Expression in 56 Colorectal Cancer Cell Lines", Pnas, 103(4): 976-81.
- Longoria-García S, Belmares-Cerda RE, Flores-Verástegui MIM, Contreras Esquivel JC, Montañez-Sáenz JC and Cruz-Hernández MA (2016) "Prebiotics, Probiotics, Synbiotics and Functional Foods in Control and Treatment of Type II Diabetes Mellitus and Colorectal Cancer", Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health Chapter, 17. Edited by

Venketeshwer Rao and Leticia G. Rao, ISBN 978-953-51-2476-4, Print ISBN 978-953-51-2475-7, 392 pages, Publisher: InTech, Chapters published July 13, 2016 under CC BY 3.0 license

Lonza Technical Reference Guide, 2016. Cell counting and determination of viability via Hemocytometer. Cologne, Germany.

http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Cell_Counting_and_Determination_of_Viability_Via_Hemocytometer.pdf, 10.03.2016.

Lorenzo Y, Costa S, Collins AR and Azqueta A (2013) “The Comet Assay, DNA Damage, DNA Repair and Cytotoxicity: Hedgehogs Are Not Always Dead”, *Mutagenesis*, 28(4): 427-32.

Lu ZG, Zhang CM and Zhai ZH (2004) “LDFF, the Large Molecular Weight DNA Fragmentation Factor, Is Responsible for the Large Molecular Weight DNA Degradation during Apoptosis in *Xenopus* Egg Extracts”, *Cell Research*, 14(2): 134-40.

Luca PD, Arnaboldi F, Maggioni M, Donetti E, Fiorilli A and Ferraretto A (2014) “Morphology Related Functionality in Caco2/HT-29 Co-Culture Cells: A Versatile Model of Human Intestinal Epithelium”, *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 119(1): 64.

Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L and Hollingsworth MA (1999) “Probiotics Inhibit Enteropathogenic *E. coli* Adherence in vitro by Inducing Intestinal Mucin Gene Expression”, *American Journal of Physiology*, 276(4): 941-950.

Martinez-Maqueda D, Miralles B and Recio I (2015) *The Impact of Food Bio Actives on Gut Health- In vitro and ex vivo models*. Springer open book, ISBN 978-3-319-16104-4 (eBook).

Memorial Sloan Kettering Cancer Center (2017) HT-29: Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (ATCC HTB-38) <https://www.mskcc.org/researchadvantage/support/technology/tangible-material/human-colorectal-adenocarcinoma-cell-line-ht-29>, 11.05.2017.

Molin G (2001) “Probiotics in Foods Not Containing Milk or Milk Constituents, with Special Reference to *Lactobacillus plantarum* 299v”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 380-85.

Monson M, Coulombe R and Reed K (2015) “Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B₁ in Poultry”, *Agriculture*, 5(3): 742-77.

Mrozik A, Piotrowska-Seget Z and Labuzek S (2003) “Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (1): 15-25.

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (1998) “The p53 tumor suppressor protein” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/>,
- NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M (2009) “The NIH Human Microbiome Project Genome Research”, *Genome Res*, 19:2317-2323.
- Nollevaux G, Deville C, El Moulaj B, Zorzi W, Deloyer P, Schneider YJ, Peulen O and Dandrifosse G (2006) “Development of a Serum-Free Co-Culture of Human Intestinal Epithelium Cell-Lines (Caco-2/HT29-5M21)”, *BMC Cell Biology*, 7(1): 20.
- Olive PL and Banáth JP (2006) “The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells”, *Nature Protocols*, 1(1): 23-29.
- Onilude AA, Fagade OE, Bello MM and Fadahunsi IF (2005) “Inhibition of Aflatoxin-Producing Aspergilli by Lactic Acid Bacteria Isolates from Indigenously Fermented Cereal Gruels”, *Journal of Biotechnology*, 4(December): 1404-8.
- Orlando A, Linsalata M and Russo F (2016) “Antiproliferative Effects on Colon Adenocarcinoma Cells Induced by Co-Administration of Vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG”, *International Journal of Oncology*, 48(6): 2629-38.
- Özkaya Ş and A Temiz (2003) “Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri Giriş Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı”, *Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1): 1-21.
- Parkinson A and Ogilvie BW (2001) “Biotransformation of Xenobiotics”, *Casarett Doull’s Essentials of Toxicology*, 2. Edition, Chapter 6, p.133.
- Pei-Ren L, Roch-Chui Y, Cheng-Chun C and Ya-Hui T (2002) “Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a]pyrene”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(2), 148-153.
- Peltonen K D, El-nezami H S, Salminen S J and Ahokas J T (2000) “Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1942-1945.
- Peltonen K, el-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, and Salminen S (2001) “Aflatoxin B₁ Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria”, *Journal of Dairy Science*, 84(10): 2152-56.
- Peng RH, Xiong, AS, Xue Y, Fu XY, Gao F, Zhao W, Tian Y-S and Yao QH (2008)

- “Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons”, FEMS Microbiology Reviews, 32(6): 927-955.
- Pfeiffer P, Goedecke W and Obe G (2000) “Mechanisms of DNA Double-Strand Break Repair and Their Potential to Induce Chromosomal Aberrations”, Mutagenesis, 15(4): 289-302.
- Pithva SP, Ambalam PS, Ramoliya JM, Dave JM and Vyas BRM (2015) “Antigenotoxic and Antimutagenic Activities of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Vc against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine”, Nutrition and Cancer, 67(7): 1142-1150.
- Plaza-Bolaños P, Frenich AG and Martínez Vidal JL (2010) “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food and Beverages. Analytical Methods and Trends”, Journal of Chromatography A, 1217(41): 6303-26.
- Pool-Zobel BL, Bertram B, Knoll M, Lambertz R, Neudecker C, Schillinger U, Schmezer P, Holzapfel WH (1993) “Antigenotoxic Properties of Lactic Acid Bacteria in Vivo in the Gastrointestinal Tract of Rats”, Nutrition and Cancer, 20(3): 271-81.
- Pool-Zobel BL and Leucht U (1997) “Induction of DNA damage by risk factors of colon cancer in human colon cells derived from biopsies”, Mutation Research, 375(2): 105-115.
- Pucci B, Kasten M and Giardano A (2000) “Cell Cycle and Apoptosis”, Neoplasia, 2(4): 291-99.
- Radhakrishnan D, Chacko S, Bhaskara P, Sandya S and Govindan N (2016) “Polyphenolic Extract from Coconut Kernel Modulates Apoptotic Genes, Reactive Oxygen Species Production, and Prevents Proliferation of Human Colon Cancer Cell Line”, International Journal of Clinical and Experimental Physiology, 3(3): 113.
- Raipulis J, Toma MM and Semjonovs P (2005) “The Effect of Probiotics on the Genotoxicity of Furazolidone”, International Journal of Food Microbiology, 102(3): 343-47.
- Raman M, Ambalam P, Kondepudi KK, Pithva S, Kothari C, Patel A T, Purama RK, Dave JM and Vyas BR (2013) “Potential of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Management of Colorectal Cancer”, Gut microbes, 4(3): 181-92.
- Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillén MD, Schneider K and Weyand EH (2004) “Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, International Journal of Toxicology, 23: 301-333.
- Ranaldi G, Mancini E, Ferruzza S, Sambuy Y and Perozzi, G (2007) “Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells”, Toxicology in Vitro, 21(2), 204-210.

- Redzwan MS, Abd Mutalib MS, Wang J-S, Ahmad Z, Kang M-S, Abdul Rahman N 'Aqilah, Nasrabadi NE and Jamaluddin R (2016) "Effect of Supplementation of Fermented Milk Drink Containing Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on the Concentrations of Aflatoxin Biomarkers among Employees of Universiti Putra Malaysia: A Randomised, Double Blind, Cross-Over, Placebo-Controlled Study", *British Journal of Nutrition*, 115(1): 39-54.
- Reid G and Reid G (1999) "The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*", *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 3763-66.
- Relman D and Falkow S (2001) "The Meaning and Impact of the Human Genome Sequence for Microbiology", *Trends in Microbiology*, 9(5): 206-8.
- Riaz Rajoka MS, Shi J, Zhu J, Shao D, Huang Q, Yang H and Jin M (2016) "Capacity of Lactic Acid Bacteria in Immunity Enhancement and Cancer Prevention", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 35-45.
- Ribeiro DHB, Ferreira FL, da Silva VN, Aquino S and Corrêa B (2010) "Effects of Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ on the Viability and Induction of Apoptosis in Rat Primary Hepatocytes", *International Journal of Molecular Sciences* 11(4): 1944-55.
- Rojas E, Lopez MC and Valverde M (1999) "Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications" *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 722(1-2), 225-254.
- Roos WP, Thomas AD, and Kaina B (2016) "DNA Damage and the Balance between Survival and Death in Cancer Biology", *Nat Rev Cancer*, 16(1): 20-33.
- Saber A, Alipour B, Faghfoori Z and Yari Khosroushahi A (2017) "Secretion Metabolites of Dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 Isolated as Probiotic, Induces Apoptosis in Different Human Cancer Cell Lines and Exhibit Anti Pathogenic Effects", *Journal of Functional Foods*, 34: 408-421.
- Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H and Mirlohi M (2014) "Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17: 815-819.
- Sangare L, Zhao Y, Minnie Y, Folly E, Chang J, Li J, Selveraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y and Liu Y (2014) "Aflatoxin B₁ Degradation by a *Pseudomonas* Strain", *Toxins*, 6: 3028-40.
- Science Committee on Food (2002) "Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1" Annex: A1-194.

- Serrano-Niño JC, Cavazos-Garduno A, Hernandez-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi MG, Martin-Gonzalez MF and Garcia HS (2013) “Assessment of Probiotic Strains Ability to Reduce the Bioaccessibility of Aflatoxin M₁ in Artificially Contaminated Milk Using an in Vitro Digestive Model”, *Food Control*, 31(1): 202-7.
- Sezer Ç, Güven A, Oral NB and Vatansever L (2013) “Detoxification of Aflatoxin B₁ by Bacteriocins and Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(5), 594–601
- Sigma-Aldrich GMBH, 2016. Primary Cell Culture.
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>, 01.08.2017
- Singh NP (2016) “The Comet Assay: Reflections on Its Development, Evolution and Applications”, *Reviews in Mutation Research*, 767:23–30.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) “A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells”, *Experimental Cell Research*, 175(1):184–91.
- Slonczewski J (2013) “*Lactobacillus plantarum* and Its Biological Implications”,
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_plantarum_and_its_biological_implications, 03.07.2017
- So SSY, Wan MLY and El-Nezami H (2017) “Probiotics-Mediated Suppression of Cancer”, *Current Opinion in Oncology*, 29(1): 62–72.
- Solhaug A, Refsnes M, Låg M, Schwarze PE, Husøy T and Holme JA (2004) “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induce Both Apoptotic and Anti Apoptotic Signals in Hepa1c1c7 Cells”, *Carcinogenesis*, 25(5), 809–819.
- Song S, Oh S and Lim KT (2015) “The Proteins (12 and 15 kDa) Isolated from Heat-Killed *Lactobacillus plantarum* L67 Induces Apoptosis in HT-29 Cells”, *Cell Biochemistry and Function*, 33(2): 89–96.
- Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A and Hartmann A (1996) “Detection of DNA Effects in Human Cells with the Comet Assay and Their Relevance for Mutagenesis”, *Toxicology Letters*, 88(1–3):91–98.
- Şekeroğlu ZA and Şekeroğlu V (2011) “Genetik Toksisite Testleri”, *Türk Bilim Araştırma Vakfı Dergisi*, 4: 221–29.
- Tassou C (2014) PROBIOLIVES (Table olive fermentation with selected strains of probiotic lactic acid bacteria. Towards a new functional food.) PROBIOLIVES Report Summary, European Commission Project ID: 243471

- Tavan E, Cayuela C, Antoine J-M and Cassand P (2002) “Antimutagenic Activities of Various Lactic Acid Bacteria against Food Mutagens: Heterocyclic Amines”, The Journal of Dairy Research, 69 (2): 335–41.
- Tekin N (2017) “Programlı Hücre Ölümü (Apoptosis), Hücre Ölümü (Nekroz) ve Evrim”, <http://www.evrimagaci.org/makale/268>, 21.05.2017.
- TGK 2011. “T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği” (28157, 3. Mükerrer), 29.12.2011 EK1. 1-15.
- Thermo Fisher Scientific, Introduction to Cell Culture <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>, 09.06.2017.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Sasaki YF (2000) “Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing”, Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(3): 206–21.
- Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou EE, Saxami G, Ypsilantis P, Lampri ES, Simopoulos C, Kotsianidis I, Galanis A, Kourkoutas Y, Dimitrellou D and Chlichlia K (2016) “*Lactobacillus casei* Exerts Anti-proliferative Effects Accompanied by Apoptotic Cell Death and Up-regulation of TRAIL in Colon Carcinoma Cells”, PLoS ONE, 11(2), 1–20.
- Tomatır AG (2003) “Apoptoz : Programlı Hücre Ölümü.” T Klin Tıp Bilimleri 23: 499–508.
- Topcu A, Bulat T, Wishah R and Boyacı I H (2010) “Detoxification of Aflatoxin B₁ and Patulin by *Enterococcus faecium* Strains.” International Journal of Food Microbiology 139(3):202–5.
- Trainer J (2013) “What is the difference between mutagenicity and genotoxicity?”, https://www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_mutagenicity_and_genotoxicity, 09.06.2017.
- Trotta F, Caldini G, Dominici L, Federici E, Tofalo R, Schirone M, Corsetti A, Suzzi G, Cenci G (2012) “Food Borne Yeasts as DNA-Bioprotective Agents against Model Genotoxins”, International Journal of Food Microbiology, 153(3): 275–80.
- Tsai T-L, Li A-C, Chen Y-C, Liao Y-S and Lind T-Y (2015) “Antimicrobial Peptide m2163 or m2386 Identified from *Lactobacillus casei* ATCC 334 Can Trigger Apoptosis in the Human Colorectal Cancer Cell Line SW480”, Tumor Biology, 36(5): 3775–89.
- Tunail N (2000) Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 03. Bölüm, 13. kısım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.

- Tunail, N. (2009) Mikrobiyoloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978605-603-62-0-0.
- Ukiwe LN, Egereonu UU, Njoku PC, Nwoko CIA and Allinor JI (2013) “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review”, International Journal of Chemistry, 5(4): 43.
- US EPA 3510C (1996) Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3510c.pdf>, 04.04.2017.
- van Breemen RB, and Li Y (2005) “Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption”, Expert Opinioon Drug Metabolism&Toxicology, 1 (2):175-85.
- Venema, K (2015) “The Impact of Food Bioactives on Health. The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models”, 293-304.
- Verdenelli M C, Ricciutelli M, Gigli F, Cenci G, Trotta F, Caldini G, Cresci A, Orpianesi C (2010) “Short Communication Investigation of the Antigenotoxic Properties of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Imc 501® by Gas Chromatography-Mass Spectrometry” Ital. J. Food Sci, 22(4), 473-478.
- Vinderola G and Ritieni A (2014) “Role of Probiotics Against Mycotoxins and Their Deleterious Effects”, Journal of Food Research, 4(1): 10.
- Vogelstein BB, Howard Hughes MD and Comprehensive SK (2014) “p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers”, NatureEducation, 3(6): 1-7.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman W (2011) “An Extensive Revision of One of the Most Authoritative Works in Bacterial Taxonomy” Bergeys’s Manual of Systematic Bacteriology 3: 507.
- de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M and de Vos WM (2006) “*Lactobacillus plantarum*-Survival, Functional and Potential Probiotic Properties in the Human Intestinal Tract”, International Dairy Journal, 16(9): 1018-28.
- Walia S, Keshani SS, and Kanwar SS (2014) “Exhibition of DNA Bioprotective Activity by Microflora of Traditional Fermented Foods of North-Western Himalayas”, Food Research International, 55: 176–80.
- Wang SM, Zhang LW, Fan RB, Han X, Yi HX, Zhang LL, Xue CH, Li HB, Zhang YH and Shigwedha N (2014) “Induction of HT-29 Cells Apoptosis by Lactobacilli Isolated from Fermented Products”, Research in Microbiology, 165(3): 202–14.
- Wang JS and Groopman JD (1999) “DNA Damage by Mycotoxins”, Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 424(1-2): 167–81.

- WHO (2000) "Regional Office for Europe, Air Quality Guidelines", Second Edition, Chapter 5.9. PAHs, s.4. Copenhagen, Denmark.
- Whittemore H (2013) "*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) and Its Probiotic Use". The Keck Science Department of the Claremont Colleges.
- Wikipedia (2017) "p53", <https://tr.wikipedia.org/wiki/P53>, 30.05.2017.
- Wikipedia, (2015) "Genotoxicity", <http://en.wikipedia.org/wiki/Genotoxicity>, 18.05.2015
- Wollowski I, Ji ST, Bakalinsky AT, Neudecker C and Pool-Zobel BL (1998) "Bacteria Used for the Production of Yogurt Inactivate Carcinogens and Prevent DNA Damage in the Colon of Rats", The Journal of Nutrition 129(1): 77–82.
- Wong RSY (2011) "Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment", Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30(1): 87.
- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V and Kuca K (2009) "Biological Degradation of Aflatoxins," Drug Metabolism Reviews, 41 (1): 1-7.
- Xia X, Zhang Y, Li M, Garba B, Zhang Q, Wang Y, Zhang H, Li P (2017) "Isolation and Characterization of a *Bacillus subtilis* Strain with Aflatoxin B₁ Biodegradation Capability", Food Control, 75: 92-98.
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK and Polk DB (2007) "Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth", Gastroenterology, 132(2): 562-75.
- Yu Z, Wang F, Liang N, Wang C, Peng X, Fang J, Cui H, Mughal MJ and Lai W (2015) "Effect of Selenium Supplementation on Apoptosis and Cell Cycle Blockage of Renal Cells in Broilers Fed a Diet Containing Aflatoxin B₁", Biol Trace Elem Res, 168: 242-251.
- Zengin N, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yilmaz S and Aksoy H (2011) "The Evaluation of the Genotoxicity of Two Food Preservatives: Sodium Benzoate and Potassium Benzoate", Food and Chemical Toxicology, 49(4):763-69.
- Zhao H, Fang Z, Yeqiong Q, Piotr D, Fengling B, Piotr W and Bolin Z (2013) "Screening of *Lactobacillus* Strains for Their Ability to Bind Benzo(a)pyrene and the Mechanism of the Process", Food and Chemical Toxicology, 59: 67-71.
- Zhu Y, Luo TM, Jobin C and Young HA (2011) "Gut Microbiota and Probiotics in Colon Tumorigenesis", Cancer Letters, 309 (2): 119-27.
- Zinedine A, Faïd M and Benlemlih M (2005) "In Vitro Reduction of Aflatoxin B₁ by Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Moroccan Sourdough Bread", International Journal of Agriculture & Biology, 7(1): 67-70.



EKLER

EK-A Comet testi çözeltilerinin hazırlanışı

- **1x PBS**

1 L 1xPBS hazırlamak için;

100 mL PBS(10x) + 900 mL deiyonize su

Hazırlanan tampon oda sıcaklığında saklanır.

- **Lizis Çözeltisi**

Lizis çözeltisi 2,5 M NaCl, 100mM EDTA (pH 10), 10 mM Tris Base, %1 sodyum laurilsarkosinat ve %1 Triton-X 100 içermektedir.

10 lam (20 örnek) için gerekli miktar 40 mL'dir. Kit içerisinde hazır bulunan çözelti analize başlanmadan 20 dakika önce +4⁰C'de soğumaya bırakılır. Analiz süresince de soğuk kalması sağlanmalıdır.

- **Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMAgaroz)**

Comet LMAgaroz 90-100 ⁰C'deki su banyosunda tamamen eriyene kadar bekletilir. Eridikten sonra 37 ⁰C'deki su banyosuna aktarılır. En az 20 dakika soğuması beklenir.

- **Alkali Çözeltinin Hazırlanışı**

50 mL'lik çözelti için;

- 0,6 g NaOH
- 250 µL 200 mM EDTA
- 49,75 mL deiyonize su

Bileşenler tamamen eriyene kadar karıştırılır. Çözeltinin hazırlanması sırasında ısı açığa çıkacağından kullanmadan önce mutlaka oda sıcaklığına gelmesi beklenmelidir.

- **Alkali (pH>13) Elektroforez Çözeltisinin Hazırlanışı**

500 mM EDTA çözeltisi hazırlanır.

Bunun için 18,612 g EDTA tartılır. 80 mL suda çözülür. NaOH ile pH 8'e ayarlanır. EDTA'nın çözünebilmesi için mutlaka pH 8 olmalıdır. Hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında birkaç ay boyunca muhafaza edilebilir.

1 L elektroforez çözeltisi için;

- 12 g NaOH pelet
- 2 mL 500 mM EDTA, pH 8

karıştırılarak çözelti 1 L hacme ultra saf su ile tamamlanır. Bu çözelti her kullanımdan önce mutlaka taze hazırlanmalıdır.

- **Boyanın Hazırlanışı**

CyGreen nükleik asit boyası kullanılmıştır. DMSO içerisinde 10000x olarak hazır gelen boyadan 1 µL alınıp, 999 µL deiyonize su ile karıştırıldıktan sonra kullanılır. Seyreltilmiş boya -20⁰C'de ışık almayan ortamda birkaç hafta saklanabilir.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şebnem KURHAN

Doğum Yeri ve Tarihi : 18.03.1988

Lisans Üniversite : Uludağ Üniversitesi

Y. Lisans Üniversite : Ankara Üniversitesi

Elektronik posta : kurhansebnem@gmail.com
sebnemkurhan@ibu.edu.tr

İletişim Adresi : AİBÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Ek
Bina 2. Kat Ofis No: 231 Gölköy/ BOLU

Yayın Listesi :

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Kurhan S and Cakir I (2016) “DNA-Bioprotective Effects of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin B₁”, Current Research in Nutrition and Food Science, 4(SI.2): 87–91.
2. Kurhan S and Cakir I (2017) “Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B₁ Bağlayıcı ve Antikanserojen Özellikleri”, GIDA / THE JOURNAL OF FOOD, 42(6):809-820.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Solak R, Turan S, Kurhan S, Erge HS (2017) “Tocopherol degradation of refined hazelnut oil during heating at different temperatures”. International Conference on Agriculture, Forest, Food, Sciences and Technologies, 15-17 May 2017, Cappadocia, TURKEY
2. Kurhan S, Cakir I (2017) “Lactic Acid Bacteria Mediated Apoptosis Induction: Natural Way of Colon Cancer Cells” 2nd International

Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy 2017, Kayseri, Türkiye (Özet Bildiri/Poster)

3. Kurhan S, Cakmakçı ML (2017) "The Novel Ingredient: Fulvic Acid Supplemented *Spirulina platensis* Culture for Functional Aspects". 6th International Congress on Food Technology, 18-19 March 2017, Metropolitan Expo, Athens (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 3485394)
4. Kurhan S, Cakır I (2017) "Anticarcinogenic Effects of Probiotic Lactic Acid Bacteria". 6th International Congress on Food Technology, 18-19 March 2017, Metropolitan Expo, Athens (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 3485391)
5. Kurhan S, Cakır İ (2017) "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Binding Characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442". 15th World Congress on Advances in Nutrition, Food Science and Technology September 11-12 2017 Edinburgh, Scotland (Özet Bildiri/Poster)
6. Kurhan S, Cakır I (2017) "AFB₁ removal by *Lactobacillus plantarum* in Artificially Contaminated Environment". 15th World Congress on Advances in Nutrition, Food Science and Technology September 11-12 2017 Edinburgh, Scotland (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
7. Bayramoglu Karsı M B, Berberler E, Kurhan S, Cakır I, Karakas D (2017) "Priority Pollutant PAHs Levels in Traditional Bolu Breads: Effects of Oven Types and Fuels". ICOCEE (International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICOCEE- Cappadocia-2017)
8. Kurhan S, Çakır I (2016) "DNA Bioprotective Effects of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin B₁". 1st International Multidisciplinary Conference on Nutraceuticals and Functional Foods (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 2843236)
9. Akdemir Evrendilek G, Kurhan S, Isci I, Bayramoglu M B, Uzuner S (2016) "Determination of the potential of alternative technologies on decomposition of sulphur dioxide and improvement of quality characteristics". 1st International Multidisciplinary Conference on Nutraceuticals and Functional Foods (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 2843240)
10. Çakır I, Sarıca E, Kurhan S (2013). Microbiological and Chemical Properties of Traditional Manda Kaymagı Manufactured in Bolu. The 2nd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus" (Özet/Sözlü Sunum) (Yayın No: 781211)

11. Ödüller :

1. Kurhan Şebnem, Çakır İbrahim (2017) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Binding Characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442. 15th World Congress on Advances in Nutrition, Food Science and Technology September 11-12 2017 Edinburgh, Scotland (Özet Bildiri/Poster)-En İyi Poster Ödülü