

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEFİRİN STRES DİRENCİNE VE ÖMÜR UZUNLUĞUNA ETKİSİNİN,
Caenorhabditis elegans'TA ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEFİRİN STRES DİRENCİNE VE ÖMÜR UZUNLUĞUNA ETKİSİNİN,
Caenorhabditis elegans'TA ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez ../../2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Gülgün GÜNDÜZ

Yrd. Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE

ÖZET

KEFİRİN STRES DİRENCİNE VE ÖMÜR UZUNLUĞUNA ETKİSİNİN, *Caenorhabditis elegans*'TA ARAŞTIRILMASI

Merve Güneş

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülgün Gündüz

Haziran 2015, 58 sayfa

Yaşlanma organizmanın zamanla fonksiyonlarını kaybettiği, ölümle sonuçlanan ve geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Günümüzde, tıpta görülen ilerlemeler ve yaşam kalitesindeki artışla birlikte ortalama yaşam süresi de uzamıştır. Biyolojik yaşlanma çalışmalarında en sık kullanılan model organizmalardan biri *Caenorhabditis elegans* 'tır. Ekonomik olması, bir ay kadar olan kısa yaşam süresi ile hızlı sonuç verebilmesi, kültürün devamlılığının kolay sağlanması, biyolojik ve tıbbi araştırmalarda yarar sağlamaktadır. Kefir, kökeni Kafkasya'ya dayanan kefir danesi (tanesi) kullanılarak üretilen fermente bir süt ürünüdür. Endüstriyel olarak üretilen "kültür kefir" ve geleneksel olarak üretilen "dane kefir" olmak üzere iki çeşidi vardır. Kefirin insanların sağlığı üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, kefirin yapısındaki laktik asit bakterilerinin insan veya hayvan vücudundaki tümör ve enfeksiyonlara karşı direnci artırdığı belirtilmektedir. Kefirin sağlık üzerine yararlarıyla ilgili yapılan *in vivo* çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu çalışmada, kefirin her iki çeşidi kullanılarak farklı sıcaklıklar altında *C. elegans*'ın ömür uzunluğuna etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda iki farklı deney grubu oluşturulmuştur. Bu deneylerde kontrol grupları *E. coli* ile beslenirken, test grupları kültür kefir ve dane kefir ile beslenmiştir. İlk olarak *C. elegans* için öldürücü olmayan ısı stresi (37°C) altında karşılaştırma yapılmıştır. Sonrasında ise bu karşılaştırma *C. elegans*'ın optimum büyüme sıcaklığı olan 20°C'de tekrar edilmiştir.

Araştırma sonucunda 37°C'de yapılan ısı stresinde kültür kefir ile beslenen *C. elegans*'ların ömürleri % 29 artarken, dane kefir ile beslenenlerinkinin % 22 arttığı gözlenmiştir. Diğer taraftan 20°C altında yapılan karşılaştırmada elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

ANAHTAR KELİMELE: *C. elegans*, kefir, probiyotik, yaşlanma.

JÜRİ: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Gülgün GÜNDÜZ (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF KEFIR ON *Caenorhabditis elegans*' LIFESPAN AND THERMOTOLERANCE

Merve Güneş

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Gülgün GÜNDÜZ

June 2015, 58 pages

Aging is an irreversible and fatal process which causes loss of function of organism. In modern times, development in medicine and increased quality of life give rise to increased lifespan. *Caenorhabditis elegans* is one of the model organism widely used in aging studies. The worm is economical to cultivate, and gives rapid result due to its about one month lifespan. Thus, it is useful in biological and medical research. Kefir is a fermented milk product which is made using kefir grains originated from Caucasia. There are two types of kefir, the culture kefir, which is produced industrially, and the other one is grain kefir, which is produced traditionally. Kefir's positive impact on human health is known. Some studies showed that lactic acid bacteria in the kefir enhanced resistance against tumors and infections in humans and animals bodies. In this study we aimed to determine effect of kefir on *C. elegans*'s lifespan under different temperature by using two types of kefir. Within this scope two different experimental groups were performed. In these experiments control groups were fed with *E. coli*, and the others were fed culture kefir and grain kefir. Firstly control group compared with the others which were fed culture and grain kefir at non-lethal heat shock temperature (37°C) for *C. elegans*. And then, same comparison repeated at optimum growth temperature, that is 20°C for *C. elegans*.

As a result, there is % 29 increasing on lifespan of *C. elegans* which were fed with culture kefir and % 22 increasing on lifespan of *C. elegans* were fed with grain kefir at 37°C. On the other hand, we couldn't explain the meaning of results obtained from comparison made at 20°C.

KEYWORDS: Aging, *C. elegans*, kefir, probiotic.

COMMITTEE: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Asst. Prof. Dr. Gülgün GÜNDÜZ (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE

ÖNSÖZ

Kefir uzun yıllardır insanlar tarafından tüketilen ve sağlığa olumlu etkisi olduğu bilinen fermente bir süt ürünüdür. Kefir gıda mühendisliğinin öncelikli konusu olmasına rağmen konu ile ilgili *in vivo* çalışmalar sınırlı sayıdadır. Biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında model organizma kullanımı bilim dünyasında oldukça yaygındır. Model organizmalar *in vivo* çalışmalarda kolaylıklar sağlamaktadır. Bu çalışmada kefirin bir model organizma olan *Caenorhabditis elegans*'daki stres direnci ve ömür uzunluğuna olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmayla *in vivo* kefir çalışmalarındaki eksikliğe bir katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Fermente süt ürünü olan kefir, içinde bakteri ve mayaların bulunduğu kompleks bir bileşimdir. Bu kompleks bileşim test ettiğimiz model organizmaya fayda sağladığı gibi, kontrol edilmesi zor olan deneysel problemler ortaya çıkarması nedeniyle araştırmacılara zorluklar yaratmıştır. *C. elegans* ile ilk defa çalışılması ve yine ilk defa kefirin biyolojisinin anlaşılmasına çalışılması, araştırma süresinin büyük çoğunluğunu almıştır. Bu durumlar karşısında çalışma, optimum koşullara ulaşana kadar modifiye edilmiştir.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülgün GÜNDÜZ'e, başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN olmak üzere, değerli öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda kullanılan kefir danelerini sağlayan Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN, Dr. Ayşe AŞÇI ARSLAN ve doktora öğrencisi Firuze ERGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Koray KOÇ'a, Ferdi DEMİRTAŞ'a, Fatih UÇAR'a, aileme ve sevgili eşim Alper GÜNEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	2
2.1. Yaşlanma.....	2
2.2. Probiyotik.....	3
2.3. Prebiyotik.....	5
2.4. Kefir.....	6
2.5. <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
2.5.1. <i>C. elegans</i> bağışıklık sistemi.....	18
2.5.1.1. <i>C. elegans</i> bağışıklık sisteminde rol oynayan yollar.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Malzemeler.....	23
3.1.1. Reaktifler.....	23
3.1.2. Petri kapları.....	23
3.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> yaşamını sürdürmesi.....	23
3.3. <i>C. elegans</i> 'ın Temini.....	23
3.4. NGM (Nematod büyüme ortamı) Hazırlanması.....	23
3.5. Yumurta Toplama İşlemi.....	24
3.6. Kefir Alımı.....	24
3.7. Dane Kefirin Hazırlanması.....	24
3.8. Kültür (Starter) Kefirin Hazırlanması.....	25
3.9. Isı Stresi (Termotolerans) Deneyi.....	25
3.10. Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi Deneyi.....	25
3.11. Mikrobiyolojik Analizler.....	26
3.11.1. <i>E. coli</i> sayımı.....	26
3.11.2. Laktobasil sayımı.....	26
3.11.3. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı.....	26
3.11.4. Laktokok sayımı.....	26
3.11.5. Maya sayımı.....	27
3.11.6. Patojen kontrolü (Koliiform bakteri sayımı).....	27
3.12. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Isı Stresi (Termotolerans) Deneyi.....	28
4.1.1. Isı stresi deneyinde ortalama yaşam süresi.....	28
4.1.2. Isı stresi deneyinde maksimum yaşam süresi.....	29
4.2. Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi Deneyi.....	30
4.2.1. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde ortalama yaşam süresi.....	30
4.2.2. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde maksimum yaşam süresi.....	32
4.3. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	33
4.3.1. <i>E. coli</i> sayım sonuçları.....	33

4.3.2. Laktobasil sayım sonuçları.....	34
4.3.3. Toplam aerobik mezofilik sakteri sayım sonuçları	35
4.3.4. Laktokok sayım sonuçları	35
4.3.5. Maya sayım sonuçları	36
4.3.6. Patojen kontrolü sonuçları (Koliform bakteri sayımı).....	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ.....	43
7. KAYNAKLAR.....	45
8. EKLER.....	53
Ek-1 : Isı Stresinde Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları.....	53
Ek-2 : Isı Stresinde Maksimum Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları.....	55
Ek-3 :Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları.....	57
Ek-4 : Normal Sıcaklıktaki Maksimum Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları.....	58
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

Age	Ageing Alteration
Akt	AKT Kinase Family
ASK	apoptosis signal-regulating kinase
CO ₂	Karbondioksit
Daf	Abnormal Dauer Formation
Dbl	DPP/BMP-Like
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksinükleikasit
FOXO	Forkhead Box
FUDR	5-Fluorodeoxyuridine
Gcs	Gamma Glutamylcysteine Synthetase
HSP	Heat Shock Protein
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Igf	Insulin-Like Growth Factor
Il-1	İnterlökin-1
İns-18	Insulin Related
Jnk	Jun N-Terminal Kinase
Kob	Koloni Oluşturan Birim
L1	Larval Dönem 1
L2	Larval Dönem 2
L3	Larval Dönem 3
L4	Larval Dönem 4
Lon-1	ATP-Dependent Protease
Lys	Lysozyme
Mab-21	Male Abnormal
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mef-2	Related To Vertebrate MEF2 Transcription Factor
N2	Yaban Tip
Nsy	Neuronal symmetry
Nus	Nuclear Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase

PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
PMK	p38 MAP kinase
Pmk-1	p38 Map Kinase family
SEK	SAPK/ERK kinase (SAPK, stress-activated protein kinase; ERK, extracellular-signal-regulated protein kinase);
Sek-1	SAPK/ERK kinase
SKN	Skinhead
Skn-1	SkiNhead (Nuclear factor-erythroid-related factor)
Sma	Smads (Mothers against decapentaplegic)
SOD	Süperoksit Dismutaz
Tgf-b	Transforming growth factor beta
Tir-1	Toll and Interleukin 1 Receptor
Unc-43	UNCoordinated (ortholog of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII))

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. a) Kefir danesi (Farnwoth 2008). b) Kefir danesi (Ötleş ve Çağındı 2003). ...	1
Şekil 2.1. Yaşlılıkta meydana gelen fizyolojik değişiklikler ve probiyotiklerin olası etki noktaları (Scheid 2013'ten uyarlanmıştır).	6
Şekil 2.2. Kefirin yapısı (Wikipedia'dan alınmıştır).....	7
Şekil 2.3. Kefir danesinin iç kısmının elektron mikroskopundaki görüntüsü (Güzel Seydim vd 2005).....	9
Şekil 2.4. Kefir danesinin dış yüzeyinin elektron mikroskopundaki görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005).	9
Şekil 2.5. Kefir danesinin dış kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005).	10
Şekil 2.6. Kefir danesinin dış kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005).	10
Şekil 2.7. Kefir danesinin iç kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005).	11
Şekil 2.8. Kefirin karakteristik özelliklerini belirleyen faktörler (Farnworth 2008'den uyarlanmıştır).	12
Şekil 2.9. Yetişkin hermafroditin anatomisi (Altun 2009'dan uyarlanmıştır).....	15
Şekil 2.10. <i>C. elegans</i> 'ın 20°C'de hayat döngüsü (Altun 2009'dan uyarlanmıştır).....	16
Şekil 2.11. <i>C. elegans</i> 'ta antimikrobiyal savunma (Millet ve Ewbank 2004'den uyarlanmıştır).....	19
Şekil 2.12. <i>C. elegans</i> bağırsak bağışıklığında bakteri enfeksiyonuna karşı savunma yapan üç önemli yolak (Millet ve Ewbank 2004'den uyarlanmıştır).....	21
Şekil 4.1. Isı stresi deneyinde <i>C. elegans</i> canlılık grafiği.....	28
Şekil 4.2. Termotolerans deneyi sonucu ortalama yaşam süresi gösterimi.....	29
Şekil 4.3. Termotolerans deneyi maksimum ömür uzunluğu süresi gösterimi.	30
Şekil 4.4. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde <i>C. elegans</i> canlılık grafiği.....	31
Şekil 4.5. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyi ortalama yaşam süresi gösterimi....	31

Şekil 4.6. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyi maksimum yaşam süresi gösterimi.....	33
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> 'nin LB agar üzerindeki koloni oluşumu.....	33
Şekil 4.8. Starter ve dane kefirin MRS agar üzerindeki laktik asit bakterilerinin koloni oluşumları.....	34
Şekil 4.9. Starter ve dane kefirin PCA agar üzerindeki koloni oluşumları.....	34
Şekil 4.10. Starter ve dane kefirin M17 agar üzerindeki koloni oluşumları.....	35
Şekil 4.11. Starter ve dane kefirin YGC agar üzerindeki koloni oluşumları.....	36
Şekil 4.12. Kültür ve dane kefirin laktik asit bakterileri, toplam mezofilik aerobik bakteriler, laktokoklar, koliform bakteriler ve mayaların kob değerleri (log ₁₀).....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kefirin kimyasal bileşimi ve besin değeri (Ötleş ve Çağındı 2003'ten uyarlanmıştır).....	8
Çizelge 2.2. Kefir danelerindeki mikrobiyota (Pogacic vd 2013'ten uyarlanmıştır).....	13
Çizelge 4.1. Dane kefir ve kültür kefirin mikrobiyolojik analiz sonuçlarının log kob/ml cinsinden değeri	36

1. GİRİŞ

Metchnikoff'un ilk kez 1908 yılında yayınlanan “Yaşam Süresinin Uzatılması” isimli kitabında yaşlılıkta meydana gelen bağırsak rahatsızlıklarının iyileştirilmesi ya da geciktirilmesiyle yaşlı insanların daha rahat bir hayat süreceğini öne sürmüştür. Bu amaçla yaşlılar ve bağırsak mikroorganizmaları ile sistematik çalışmalar yapılması gerektiğini savunmuştur. Araştırmacı pek çok mikroorganizmanın faydalı olduğunu bunlar içinde de en önemlilerinin laktik asit bakterileri olduğunu vurgulamıştır. Metchnikoff ayrıca Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarını beslendikleri süt ürünlerinin *Lactobacillus* türleri içermesine bağlamıştır (Metchnikoff 2004, Nair ve Takeda 2011).

Kefir kökeni Kafkas dağları olduğuna inanılan az miktarda alkol içeren viskoz ve fermente gazlı bir içecektir. Kefir, Arjantin'den Tayvan'a, Fransa'dan Türkiye'ye kadar geniş bir yelpazede üretilmektedir (Farnworth 2008). Kephir, kiaphur, kefer, knapan, kepi ve kipi gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır (Kwak vd 1996).



Şekil 1.1. a) Kefir danesi (Farnworth 2008) b) Kefir danesi (Ötleş ve Çağındı 2003)

Kefir ismi Türkçede mutluluk, hoşnutluk anlamına gelen keyf sözcüğünden türemiştir (Pogacic vd 2013). Kefir kültürünün başlangıç noktasının neresi olduğu tam olarak belli değildir. Mikrobiyal analizlere göre farklı lokasyonlarda üretilen kefirlerin farklı mikrobiyotaya sahip olduğu görülmüştür (Farnworth 2008). Kefir daneleri 1 mm ile 6 mm arasında değişen boyutlardadır, düzgün bir şekli yoktur, patlamış mısıra benzer, beyaz veya sarı renktedir (Irigoyen vd 2005).

Biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında, model organizma kullanımı oldukça yaygındır. Doğal olarak yaşlanma sürecinin aydınlatılmasında da fare, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* gibi model organizmalar kullanılmaktadır (Olsen vd 2006).

Caenorhabditis elegans, yapılan pek çok bilimsel çalışmada yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. 2002 ve 2006 Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülleri ile 2008 Nobel Kimya, bu model organizmanın kullanıldığı çalışmalara verilmiştir (Anonim 2015a, Anonim 2015b, Anonim 2015c). İnsan genlerinin % 40'ının homologu *C.elegans*'ta bulunduğundan, memelilere ait birçok keşif bu model organizma kullanılarak yapılmıştır (Corsi 2006).

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Yaşlanma

Yaşlanma, organizmanın hücre, doku, organlarında zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, ölümle sonuçlanan geriye dönüşü olmayan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerdir (Holliday 1995). Yaşlanma pek çok türün yaşadığı etkileyici bir olgudur. Geçtiğimiz on yıllarda yapılan çalışmalarda yaşlanmanın sadece doku ve hücrelerin bozulmasından ibaret olmadığı genetik yolakların da bu süreçte etkili olduğu görülmüştür (Lithgow vd 2006). Solucanlar, sinekler, mayalar ve fareler gibi model organizmalarla yapılan çalışmalar yaşlanmanın çevresel, epigenetik, genetik faktörlerden etkilendiğini yani çok faktörlü bir süreç olduğunu göstermiştir (Amrit vd 2014).

Yaşlanma, yaştan ilerlemesiyle birlikte fizyolojik fonksiyonların gerilemesi olarak tanımlanmaktadır (Imahori vd 1992). Son yıllarda bilim ve tıpta yaşanan gelişmeler ile iyileşen hayat standartları (iyi beslenme ve hijyen gibi) ömür uzunluğunda etkili olmuştur (Woodmansey vd 2007).

Hücrel değişiklikler, toplamda organizmadaki değişiklikler, üreme olgunluğundan sonra gerçekleşen fiziksel çöküş beraberinde yaşlanmayı getirmektedir. Biyolojik yaşlanmanın pek çok nedeni vardır. Bunlar arasında serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar, telomer kısalması ve replikatif senesens, DNA hasar birikimi, DNA tamiri aksaklıkları, mitokondrial bozulma, bozuk protein/atık birikimi, çekirdek DNA'sı ve mitokondrial DNA'da mutasyonlar, nöroendokrin sistem hataları, immun sistem hataları bulunur. Bütün hücrel değişimler ve bunların beraberinde organizmada meydana gelen birikmiş büyük değişimler organizmal yaşlanmayı oluşturur. Organizmal yaşlanma, genellikle yaşlılık hastalıkları denilen dolaşım sistemi hastalıkları, kanser, nörodejenaratif hastalıklar ve benzeri hastalıkların ortaya çıktığı durumla karakterizedir (Jin 2010).

Yaşlandıkça insan bağırsağındaki bakteri popülasyonu da değişime uğramaktadır. Örneğin yaşlılıkta bağırsaktaki bakteri popülasyonunda *Bifidobacterium infantitis* ve *B. breve* türlerinin dominantlığından söz edilebilir. Bağırsaktaki değişimler büyük ölçüde diyetle bağlıdır. Bunun yanında çevre, sahip olunan hastalıklar ve ilaç kullanımı gibi etkilerin de bu değişimde rolü vardır (Farnworth 2008). Yaşlanmayla birlikte besin alımının azalması (Murphy ve O'Mahony 2009) ve vücut hareketlerinin kısıtlanmasından dolayı bağırsaklardaki bakteriyel metabolitlerde azalma görülür. Bu azalma yaşlılıkta önemli bir sorun olan bağırsak hareketlerinin yavaşlamasına bunun devamında da kabızlığa neden olmaktadır. Mikrobiyal dengenin bozulması yaşlılarda gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının oluşmasında en önemli nedenlerden biridir (Woodmansey 2007).

Gastrointestinal rahatsızlıkların nedenlerinden biri de yetersiz ve dengesiz beslenmedir. Yaşlılıkta yetersiz beslenmenin pek çok nedeni vardır. Yaşlı insanların tat ve koku duyularının azalmasıyla birlikte tükettikleri gıda miktarı ve türü de azalmaktadır. Çiğneme kabiliyeti ve bağırsaktaki hareket durumu bağırsaktaki epiteli ve işlevini etkilemektedir. Azalan gıda ile yetersiz çiğneme besin emilimini azaltmakta bu da bağırsak bağıışıklık sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır (Biagi vd 2012).

İshal, kabızlık ve dipir mide ve bağırsak hastalıkları gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarının doğru müdahaleler ile hafifletileceğine inanılmaktadır. Bakteri metabolizması ve fonksiyonu daha iyi anlaşıldığında bunlardan sağlanacak faydanın daha iyi olacağı düşünülmektedir. Bu faydalar sindirim sistemi enfeksiyonlarına karşı direnç, iyileşen bağıışıklık sistemi, kanseri ve pek çok hastalığı önleme, vitamin üretimi ve kalsiyum vb. minerallerin alımının artmasıdır. Kompleks karbonhidratlar içeren probiyotik ve prebiyotik ürünler ve bunların simbiyotik bileşimini oluşturan ürünlerin kullanımı ilerleyen yaşlarda dahi sağlıklı gastrointestinal mikrofloranın gelişmesini sağlamaktadır (Farnworth 2008).

Yaşlanma çalışmalarında asıl hedef yaşam uzunluğunun artışı ve yaşa bağlı hastalıkların önlenmesidir. Son yıllarda bazı hastalıkların klasik tedavilerine alternatif yaratmak amacıyla prebiyotik ve probiyotik maddelerle çeşitli kronik rahatsızlıkların önlenmesi ve tedavide olası yararlı etkilerini araştırmak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Kökeninin Kafkasya'dan geldiği düşünülen kefir, hastalıklara karşı etkisi kanıtlanmış probiyotik bir karışımdır (Salminen vd 1998, Zubillaga vd 2001, Urdenata vd 2007).

Sağlıklı yaşlanmayı teşvik etmek ve sağlıklı yaşlanmayı sürdürebilmek için beslenme stratejileri geliştirilmelidir. Yaşlanma ile ilgili fizyolojik ve anatomik süreçlerin, bunların devamında da yaşlılıkla birlikte değişen bağırsak mikrobiyotasının aydınlatılması önem kazanmaktadır (Woodmansey 2007).

2.2. Probiyotik

20. yüzyılda farklı mikroorganizmalar hastalıkları tedavi etmek ve hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılmıştır. Bu mikroorganizmaların başında probiyotikler gelmektedir. Nobel ödüllü Elie Metchnikoff 1900'lü yıllarda Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarını, beslendikleri fermente süt ürünlerindeki bileşenlerin sağladığı hipotezini öne sürmüştür.

Probiyotikler sağlığa ve insan refahına olan etkilerine bağlı olarak farklı şekillerde tanımlanmıştır. Probiyotiği ilk kez 1965'te Lilly ve Stillwell "Bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve başka bir mikroorganizmanın büyümesini destekleyen bileşikler" olarak tanımlamışlardır. Parker ise "İntestinal dengeyi sağlayan organizmalar ve maddeler" olarak tanımlamıştır. Fuller bu tanımları modifiye ederek probiyotikleri

“Bağırsakta mikrobiyal denge sağlayan, konağa yararlı etkileri bulunan mikrobiyal besin takviyesi” olarak tanımlamıştır (Salminen 1999, Rusch 2002). Bu tanım Havenaar ve Veld tarafından geliştirilerek “Bağırsak mikrobiyota özelliklerini geliştirerek hayvan veya insana fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar” şeklinde almışlardır ve bu haliyle kullanılmaktadır (Ötleş 2014).

Tüm yaş gruplarında özellikle yaşlılarda bağırsak mikrobiyotası ve onların metabolitleri bağırsak sağlığı ve hastalıklarının düzenlenmesinde önemli görev yapmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası değiştiğinde metabolik bozukluklar, diyabet, bağırsak kanseri, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve zayıflığa neden olabilmektedir. Bağırsakta bulunan mikrobiyatanın metabolik aktivitelerinin büyük çoğunluğunu anaerob bakteriler sağlamaktadır. Örneğin, anaerob bakteriler diyetle alınan karbonhidratı fermente etmesi sonucu kısa zincirli yağ asitleri ve bağırsak sağlığını artıracak anyonlar olan asetat, propionat ve bütirat oluşur. Ayrıca bakteriler triptofanın dahil olduğu aminoasitleri metabolize ederler. Beslenme ve sağlığı korumada bağırsak mikrobiyotasının rolü oldukça komplekstir (Duncan ve Flint 2013).

Probiyotik aktiviteler üç grupta toplanabilmektedir. Bunlardan ilki konak savunmasının güçlenmesidir. Probiyotik aktiviteler enfeksiyonel rahatsızlıkları önler veya tedavisine destek olur. Tümöral hücrelerin gelişimini engeller. İkinci etkisi yararlı ve zararlı mikroorganizmalarla sürekli etkileşim halindedir. Enfeksiyonları önlediği için bağırsak mikrobiyotasının kararlılığını devam ettirmesini sağlar. Üçüncü probiyotik etki ise toksin gibi mikrobiyal ürünleri ve safra tuzu gibi konakçı ürünlerini etkileyen aksiyonlara dayanarak kendisini gösterir. Bu üç etki toksinlerin aktive edilmesini, bağırsağın detoksifikasyonunu, enfeksiyona karşı direnç sağlar ve kanseri önlemeye yardımcıdır. Bağırsak mikrobiyotası ile konak arasında fizyolojik denge oluşmasını sağlar (Oelschlaeger 2010).

Probiyotik bakterilerin etkili olabilmeleri gastrointestinal sistemde ve epitel hücre duvarlarında koloni oluşturmalarına bağlıdır. Probiyotik bakteriler mukozadan salgılanan mukoz madde içerisinde çoğalabilmektedir. Bu salgı içerisindeki müsin maddesini enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Doğan 2012).

Gastrointestinal sistemde bakterilerin canlı kalabilmeleri için sindirim enzimlerine, safra tuzuna ve pH’a karşı dayanıklı olması gerekir (Lee vd 2001, Farnworth 2005). Probiyotik bakteriler patojenlere karşı bağırsağı korumaktadır. Bunu da patojen bakterilerle rekabete girerek bağırsak epitel hücrelerine yapışarak yaptığı düşünülmektedir (Timmerman vd 2004, Farnworth 2005).

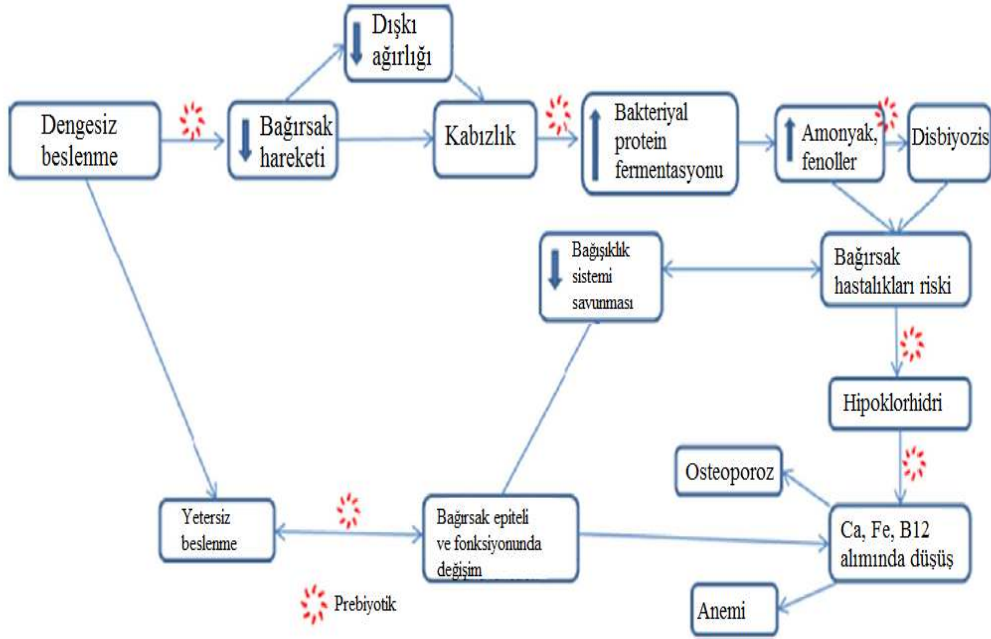
2.3. Prebiyotik

Prebiyotikler probiyotik bakterilerin çoğalmasını ve aktivasyonunu sağlayarak, konağa yararlı etki sağlayan, sindirilemeyen gıda katkı maddesidir (Gülmez vd 2002, Lim vd 2005, Scheid vd 2013) .

Gastrointestinal mikrobiyota bileşiminde veya aktivitesinde yararlı değişiklikler yapabilen seçici olarak fermente edilen bileşiklerdir (Hopkins vd 2001, Farnworth 2008, Duncan vd 2013). Prebiyotikler üst gastrointestinal bölgelerde sindirilmezler, mide enzimlerine karşı dirençlidirler, hidrolize edilmezler. Bağırsakta bulunan mikrobiyota tarafından fermente edilirler. Bağırsakta bulunan probiyotik bakteri potansiyelinin büyümesini ve aktifliğini sağlayarak konakçıya fayda sağlarlar (Glenn ve Gibson 2008).

Prebiyotik etki, mikrobiyatanın ürettiği bütirat, asetat, propionat gibi kısa zincirli yağ asitleri ile tanımlanır. Bütirat, Clostridium, Eubacterium ve Ruminococcus cinsleri tarafından, asetat ve propionat laktik asit bakterileri Bifidobacterium ve Lactobacillus cinsleri tarafından üretilir. Prebiyotikler laktik asit bakterilerinin aktivitesini artırarak immün sistemdeki asetat ve propionat üretimine pozitif katkıda bulunur. Prebiyotikler bütirat üreten bakterilerden çok laktik asit bakterilerini aktifleştirmektedir. Propionat ve asetat immün sistem genlerinin ifadesinde anahtar rol oynarken, bütirat tek başına etkili değildir. Cavaglieri'nin lenfosit kültürleriyle yaptığı çalışmada asetat, propionat ve bütiratın yüksek IL-10 seviyesinde etkili olduğu ancak bütiratın tek başına yeterli olmadığını görmüştür. Asetat ve propionat ayrıca IgA ve doğal öldürücü hücre aktivitelerini düzenler. Bütirat NF-k aktivasyonunu inhibe ederek inflamasyonu azaltır, sitoplazmik inhibitör olan NF-kB seviyesini azaltır. Böylece proenflamatuvar sitokinler inhibe edilir (Lim vd 2005, Gourbeyre vd 2011, Scheid vd 2013).

İnsanlar yaşlanma sırasında kemik kütlesinin kalitesini ve yoğunluğunu kaybetmektedirler. Bu da osteoporoz, dolaşım ve solunum bozukluğu gibi rahatsızlıkları beraberinde getirmektedir. Şekil 2.1'de yaşlanmanın meydana getirdiği fizyolojik değişiklikler ve bu değişikliklere prebiyotiklerin olası etkileri gösterilmiştir (Scheid vd 2013).



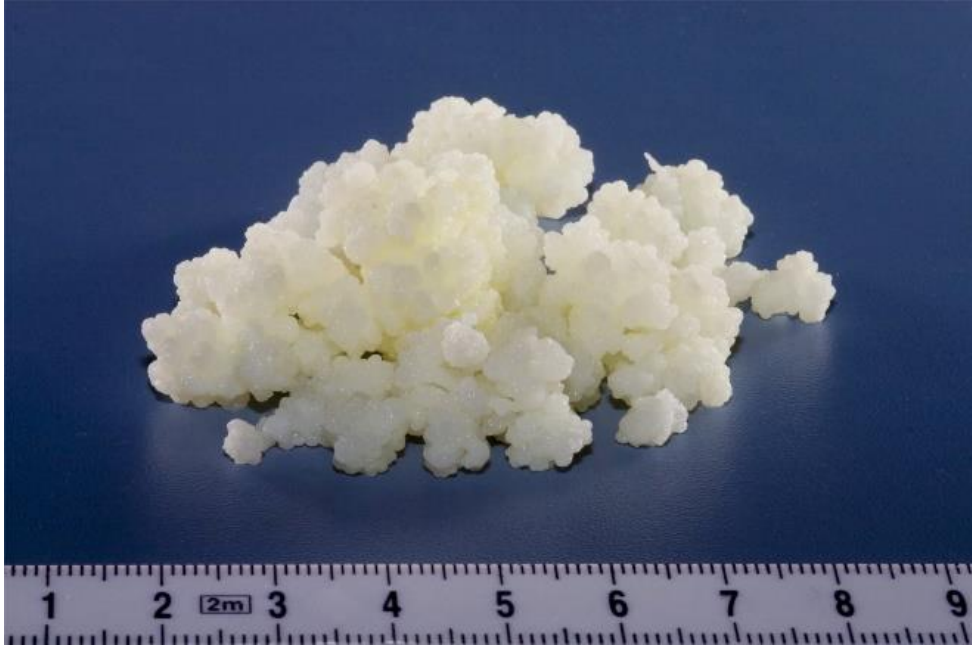
Şekil 2.1. Yaşlılıkta meydana gelen fizyolojik değişiklikler ve probiyotiklerin olası etki noktaları (Scheid vd 2013'ten uyarlanmıştır)

2.4. Kefir

Türk Gıda Koteksi'ne göre kefir, fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren kültürler ya da kefir danelerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanmıştır (Anonim 2009).

Kefir daneleri suda çözünmezler, süte katıldıklarında şişerler ve beyazlaşırlar. Kefir danesinin en önemli özelliği fermentasyon bittiğinde süzülüp tekrar kullanılabilmesidir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003). Kefirin antibakteriyel etkisi pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Buna ek olarak kefir, tüberküloz, kanser ve gastrointestinal hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Tamime vd 2006). Kefir laktozu sindiren mikroorganizmalara sahiptir. Bu yüzden bağırsaklarında laktaz ya da beta galaktozidaz enzimi yetersiz, laktoz intoleransı olan kişiler kefir rahatlıkla tüketilebilmektedirler (Farnworth 2008).

Kefir daneleri karnabahar görünümünde olup probiyotik bakteri ve mayaların oluşturduğu kompleks bir yapıdır (Ötleş ve Çağındı 2003).



Şekil 2.2. Kefirin yapısı (Wikipedia'dan alınmıştır)

Kefir laktik asit, asetaldehit, aseton, etanol ve diğer fermantasyon ürünlerinden oluşan bir karışımdır. Fermantasyon boyunca laktik asit bakterileri laktozu laktik asite çevirir. Laktoz fermantasyonunda mayalar CO₂ ve az miktarda etanol üretir. Kefir danesi laktik asit bakterisi ve mayalardan oluşan daneli bir yapıdadır. Bu dane kültür başlatıcı olarak kullanılarak kefir üretimi yapılabilir. Kefir yaklaşık 24 saatte 20-25°C'de üretilir, 4°C'de muhafaza edilir (Dinç 2008).

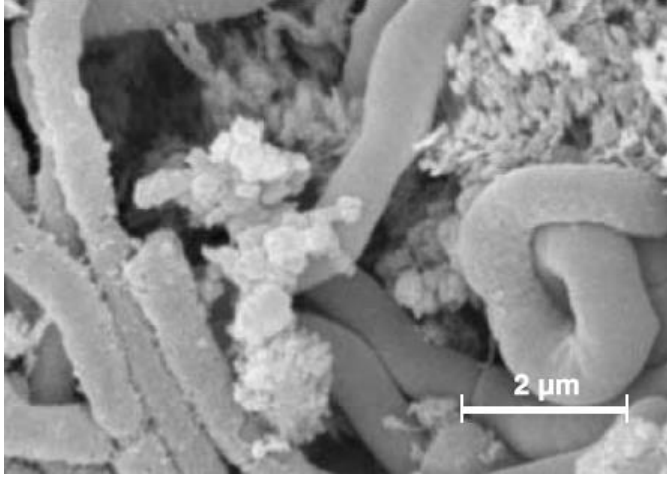
Kefir danesi eşsiz protein ve ekzopolisakkarit kaynağıdır. Bu ekzopolisakkarit yapıya kefiran adı verilmektedir. Kefiran suda çözünür, D glukoz ve D- galaktoz içerir. Ekzopolisakkarit yapı, ürünün dokusunu ve ağızda alınan hissi yaratır (Angulo vd 1993, Kök-Taş vd 2013).

İnek, keçi, koyun, Hindistan cevizi, pirinç ve soya sütünden kefir yapılabilir. Bunlar arasında en çok tercih edilen inek sütüdür. Kefir danelerinin fermantasyonu sonucu laktik asit, asetik asit, CO₂, alkol ve aromatik bileşikler oluşmaktadır. Tüm bu bileşenler kefirin gazlı, asidik ve ferahlatıcı bir içecek olmasını sağlamaktadır. Kefir danelerinin saf kültürler şeklinde oluşturulabildiğine dair bir bilgi henüz yoktur. Farklı bölge ve kaynaklardan elde edilen kefir danelerinin mikrobiyal ve biyokimyasal içeriğinin de farklı oldukları bildirilmiştir (Ötleş ve Çağındı 2003). Kefirin kimyasal bileşimi Çizelge 1'de gösterilmiştir.

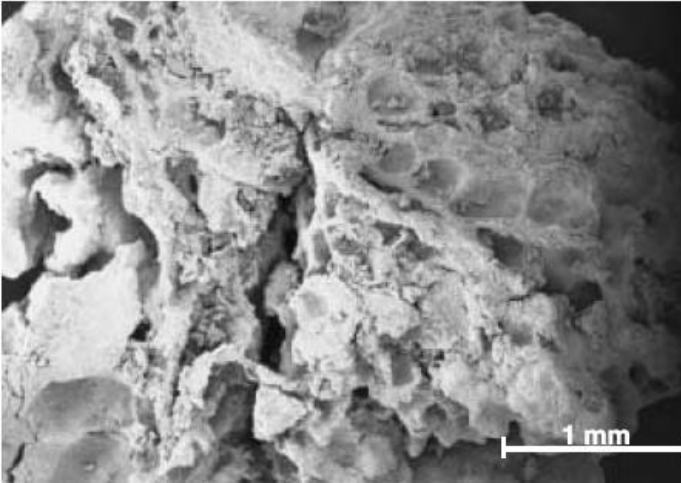
Çizelge 2.1. Kefirin kimyasal bileşimi ve besin değeri (Ötleş ve Çağındı 2003'ten uyarlanmıştır)

Bileşenler	100 G		
Enerji	65 kcal	Mineral içerik (g)	
Yağ (%)	3,50	Kalsiyum	0,12
Protein (%)	3,30	Fosfor	0,1
Laktoz (%)	4,00	Magnezyum	12
Su (%)	87,50	Potasyum	0,15
		Sodyum	0,05
Süt Asidi (g)	0,80	Klor	0,1
Etil Alkol (g)	0,90		
Laktik Asit (g)	1,00	Vitaminler (mg)	
Kolesterol (g)	13,00	A	0,06
Fosfat (g)	40,00	Karoten	0,02
		B1	0,04
Aminoasitler (g)		B2	0,17
Triptofan	0,05	B6	0,05
Fenilalanin+Trozin	0,35	B12	0,50
Lösin	0,34	Niasin	0,09
İzolosin	0,21	C	1,00
Treonin	0,17	D	0,08
Metiyonin+ sistein	0,12	E	0,11
Lizin	0,27		
Valin	0,22		
İz Elementler			
Demir (mg)	0,05		
Bakır (µg)	12		
Molibden (µg)	5,5		
Mangan (µg)	5		
Çinko (mg)	0,36		

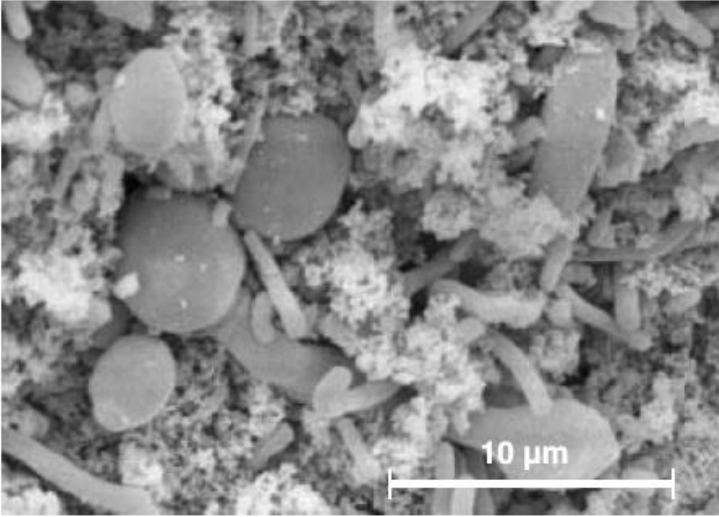
Güzel-Seydim vd (2005) kefir danelerini elektron mikroskobu ile incelediği çalışmalarında (Şekil 2.3, Şekil 2.4, Şekil 2.5, Şekil 2.6, Şekil 2.7) kefir danesinin iç kısmında laktobasiller, mayalar ve lifli yapılar gözlemişler ve bu lifli yapıların kefiran olabileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar lifli yapının iç kısımlarda daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. İç kısımda laktobasiller ve lifli yapının bulunduğunu ancak mayalara rastlanmadığını gözlemlemişlerdir. Bunun sebebinin ise mayaların aerobik canlılar olduğunu bu yüzden danenin dış kısımlarında kolonize olduklarını belirtmişlerdir.



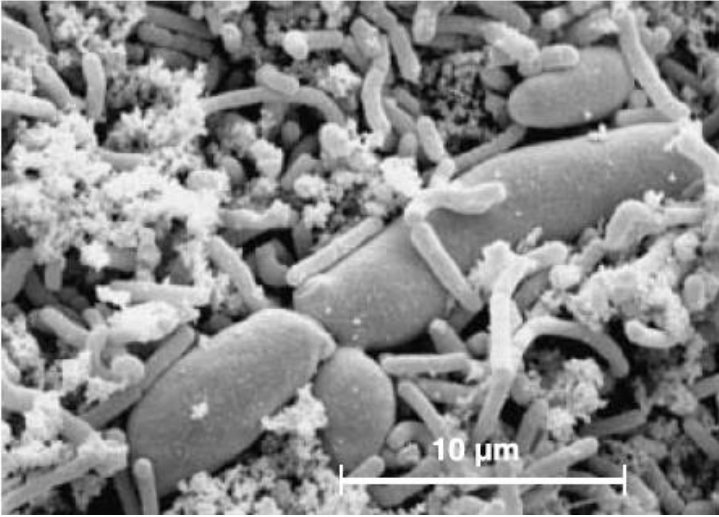
Şekil 2.3. Kefir danesinin iç kısmının elektron mikroskobundaki görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005)



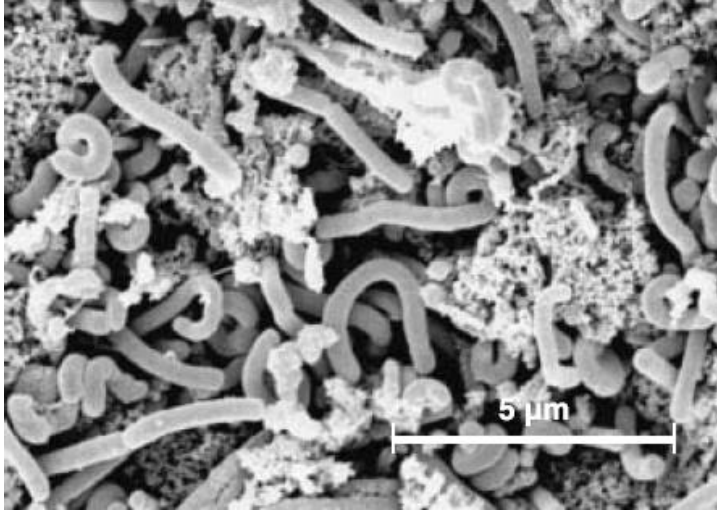
Şekil 2.4. Kefir danesinin dış yüzeyinin elektron mikroskobundaki görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005)



Şekil 2.5. Kefir danesinin dış kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005)



Şekil 2.6. Kefir danesinin dış kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005)



Şekil 2.7. Kefir danesinin iç kısmının elektron mikroskobu görüntüsü (Güzel-Seydim vd 2005)

Kefirin kimyasal ve mikrobiyal içeriği hazırlandığı ortam şartlarına göre değişkenlik göstermektedir (Sarkar 2008, Farnworth 2008). Kefir üretimine etki eden faktörler Şekil 2.8’de gösterilmiştir.

Başlangıç Materyal Değişkenleri

Sütün türü
Yağ seviyesi
İnokülasyon formu
İnokülasyon seviyesi

Süreç Değişkenleri

Fermentasyon sıcaklığı
Fermentasyon süresi
Danenin uzaklaştırılması
Olgunlaşma süresi ve sıcaklığı

Lezzet ilavesi
Depolama süresi

Kefirin Karakteristik Özellikleri

Lezzet
Doku
Kimyasal Bileşenler
Mikrobiyal Bileşenler

Şekil 2.8. Kefirin karakteristik özelliklerini belirleyen faktörler (Farnworth 2008'den uyarlanmıştır)

Kefir danelerindeki mikrobiyal çeşitlilik mikrobiyolojik ve moleküler tekniklerle pek çok kez araştırılmıştır. Tespit edilen bakteri ve maya türlerindeki çeşitlilik kompleks bir mikrobiyal yapıyı göstermektedir.

Kefir daneleri bakteri ve mayaların simbiyotik ilişki içinde oldukları eşsiz bir ekosistemi temsil etmektedir. Kefir danelerindeki karmaşık mikrobiyal topluluk kefirin orjinine bağlı olarak 50'den fazla çeşitli bakteri ve maya türlerini içerebilmektedir (Sarkar 2008, Pogacic vd 2013). Bu türlerin çoğunluğunu laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar oluşturmaktadır. Araştırmacıların verdiği bu sayılar metagenomik tekniklerin gelişmesiyle artacaktır ancak günümüzde sabit bir tür sayısı tam olarak belirlenmemektedir (Pogacic vd 2013).

Çizelge 2.2. Kefir danelerindeki mikrobiyota (Pogacic vd 2013'ten uyarlanmıştır)

Mikroorganizma	Referans
<i>Acetobacter fabarum</i>	Gao, 2012
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	Unsal, 2008
<i>Acetobacter syzygii</i>	Unsal, 2008
<i>Acinetobacter</i>	Gao, 2013
<i>Bifidobacterium spp</i>	Leite, 2012
<i>Candida inconspicua</i>	Simova, 2002
<i>Dysgonomonas</i>	Gao, 2013
<i>Enterococcus faecium</i>	Unsal, 2008
<i>Geotrichum candidum</i>	Timara, 2010
<i>Gluconobacter japonicus</i>	Miguel, 2012
<i>Halococcus spp.</i>	Leite, 2012
<i>Kazachstania aerobia</i>	Magalhaes, 2011
<i>Kazachstania exigua</i>	Zhou, 2009
<i>Kazachstania unispora</i>	Zhou, 2009
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Zhou, 2009
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Zhou, 2009
<i>Kluyveromyces marxianus var.</i>	Simova, 2002
<i>Lachancea meyersii</i>	Magalhaes, 2011
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus brevis</i>	Simova, 2002
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus casei</i>	Zhou, 2009
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Magalhaes, 2011
<i>Lactobacillus casei subsp. pseudopantarum</i>	Magalhaes, 2011
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Simova, 2002
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Unsal, 2008
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Unsal, 2008
<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. Kefirgranum</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus kefiri</i>	Unsal, 2008
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Magalhaes, 2011
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	Leite, 2012
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gao, 2012
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Miguel, 2012
<i>Lactobacillus uvarum</i>	Miguel, 2012

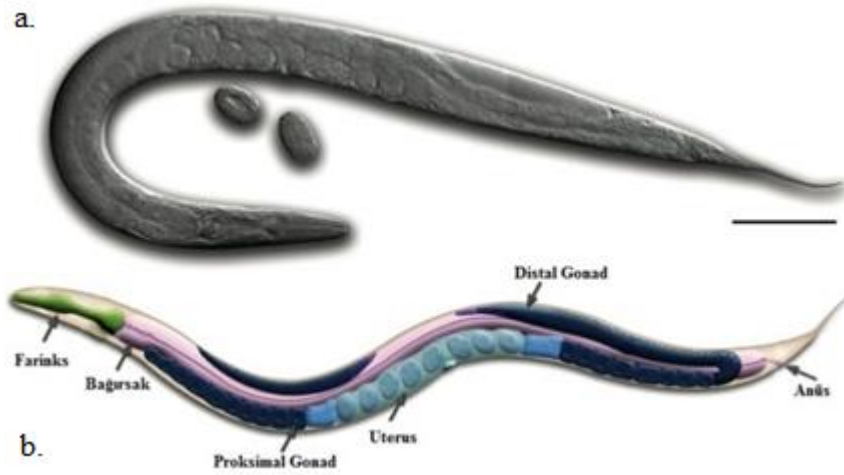
(Devamı Arkada)

Çizelge 2.2'nin devamı

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Zhou, 2009
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Unsal, 2008
<i>Leuconostoc lactis</i>	Gao, 2012
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Unsal, 2008
<i>Pelomonas</i>	Gao, 2012
<i>Pichia fermentans</i>	Wang, 2008
<i>Pichia guilliermondii</i>	Gao, 2012
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Gao, 2012
<i>Pseudomonas putida</i>	Zhou, 2009
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhou, 2009
<i>Saccharomyces martiniae</i>	Zhou, 2009
<i>Saccharomyces turicensis</i>	Wang, 2008
<i>Saccharomyces unisporus</i>	Zhou, 2009
<i>Shewanella</i>	Gao, 2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Simova, 2002
<i>Weissella</i>	Gao, 2012

2.5. *Caenorhabditis elegans*

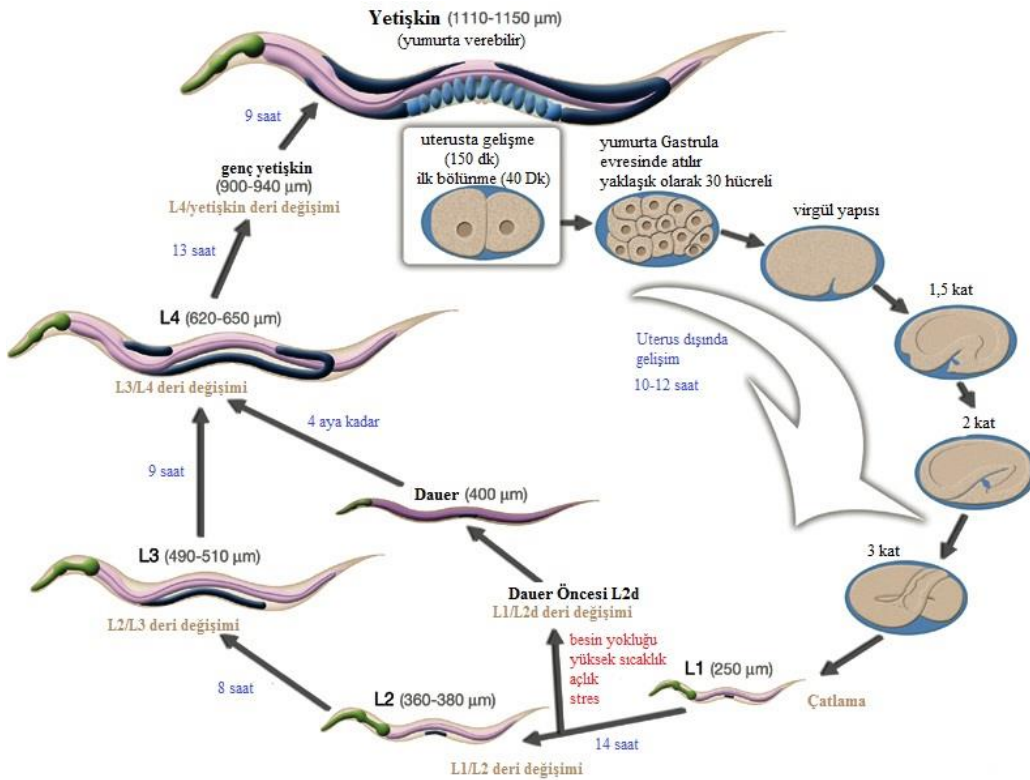
Caenorhabditis elegans toprakta serbest halde yaşayan çeşitli toprak bakterileri ve mayalar ile beslenen bir nematoddur (Engelmann vd 2010). Hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyete sahiptir. Hermafrodit *C. elegans*'lar yumurta ve sperm üreterek kendi üretkenliğini kendisi sağlayabilmektedir. Yetişkinlerin boyu 1 mm uzunluğundadır (Şekil 2.1). Yetişkin hale gelmeleri laboratuvarda *E. Coli* ile beslenerek 20°C'de 3 gün sürmektedir. Üreme hücreleri hariç 600 hücresi bulunmakta olup bunların yarısı da nöronal sisteme aittir (Brenner 1973). Yetişkin bir nematod çeşitli tipte dokularda olmak üzere yaklaşık olarak 1000 hücreye sahiptir (Corsi vd 2006). Kültürde erkek bireyler de bulunabilmektedir (Brenner 1973). *C. elegans*'ların yaşaması için uygun sıcaklık 16°C ile 25°C arasında değişebilmektedir. 20°C laboratuvar çalışmaları için uygun bir sıcaklıktır (Byerly vd 1976).



Şekil 2.9. Yetişkin hermafroditin anatomisi a) Yetişkin hermafrodit sol yanal resmi b) Sol yanal kısmındaki anatomik yapının şematik çizimi Ölçek 1:0.1 mm (Altun 2009'dan uyarlanmıştır)

C. elegans genetik analizler ve ömür uzunluğu çalışmaları için uygun bir canlıdır (Maglioni vd 2014). Genel olarak avantajı küçük olması, hızlı yaşam döngüsü ve kendi üretkenliğini sağlayabilmesidir (Brenner 1973, Petersen vd 2015). Son 40 yılda *C. elegans* yaşlanma çalışmalarında daha sık kullanılan bir model organizmadır. *C. elegans*'ın toplam yaşam süresi ortalama 20 gün kadardır. Yaşlı *C. elegans*'ların fiziksel aktiviteleri azalmakta, hareketleri kolay gözlelenebilmekte ve sonunda hareketsiz kalmaktadırlar. Yaşlanmada meydana gelen fiziksel değişiklikler lipofuksin varlığı, koyu pigmentler, vakuol benzeri yapılar ve okside proteinlerin varlığındaki artıştır. Besin azlığında, popülasyondaki birey sayısı çok fazla arttığında ve ortam sıcaklığı

değişimlerinde larva nematodlar kendilerini koruma altına almaktadır. Bu evreye dauer larva dönemi denilmektedir (Hu 2007). Dauer formda nematodların oral açıklıkları kapalıdır, bu evrede beslenmezler (Vanfleteren ve Braeckman 1999). Ağzının kapalı olur ve farinks pompasının çalışmaz, ama bu dönemde optimum olmayan çevre şartlarında yaşamlarını sürdürebilirler, yani aktiftirler (Riddle vd 1981).



Şekil 2.10. *C. elegans*'ın 20°C'deki hayat döngüsü (Mavi renkteki yazılar kurtçuğun bulunduğu evreyi geçirme süresini vermektedir. İlk bölünme fertilizasyondan sonra yaklaşık 40 dakika içinde gerçekleşmektedir. Yumurta ilk bölünmeden yaklaşık 150 dk sonra gastrula evresinde dışarı atılmaktadır. Yumurtanın çatlaması gastrula evresinden 10-12 saat sonra gerçekleşmektedir. Kurtçukların boyutları her evrede isminin yanında mikrometre cinsinden verilmiştir.) (Altun 2009'dan uyarlanmıştır)

C. elegans'ın yaşam döngüsü, embriyonik dönem, 4 larval dönem (L1, L2, L3, L4) ve yetişkinlik evrelerinden oluşmaktadır. Her larva döneminden sonra kurtçuklar derilerini değiştirir. Deri değişim döneminde kurtçukların farinks pompası durur ve kısa bir uyku haline geçerler. Bu uyku dönemine “lathergus” ismi verilmektedir (Raizen vd 2008).

C. elegans biyolojik yaşlanma çalışmalarında oldukça bilgi sağlamış bir model organizmadır. Bu bilgilerden bir kısmı özellikle yaşlanma ile ilgili hücresel yolların biyokimyasal ayrıntılarıdır. Bu ayrıntılar özellikle mutasyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmışlardır. *C. elegans*'ta yaşlanmayı düzenleyen daf-2 gen yolağı en iyi karakterize edilmiş yollardan birisidir (Morley ve Morimoto 2004). Daf-2 aktivitesinin artması yetişkinlerde ömrün kısalmasına neden olmaktadır. Bunu çatal transkripsiyon faktörü daf-16'yı inhibe ederek gerçekleştirir (Millet ve Ewbank 2004). Daf-16 hücre döngüsü kontrolünde, strese yanıtta, büyümede ve yaşlanmada anahtar rol oynamaktadır (Accili vd 2004, Oh vd 2006). Bu yolak *C. elegans* yaşam uzunluğu ile karakterize edilmiştir (Ewbank vd 2006).

İnsülin benzeri sinyaller metabolizma, gelişim ve yaşam uzunluğunu düzenler. Bu sinyal yolağı FOXO transkripsiyon faktörü daf-16'nın aktivitesini negatif olarak düzenler (Lee vd 2001).

Nematodun yaşam uzunluğunu artıran en önemli mutasyonlardan biri insülin/IGF-1 sinyal kaskadında meydana gelen mutasyondur. Stres sonucu veya insülin/IGF-1 sinyal yolağının inaktivasyonu sonucu daf-16 hızlıca nükleusa geçer. Daf-16'nın aşırı ifades-i büyümede yavaşlığa ve strese karşı dirençte artışa neden olur (Olsen vd 2006). Strese karşı koruma ve dauer evresindeki faaliyetleri bilirse de daf-16 hedefleri tam olarak aydınlatılamamıştır (Murphy 2006).

Nematod *C. elegans*'ın dauer formu, stres direnci ve yaşam uzunluğu daf-2, age-1 ve daf-16 tarafından kontrol edilir. Daf-2 ve age-1 mutasyonları ısı, oksidan ve ultraviyoleye karşı direnci artırır (Barsyte vd 2001). Bu mutasyona sahip nematodların moleküler şaperon HSP-16'sı yüksek seviyelerde gözlenmiştir (Olsen vd 2006). Age-1 geninde meydana gelen mutasyon ısı şokuna direnç göstererek % 65 ömür uzunluğu sağlar. Bu etki daf-16 geninin aktivitesiyle benzer etki göstermektedir (Walker ve Lithgow 2003).

İnsülin/insülin benzeri sinyaller ömür uzunluğunu belirlemede önemli rol oynamaktadır ancak hangi yolların ne kadar etkili olduğu tam olarak açıklanamamıştır. *C. elegans*'ta insülin/insülin benzeri sinyal yollarındaki mutasyonlar ömrü uzatmaktadır. Bu mutasyonlar ısı şoku proteinleri de dahil olmak üzere pek çok stres yanıtı oluşturan genlerde meydana gelmektedir (Morley ve Morimoto 2004). Başlıca ısı şoku proteinleri 5 grupta toplanmıştır. Bunlar HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük ısı şoku proteinleridir (Kim vd 1998). Isı şoku proteinleri normal gelişim dönemlerinde mevcuttur ancak ısı şokunda veya diğer stresler altındayken üretimleri artar. *C. elegans*'ta 15 adet ısı şoku proteini bulunmaktadır ve bunlardan 4 tanesi HSP16-1, HSP16-2, HSP16-41, ve HSP16-48 yalnızca stres altındayken bulunmaktadır (Leroux vd 1997). *C. elegans*'ın HSP-16 ekspresyonunu ölçmek için 35°C'de öldürücü olmayan ısı şokuna tabi tutulduğu bir çalışmada, nematodlar oluşan HSP seviyelerine göre gruplandırılmış ve

yüksek seviyede HSP içeren kurtçukların daha uzun yaşadığı tespit edilmiştir (Rea vd 2005). Isı şoku protein ailesinin sentezlediği proteinler hücrenin çeşitli çevresel streslere karşı cevap vermesini sağlar ve hücrenin yaşamını devam ettirmesinde gereklidirler. Öldürücü derecede olmayan ısı deneylerinde bu direnç mekanizmaları uyarılabilir. Bu deneyler termotolerans (ısı stresi) deneyleri olarak adlandırılırlar (Li vd 1982).

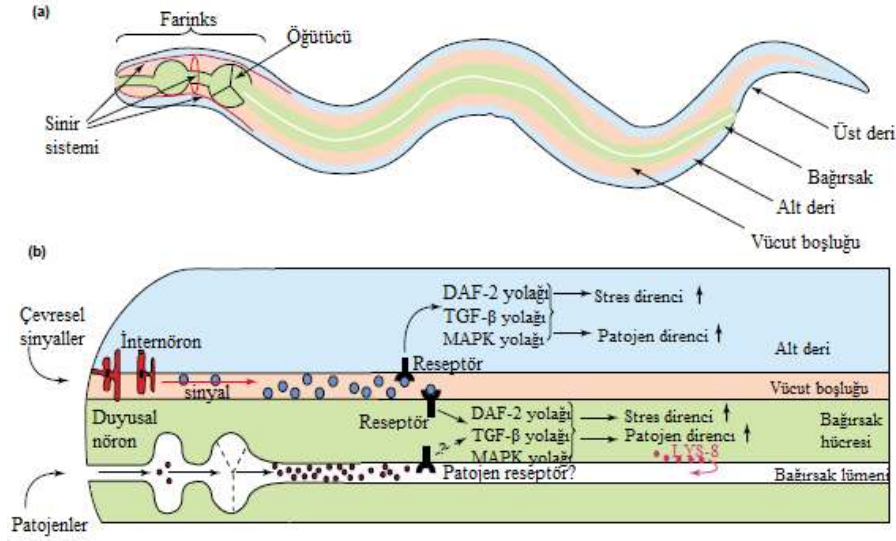
Isı şoku proteinleri başta sıcaklık olmak üzere çevresel ve biyokimyasal strese karşı proteinlerde oluşan yanlış katlanmaları ve birikimleri dengelemeye çalışmaktadır (Pralad vd 2008). Yokoyama 2002’de hsp-70, Walker 2003’te hsp 16 genlerinin *C. elegans*’larda aşırı ekspresyonları sonucu yaşam uzunluğunu artırdığını bildirmişlerdir. Isı şoku proteinlerinin artan ifadesinin termal stres altındayken yapıldığı bilinmektedir. Arkasındaki yollar tam olarak aydınlatılamasa da laktobasillerin bağırsak bariyerindeki koruyucu etkisini ısı şoku proteinleri ile sağladığına inanılmaktadır (Liu 2013).

Organizmalar evrimsel olarak çevresel strese karşı direnç göstermeye adapte olmuşlardır. Bu direnç mekanizmalarının içinde en çok çalışan ısı şokuproteinleridir. Tüm organizmalar ısıya yanıt olarak ısı şoku faktörlerini sentezlemelerine rağmen, sentezlenen proteinlerin dengesi ve önemi organizmalar arasında farklılık göstermektedir (Queitsch vd 2000). Strese yanıt oluşturan moleküler şaperonlar, ubikitinlerin direkt olarak yaşam uzunluğunu düzenlediği pek çok araştırmacı tarafından öne sürülmüştür. Yapılan son çalışmalarda ısı şoku faktörlerinin yaşam uzunluğunu düzenlediğini göstermiştir (Morley ve Morimoto 2004).

2.5.1. *C. elegans* bağışıklık sistemi

C. elegans’ın çok çeşitli toprak bakterileriyle ve mayalarla beslenebilen bir nematod olmasından dolayı, çalışmalar sırasında konak patojen etkileşimlerinin dikkate alınması gerekebilir.

Omurgalılarda hücresel ve humoral mekanizmalar antimikrobiyal savunmada rol oynarken, *C. elegans*’ta hücresel bağışıklık bulunmamaktadır (Millet ve Ewbank 2004). Sineklerde ve memelilerde fungal ve bakteriyel enfeksiyona karşı savunmada Toll yolağı önemli rol oynamaktadır (Rutschmann vd 2002). *C. elegans*’ta bu yolağın homoloğu henüz tam olarak tanımlanamamıştır, ancak homolog genlerin bulunduğu ve bu yolağın bir kısmına nematodların sahip olduğu düşünülmektedir (Fallon vd 2011).



Şekil 2.11. *C. elegans*'ta antimikrobiyal savunma a) *C. elegans*'ın basit anatomisi (Öğütücü, nematodun normal diyetinde yediği bakterileri mekanik olarak parçalar. Üst deri nematodu sarar ve çevreden gelecek bakteriyel saldırılara karşı nematodu korur. Vücut boşluğu alt deri ve bağırsak hücrelerini birbirinden ayıran içi sıvı dolu yapıdır.) b) *C. elegans*'ın bağırsak bağışıklığının hücresel yapısını gösteren model (Ortamda patojen varlığı duyuşal nöronlarla algılanır. Enfeksiyon durumunda bağırsak lümenindeki bir mekanizmanın savunma reaksiyonunu tetiklediği düşünülmektedir. Bağırsak lümeni ve vücut boşluğundaki sinir sistemi elemanları LYS-8 gibi antimikrobiyal proteinler salınmasını sağlar.) (Millet ve Ewbank 2004'den uyarlanmıştır)

2.5.1.1. *C. elegans* bağışıklık sisteminde rol oynayan yollar

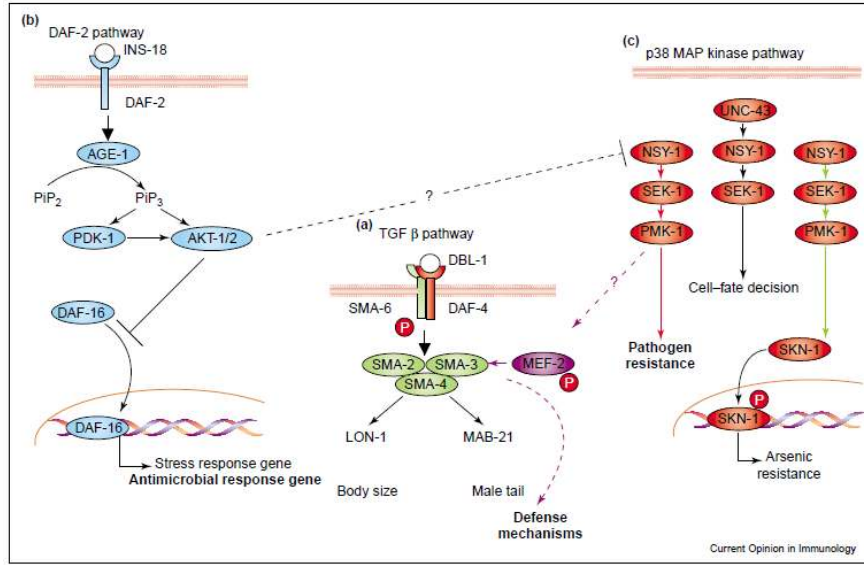
TGF- β yolağı: *C. elegans*'ta enfeksiyon sonrasında LYS-1, LYS-7, ve LYS-8 lektin ve lizozimleri üretilir. Lys-1'in aşırı ifadesi sonucu *S. marcescens*'e karşı direnç artırılır (Millet ve Ewbank 2004). Diğer bir lizozim olan LYS-8 TGF- β büyüme faktörünü kodlayan *dbl-1* tarafından kontrol edilir (Mochii vd 1999). *Dbl-1* mutantları bakteri enfeksiyonuna karşı aşırı duyarlıdır (Millet ve Ewbank 2004).

Daf yolağı: Büyümede ve yaşlanmada önemli rol oynayan daf yolağı bağışıklık sistemi için de gereklidir. Daf-2 mutantlarında bakteri taşıma kapasiteleri yabani tipe göre daha düşüktür. Bu mutantlarda antibakteriyel lizozimleri kodlayan *lys-7* ve *lys-8* genlerinin ifadesinin azaldığı görülmüştür (Murphy vd 2003). *Lys-7* ve *lys-8*, *daf-16* hedefleridir. Daf-16'nın diğer hedefleri detoksifikasyon, oksidatif strese direnç, anti stres mekanizmalarıdır. Daf-2 mutantlarında bu genler upregüle edilmiştir (arttırılmıştır). Böylece enfeksiyonlara, yüksek ısıya, ultraviyole ışınlar, hipoksiye, ağır metallerle karşı direnç gösterip uzun yaşamaktadırlar (Millet ve Ewbank 2004).

MAPK yolağı: Tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. Uyararla aktive olan MAPK yolağı hücrelerin çoklu ve farklı uyarılara karşı cevap vermesini sağlar. Memelilerde bulunan MAPK yolağı, büyüme faktörleri, hormonlar, tümör nekroz faktör sitokinleri ve osmotik basınç, radyasyon, iskemik hasar gibi çevresel streslerle birlikte aktive olabilmektedir (Krishna ve Narang 2008). MAPK yolağının düzenlenmesinde sorun çıktığında kanser, beyin ve bağışıklık sisteminde hasar görülebilmektedir (Gerits vd 2007, Wagner ve Nebrada 2009).

C. elegans'taki pek çok nöron bilateral simetrik yapıdadır. Nys-1 geni bu simetrik yapıyı sağlamaktadır. Bunun yanında nys-1, sek-1 ve pmk-1 genleri ile birlikte *C. elegans*'ın bağırsak bağışıklığında da etkilidir. Bunların yanında unc-43'te meydana gelen mutasyonların etkisi henüz anlaşılabilmiş değildir (Sakaguchi vd 2004).

C. elegans ve patojen *P. aeruginosa* türleriyle yapılan bağışıklık çalışmalarında *Bacillus megaterium* ve *Pseudomonas mendocina* bakterilerinin koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu bakteriler p38 MAPK kaskadının merkezine etki ederek nematodun yaşamını sürdürmesini sağlamıştır (Petersen vd 2015).



Şekil 2.12. *C. elegans* bağırsak bağışıklığında bakteri enfeksiyonuna karşı savunma yapan üç önemli yolak a) TGF β yolağı (TGF β homoloğu DBL-1 heterodimerik reseptör SMA-4/DAF-16'ya bağlanır. Smad proteinleri SMA-2, SMA-3, SMA-4'e sinyal gönderir. Savunmanın yanında bu yolak vücut uzunluğunun düzenlenmesinde LON-1 proteini ile erkek kuyruğunun gelişmesinde MAB-21 proteini ile etkilidir. Bunların yanında MEF-2 transkripsiyon faktörünün fonksiyonu henüz bilinmemektedir.) b) Daf-2 yolağı (Daf-2 reseptörü ligandı INS-18 bağlandığında fosfatidilinositol-3-OH kinaz AGE-1'i aktive eder. AGE-1 fosfatidilinositol bifosfatın (PiP₂) fosfatidilinositol trifosfata (PiP₃) dönüşmesini katalize eder. PiP₃ AKT-1/AKT-2 (AKT-1/2) kompleksine bağlanır. Aynı anda PDK-1 kinazı PiP₃ tarafından fosforlanır ve AKT-1/2 kompleksini aktive eder. Daf-2 negatif mutantlarında bu yolak aktif değildir. Daf-16 fosforlanamaz ve antimikrobiyal genlerin çalışması için nukleusa taşınır. Lizozim geni lys-8, DBL-1/TGF-B ve daf-2 yolağının kontrolü ile ifade edilir.) c) p38 MAPK yolağı (Enfeksiyon ve strese karşı direnç sağlayan diğer bir yolak p38 MAPK yolağıdır. PMK-1 memeli p38 MAPK ile homologtur. Bu yolaktaki NYS-1/MAPK kinaz ve SEK-1/MAPK kinaz nöronlarda Ca⁺² kalmodulin bağımlı protein kinaz II unc-43 geni tarafından kontrol edilir. NYS-1-SEK-1-PMK-1 yolağı patojene karşı direnci unc-43'ten bağımsız olarak düzenlemektedir. NYS-1-SEK-1-PMK-1 SKN-1 ile birlikte arsenik direncinde görev alır. Patojen direnci için SKN-1 proteinine gerek duyulup duyulmadığı henüz belirlenememiştir. Bu üç yolağın bir noktada birbiri ile ilişki içinde olabileceği düşünülmektedir. AKT'nin NYS-1'i fosforlayarak negatif etki göstermesini sağladığı düşünülmektedir.) (Millet ve Ewbank 2004'den uyarlanmıştır)

C. elegans 'ta MAPK yolağı nöronal hücre gelişiminde, patojenlere karşı dirençte ve stres yanıtında çalışmaktadır. Tir-1 geni *C. elegans*'ın patojene karşı dirençte ve nöronal gelişimde gerekli olan gendir. Burada hangi bileşenlerin aynı anda nöronal gelişim ve bağışıklıkta birlikte rol aldığı bilinmemektedir. Nükleer translokasyonun transkripsiyon faktörü SKN-1 in PMK tarafından fosforile edilmesiyle gcs-1 geni ifade edilmesiyle ve strese karşı yanıt oluştuğu bilinmektedir (Sakaguchi vd 2004, Inoue vd 2005).

Son yıllarda daha uzun olmasa da en azından daha sağlıklı bir insan ömrü garantilemek için öncelikle biyolojik yaşlanmanın altında yatan nedenleri araştırmak ve daha sonra bu nedenlere müdahale yöntemleri geliştirmek gerçek bir bilimsel amaç olmuştur. Bu amaçla da pek çok model organizma kullanılarak çok değişik deney tasarımları yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir.

Bizim çalışmamızda uzun ömürlülük içkisi olarak bilinen kefirin (dane ve kültür çeşitleri), model organizmamız *C. elegans*'ın besini olarak kullanıldığında nasıl bir etki göstereceği araştırılmıştır. Strese verilen organizmal cevabın uzun ömürlülükle ilişkili olmasından dolayı çalışmamızda ısı stresi uygulaması ve ölene kadar takip olmak üzere iki grup çalışma yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca verilerimizi yorumlarken ortalama ve maksimum ömür uzunluğu hesaplamaları yapılması planlanmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Malzemeler

3.1.1. Reaktifler

C. elegans'ın yaşam ortamı olan NGM (Nematod Büyüme Ortamı)'ın hazırlanması için; Agar (Merck), NaCl (Merck), Bacto-peptone (Merck), MgSO₄ (Merck), Etanol (Merck), Kolesterol (Amresco), CaCl₂ (Merck), KH₂PO₄/K₂HPO₄ tamponları (Merck), OP50 bakterisinin üretilmesi için Bacto Tryptone (Merck), Yeast Extract (Merck), yumurtaların erginleşmesini önlemek için FUDR (Fluorodeoxyuridine) (Alfa Aesar) kullanıldı. Mikrobiyolojik analizler için; Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck), Plate Count Agar (PCA) (Merck), Yeast Extract Glucose (YGC) Agar (Merck), Violet Red Bile (VRB) Agar (Merck), M17 Agar (Merck) kullanıldı.

3.1.2. Petri kapları

Deneylerde IsoLab firmasına ait 85 mm çaplı petri kapları kullanıldı.

3.2. *Caenorhabditis elegans* Kültürünün Sürdürülmesi

Tüm *Caenorhabditis elegans* çalışmaları www.wormbook.org'da yer alan uygulamalara göre gerçekleştirildi. *C.elegans* laboratuvar koşullarında *Escherichia coli* bakterisinin OP50 suşu ile beslenerek yaşamını devam ettirir (Brenner 1974). NGM'li petrilerin üzerine *E.coli* OP50 (9,52 log/kob/ml) eklendi, kuruması beklendi ve yaş gruplarına göre senkronize edilen *C.elegans* transferi yapıldı. *C. elegans* kültürleri 20°C'lik NÜVE ES 120 model ısıtmalı-soğutmalı inkübatörde sürdürüldü. Takip ve sayımlar Soif Optical Instruments marka stereo mikroskopta yapıldı.

3.3. *C. elegans*'ın Alımı

Çalışma için N2 (yabanıl tip) Bristol suşu *C. elegans* ve *Escherichia coli* OP50 suşu "Caenorhabditis Genetic Center at the University of Minnesota"'dan satın alındı.

3.4. NGM (Nematod büyüme ortamı) Hazırlanması

C. elegans'ın yaşama ortamı olan NGM'in hazırlanması için; 3 g NaCl, 2,5 g pepton, 17 g agar dH₂O ile 1L'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Otoklav işleminden sonra 25 ml 1 M KH₂PO₄, 1 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 1 M CaCl₂ ve 1 ml 5mg/ml kolesterol eklendi. Tüm maddeler karıştırıldıktan sonra 85 mm'lik petrilere döküldü ve soğumaya bırakıldı.

Ömür uzunluğu deneyinde kurtçukların yumurtlayıp yeni nesil ile karışmaması için NGM hazırlanırken içine 5-Fluoro-2'-deoksiüridin (FUDR) eklendi. 25 mM FUDR stok hazırlamak için 153,8 mg FUDR 25 ml distile suda çözündürüldü.

Peride katılaşmış NGM üzerine, LB (lutrient broth) içinde çoğaltılan *E. coli OP50* bakterisi kontrol grubu olarak ve denediğimiz dane kefir ve kültür kefirler 100 µl olacak şekilde damlatıldı ve kurumaya bırakıldı, yani bir besin çimenliği oluşturuldu. Kuruyan besin üzerine kurtçuklar aktarıldı ve canlılık takibi yapıldı.

3.5. Yumurta Toplama İşlemi

Yumurta toplama ile tüm kurtçukların aynı yaş grubuna göre senkronize bir şekilde büyümeleri sağlanır. İzolasyon işlemi için petri kaplarında bulunan kurtçuklar ve yumurtaları 3,5 ml steril saf su ile toplandı. Kurtçuklar su ile birlikte 15 ml'lik santrifuj tüplerine alındı. Hemen ardından üzerine taze hazırlanmış 0,5 ml 5 N NaOH ve 1 ml çamaşır suyu karışımı eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 2 dakikada bir 10 saniye boyunca vortekslendi. Bu işlem 5 kere tekrarlandı. Vorteks işleminden sonra tüpler 3500 rpm de 30 saniye santrifuj edildi. Santrifuj sonrasında çökeltiye dokunulmadan 1 ml seviyesine kadar dökelti alınıp atıldı, tüpe 1 ml steril distile su eklendi, pipetaj yapıldı, tekrar 3500 rpm de santrifuj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak yıkama yapıldı. Santrifuj işlemi tamamlandıktan sonra tüpte 0,5 ml sıvı kalacak şekilde dökelti atıldı. Çökeltiye nazıkçe pipetleme yapıldı, kurtçuk yumurtaları pastör pipetiyle besiyerine damlalar halinde bırakıldı.

3.6. Kefir Alımı

Dane kefir Adeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laborauvarı'ndan alındı. Kültür kefir liyofilize halde Danisco (Danimarka) marka olarak Türker Endüstri Teknik Makine ve Tic. Ltd. Şti.'nden alındı.

3.7. Dane Kefirin Hazırlanması

Yüzde 3 oranında tartılmış kefir daneleri 25°C'deki pastörize inek sütü içine konularak fermentasyon başlatıldı. Fermantasyon 25°C'de yarı karanlık ortamda sürdürüldü. Fermantasyon sürecinde pH takibi yapıldı. İnsan tüketimi için en uygun değer olan pH 4,6 seviyesine geldiğinde fermantasyon durduruldu. Kefir danesi süzülerek bir sonraki kullanım için ayrıldı. Dane kefir, her gerekli olduğunda tartılıp sütün içine konularak istenildiği miktarda kefir istenildiği günde üretildi.

Fermantasyon sonucu istenilen pH seviyesine ulaşan kefirler 15 ml'lik santrifuj tüplerine alınarak 2000 rpm'de 30 sn santrifuj yapıldı. Elde edilen berrak dökeltiilerden NGM'li petrilere aktarılarak ekimler gerçekleştirildi. Çökeltinin içerisinde kazein

bulunması mikroskop altında opak bir görüntüye neden olarak mikroskop altında birey sayımını engellediğinden çökelti kullanılmadı.

3.8. Kültür (Starter) Kefirin Hazırlanması

Kültür kefir üretimi için 1 L pastörize inek sütüne 0,005 g liyofilize kefir eklendi ve fermantasyon başlatıldı. Fermantasyon 25°C’de yarı karanlık ortamda sürdürüldü. Fermantasyon sürecinde pH takibi yapıldı. İnsan tüketimi için en uygun değer olan pH 4,6 seviyesine geldiğinde fermantasyon durduruldu. Kültür kefirde dane kefirde olduğu gibi dane yapısı gözlenmediğinden herhangi bir süzme işlemi yapılmadı. Bu nedenle bu kefirde yeni kültür mayalaması yapılmadı, her seferinde liyofilize kültür tartılarak işlem tekrarlandı.

Fermantasyon sonucu istenilen pH seviyesine ulaşan kefirler 15 ml’lik santrifuj tüplerine alınarak 2000 rpm’de 30 sn santrifuj yapıldı. Elde edilen dökelti ile NGM’li petrilere ekimler gerçekleştirildi. Çökeltinin içerisinde kazein bulunması mikroskop altında opak bir görüntüye neden olarak mikroskop altında birey sayımını engellediğinden yine çökelti kullanılmadı.

3.9. Isı Stresi (Termotolerans) Deneyi

C. elegans’lar senkronize edildikten sonra genç yetişkin olduklarında *E. coli*, kültür kefir ve dane kefir bulunan petrilere aktarıldı. Petriler 20°C’ye ayarlı inkübatörde 24 saat maruziyete (beslenmeye) bırakıldı. Bir gün sonunda petriler 37°C’ye ayarlı etüve kaldırıldı. Her iki saatte bir olmak üzere canlı-ölü sayımı yapıldı. Ölü kurtçuklar öze ile alınarak uzaklaştırıldı. Sayıma bütün kurtçuklar ölüp petriden uzaklaştırılana kadar devam edildi. Çalışmaya *E.coli* de 298 birey, kültür kefirde 295, dane kefirde 298 bireyle başlandı, petrilere kaçan kurtçuklar sayım dışı tutuldu. Çalışma iki kez yedişer tekrarlı olmak üzere gerçekleştirildi.

3.10. Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi Deneyi

Normal sıcaklığı yaşam süresi deneyi *C. elegans*’ın yaşam süresi boyunca 20°C’ye ayarlı inkübatörde gerçekleştirildi. Her gün aynı saatte canlı-ölü kurtçuk sayımı yapılarak, ölenler öze yardımıyla uzaklaştırıldı. *E. coli*’de 267, kültür kefirde 121, dane kefirde 280 birey ile deneye başlandı, petriden kaçan kurtçuklar sayıma dahil edilmedi.

Yeni nesillerin birbirleriyle karışarak deney doğruluğunu ve sayımı etkilememesi adına ömür uzunluğu deneylerinde embriyo gelişimi ve yumurtaların çatlaması engellenmelidir. Bu nedenle besiyeri hazırlanırken içine 10 µg/ml FUDR (5-Fluoro-2’-deoxyuridine) eklendi. FUDR DNA sentezini inhibe ederek embriyo gelişimini engelledi. Çalışma üç kez yedişer tekrarlı olmak üzere gerçekleştirildi.

3.11. Mikrobiyolojik Analizler

Çalışılan kefir örnekleri içerisinde bulunan mikroorganizmaların grup çeşitleri ve bunların yoğunluklarını (koloni oluşturan birim (kob)) bulmak amacıyla tüm mikrobiyolojik analizler Ebner vd (2015) metoduna göre yapıldı.

Mikrobiyolojik analizler *E. coli* ve her iki kefir örneği için kültürel sayım yöntemine göre yapıldı. Kob sayımını kolaylaştırmak amacıyla seyreltmeler (dilüsyonlar) Ringer solüsyonu ile yapıldı. Ringer solüsyonunu hazırlamak için 1 adet ringer tableti (Merck) 500 ml distile suda çözündürüldü. Bu çözelti 9 ml olacak şekilde steril cam tüplere bölündü. Dilüsyonlar bir seri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} olacak şekilde hazırlandı. Her bir dilüsyondan çift ekim yapıldı.

3.11.1. *E. coli* sayımı

E. coli sayımı için LB Agar besiyerine dökme plak yöntemi ile 10^{-5} - 10^{-8} dilüsyonlu bakteri ekimi yapıldı, 37°C 'de 1 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldı ve fotoğraflandı ve mililitredeki ortalama kob sayısı hesaplandı.

3.11.2. Laktobasil sayımı

Laktobasil sayımı için Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (pH 6,5) besiyerine dökme plak yöntemi ile 10^{-3} - 10^{-7} dilüsyonlu kefirlerin ekimi yapıldı. 30°C 'de 3 gün süre ile anaerobik kavanoz ve içerisinde aneorocult (oksijensizleştirici) bulunan ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldı, fotoğraflandı ve mililitredeki ortalama kob sayısı hesaplandı.

3.11.3. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için Plate Count (PCA) Agar besiyerine dökme plak yöntemi ile 10^{-3} - 10^{-7} dilüsyonlu kefirlerin ekimi yapıldı, 30°C 'de 2 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldı, fotoğraflandı ve mililitredeki ortalama kob sayısı hesaplandı.

3.11.4. Laktokok sayımı

Laktokokların sayımı için M17 Agar (Merck) besiyerine dökme plak yöntemi ile 10^{-3} - 10^{-7} dilüsyonlu kefirlerin ekimi yapıldı, 30°C 'de 3 gün süre ile anaerobik kavanoz ve içerisinde aneorocult bulunan ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldı, fotoğraflandı ve mililitredeki ortalama kob sayısı hesaplandı.

3.11.5. Maya sayımı

Maya sayımı için Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar besiyerine yayma plak yöntemi ile 10^{-1} - 10^{-3} dilüsyonlu kefirlerin ekimi yapıldı, 25°C’de 3 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldı, fotoğraflandı ve mililitredeki ortalama kob sayısı hesaplandı.

3.11.6. Patojen kontrolü (koliform bakteri sayımı)

Kefirde patojenin var olup olmadığını araştırmak için Violet Red Bile (VRB) Agar besiyerine yayma plak yöntemi ile 10^{-1} dilüsyonundan ekim yapıldı, 25°C’de 5 gün süre ile inkübe edildi.

3.12. İstatistiksel Analiz

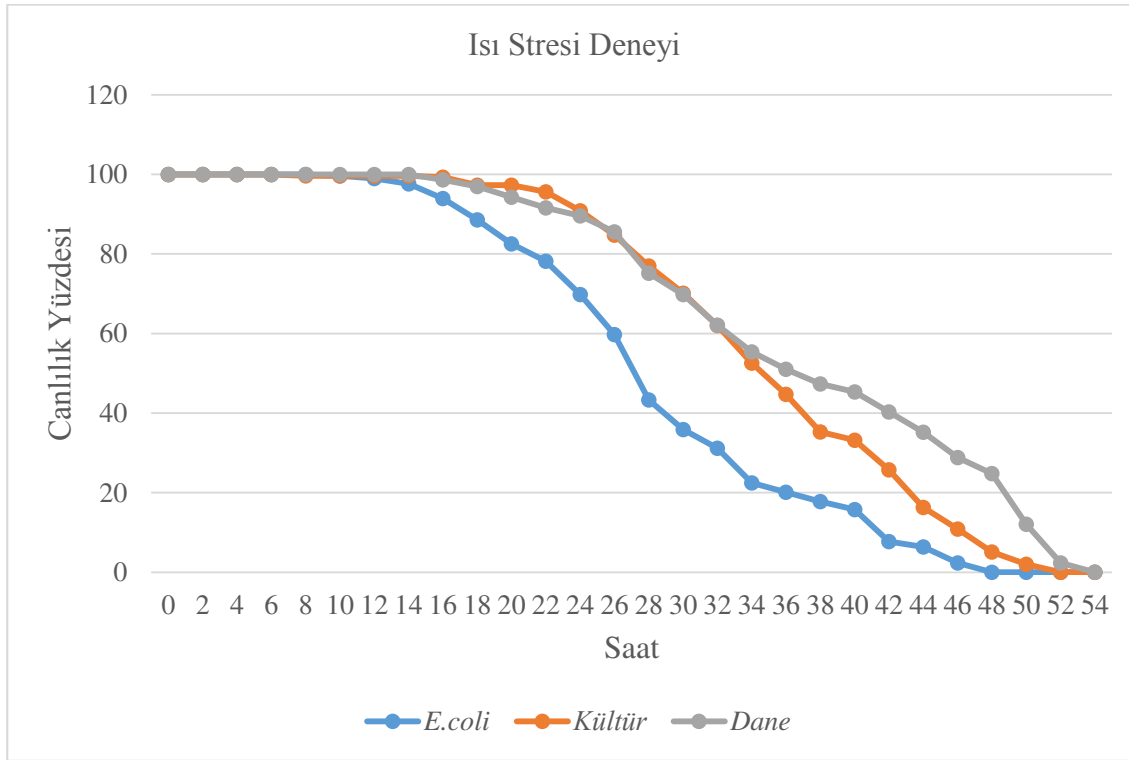
Deney sonuçlarından elde edilen verilerde, kontrol grubu ve deney grubu arasındaki farklılık Tek Yönlü Varyasyon Testi (ANOVA) kullanılarak IBM SPSS Statistic programı 20 sürüm kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafikler Microsoft Office Excel 2013 programında çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Isı Stresi (Termotolerans) Deneyi

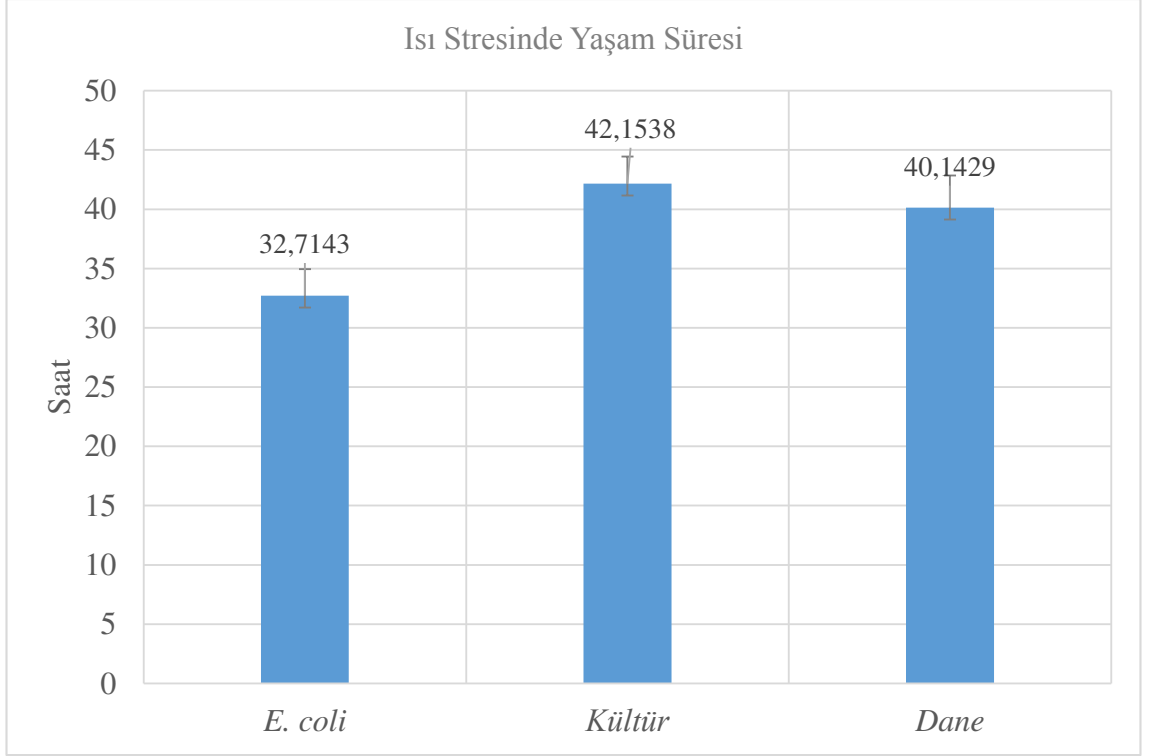
4.1.1. Kültür kefir ve dane kefirin termotoleransta yaşam süresine etkisi

E. coli, kültür ve dane kefir ile üç grup halinde gerçekleştirilen termotolerans deneyinde kontrol grubu *E. coli*'de 298 birey, kültür kefir grubunda 292 birey ve dane kefir grubunda 298 birey kullanmıştır. Petriden kaçan kurtçuklar sayıma dahil edilmemiştir. Sonuçların yüzde değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Isı stresi deneyinde *C. elegans* canlılık grafiği

Yapılan termotolerans deneyinde *E. coli* grubunda ortalama yaşam uzunluğu 32 saat, kültür kefir grubunda ortalama yaşam uzunluğu 42 saattir ve dane kefir grubunda ortalama yaşam uzunluğu 40 saattir (Çizelge 4.2). Kontrol grubu ve kefir grupları karşılaştırıldığında her iki kefir türünde de anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir. Yapılan varyans analizine göre *E. coli* ve kültür kefir $p < 0,01$ düzeyinde anlamlılık gösterirken *E. coli* ve dane kefir $p < 0,035$ düzeyinde anlamlılık göstermiştir. Bu çalışmada maksimum yaşam süresi kültür kefir ile % 29.62, dane kefirle ise % 22.2 artış göstermiştir.

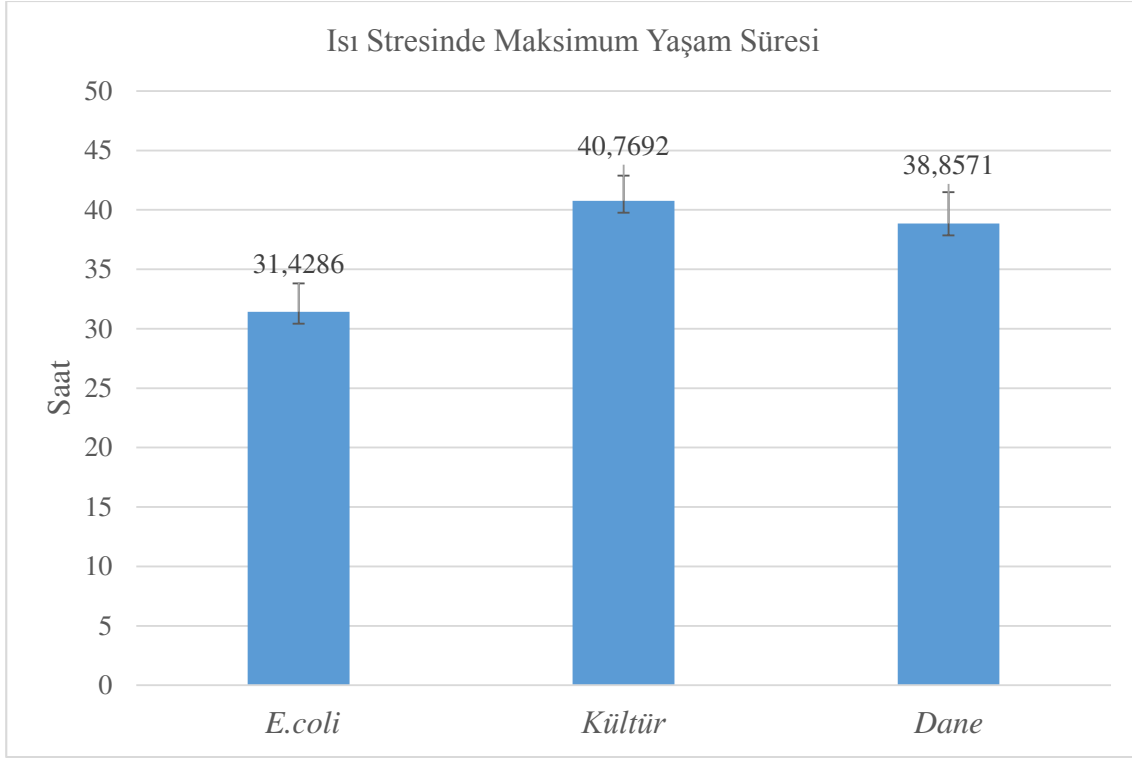


Şekil 4.2. Isı stresi deneyi sonucu ortalama yaşam süresi gösterimi

4.1.2. Isı stresi deneyinde maksimum yaşam süresi

Isı stresi altında kurtçukların ortalama yaşam süresi haricinde bir de maksimum yaşam süresi hesabı yapıldı. Maksimum yaşam süresinin hesaplanması için ısı stresine maruz bırakılan kurtçukların yalnızca en son ölen yüzde 10'luk grubu ele alındı ve bunların ömür uzunluğu ayrıca hesaplandı.

Yapılan termotolerans deneyinde *E. coli* grubunda maksimum yaşam süresi 31 saat, kültür kefir grubunda maksimum yaşam uzunluğu 40 saat ve dane kefir grubunda maksimum yaşam uzunluğu 38 saattir (Şekil 4.3). Kontrol grubu ve kefir grupları karşılaştırıldığında her iki kefir türünde de anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. Yapılan varyans analizine göre *E. coli* ve kültür kefir $p < 0,01$ düzeyinde anlamlılık gösterirken *E. coli* ve dane kefir $p < 0,033$ düzeyinde anlamlılık gösterdi. Bu çalışmada *C. elegans*'daki maksimum yaşam süresi kültür kefir ile beslenenlerde % 29.03, dane kefirle beslenenlerde ise % 22.58 artış gösterildi.

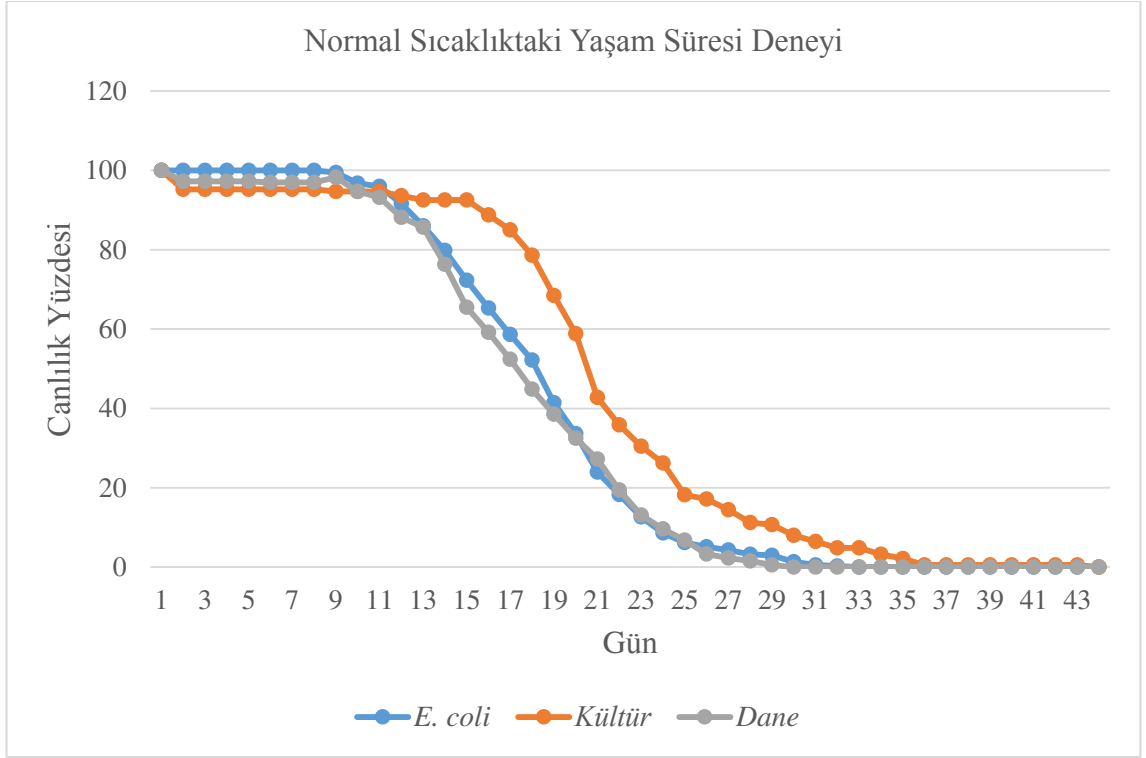


Şekil 4.3. Isı stresi deneyi maksimum ömür uzunluğu süresi gösterimi

4.2. Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi Deneyi

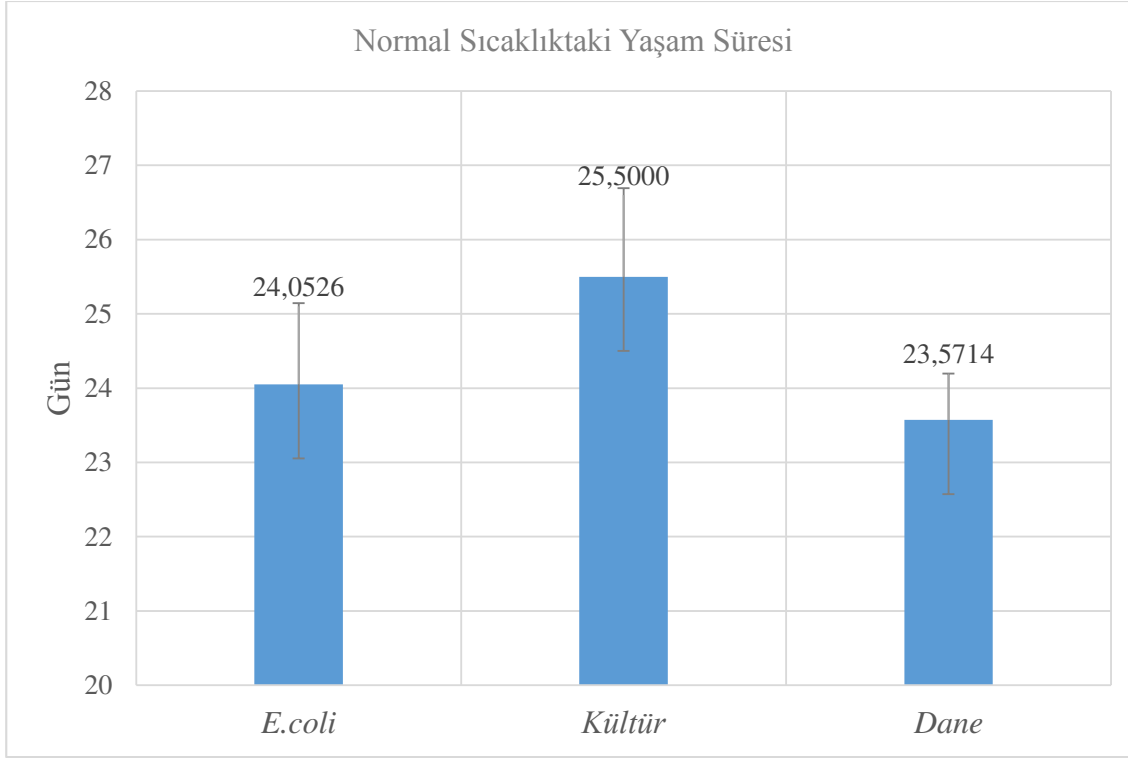
4.2.1. Kültür kefir ve dane kefirin ortalama yaşam süresine etkisi

Kültür kefir ile gerçekleştirilen yaşam süresi deneyinde kontrol grubu *E. coli*'de 372 birey, kültür kefir grubunda 187 ve dane kefir grubunda ise 397 birey kullanıldı. Petriden kaçan kurtçuklar bu sayıma dahil edilmedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde *C. elegans* canlılık grafiği

Yapılan ömür uzunluğu deneyinde *E. coli* grubunda ortalama yaşam uzunluğu 24 gün, kültür kefir grubunda ortalama yaşam uzunluğu 25 gün ve dane kefir grubunda ortalama yaşam uzunluğu 23 gündür (Şekil 4.5). Yapılan varyans analizine göre gruplar arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. Bu çalışmada yaşam süresi kültür kefir ile % 4.16 artarken dane kefirle % 4.16 azalma gösterdi. Ancak ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.

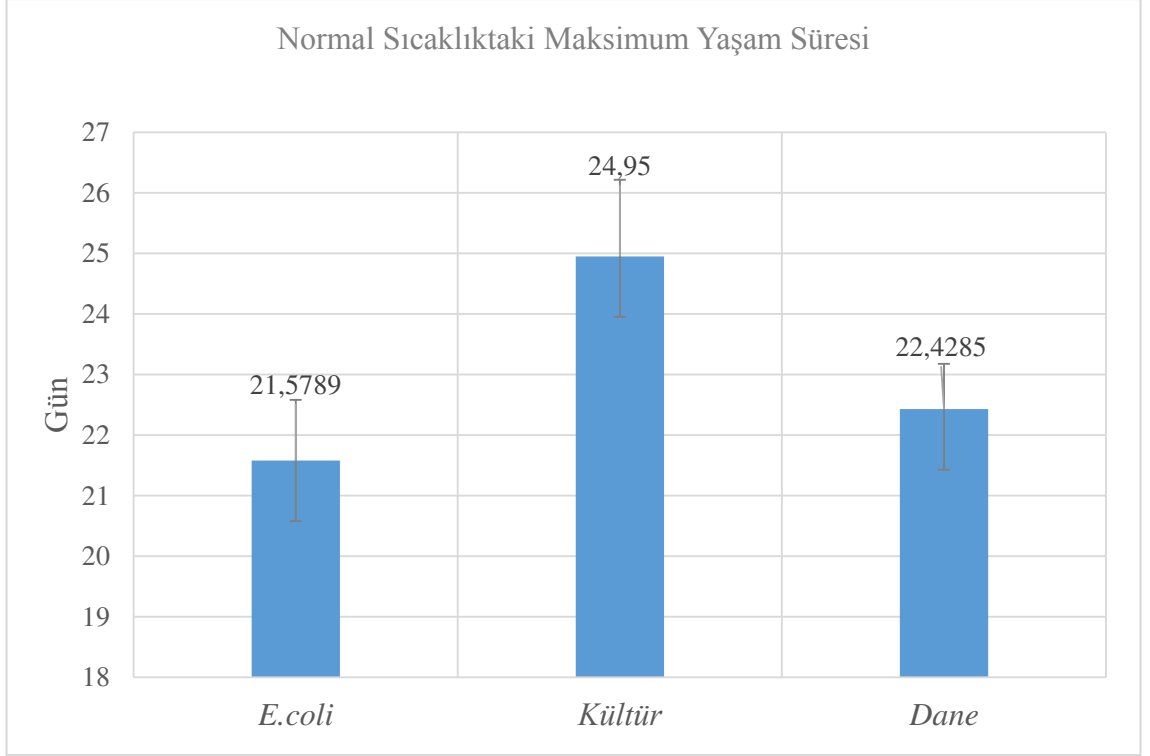


Şekil 4.5. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde ortalama yaşam süresi gösterimi

4.2.2. Normal sıcaklıktaki maksimum yaşam süresi

Kurtçukların ortalama yaşam süresi haricinde bir de maksimum yaşam süresi hesabı yapılmıştır. Maksimum yaşam süresinin hesaplanması için kurtçukların yalnızca en son ölen yüzde 10'luk grubu ele alındı ve bunların ömür uzunluğu ayrıca hesaplanmıştır.

Yapılan ömür uzunluğu deneyinde *E. coli* grubunda maksimum yaşam uzunluğu ortalaması 21 gün, kültür kefir grubunda maksimum yaşam uzunluğu 24 gün ve dane kefir grubunda maksimum yaşam uzunluğu 22 gün olarak bulunmuştur (Şekil 4.6). Yapılan varyans analizine göre gruplar arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışmada maksimum yaşam süresi kültür kefir ile % 14.28, dane kefirle ise % 4.76 artış göstermiştir.



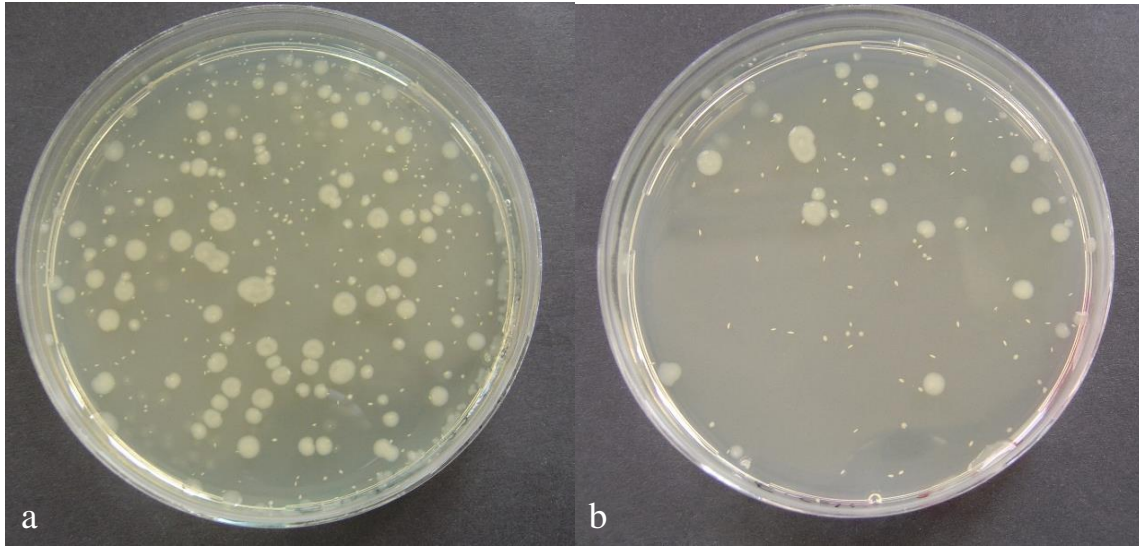
Şekil 4.6. Normal sıcaklıktaki yaşam süresi deneyinde maksimum yaşam süresi gösterimi

4.3. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Yapılan analizler sonucu petrilerde oluşan koloniler sayıldı. 30 ile 300 arası koloni barındıran petriler sayıma dahil edildi. İki paralel halinde bulunan petrilerin koloni sayılarının ortalaması alındı. Alınan ortalamalar dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra logaritmik değerleri bulunarak koloni oluşturan birim (kob) sayısı hesaplandı. Daha sonrada kob sayısı hesaplanan farklı dilüsyonların ortalaması hesaplandı.

4.3.1. *E. coli* sayım sonuçları

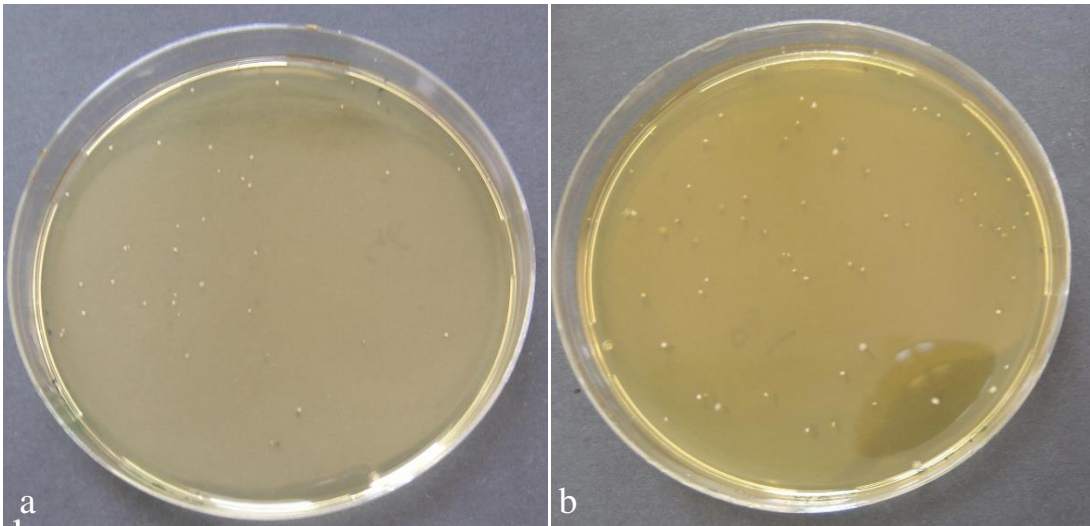
E. coli sayımı için LB agar üzerinde yapılan bakteri sayımında en düşük log kob/ml değeri 9,13, en yüksek log kob/ml 9,91 ve ortalama log kob/ml değeri 9,52 olarak bulunmuştur. Sayım yapılan petrilerin görüntüsü Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. *E. coli*'nin LB agar üzerindeki koloni oluşumu. a) 7. dilüsyon koloni oluşumu, kob= 9,13 b) 8. dilüsyon koloni oluşumu, kob= 9,91

4.3.2. Laktobasil sayım sonuçları

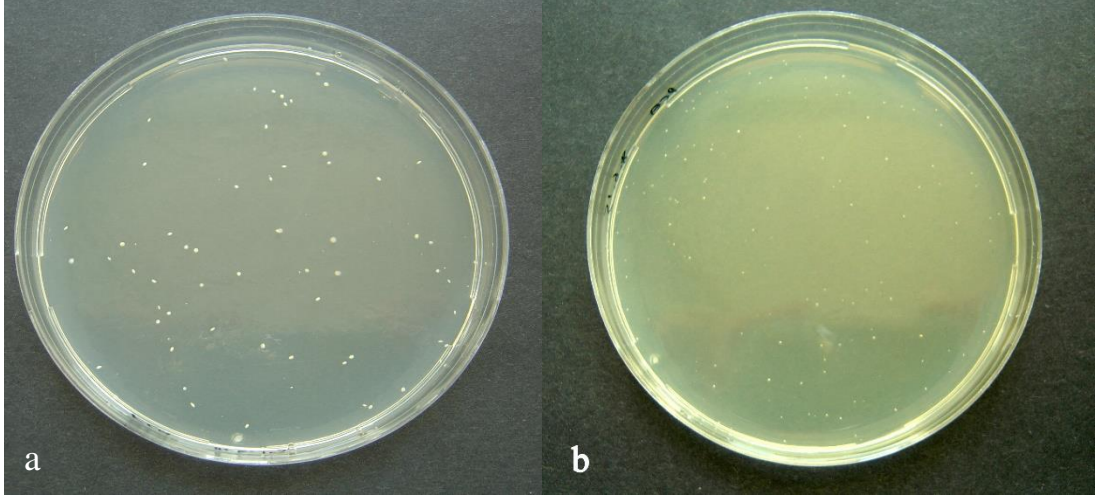
Laktobasil sayımı için MRS agar üzerinde dane kefir ile yapılan bakteri sayımında en düşük log kob/ml değeri 7,35, en yüksek log kob/ml değeri 8,75 ve ortalama log kob/ml değeri 8,01 olarak bulunmuştur. Starter kefir ile yapılan bakteri sayımında hesaplanabilir olan tek dilüsyondan log kob/ml değeri 6,66 bulunmuştur. Sayım yapılan petrilerin görüntüsü Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Starter ve dane kefirin MRS agar üzerindeki laktik asit bakterilerinin koloni oluşumları. a) Starter kefir 5. dilüsyon koloni oluşumu kob=7,35 b) Dane kefir 5. dilüsyon koloni oluşumu, kob= 6,66

4.3.3. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayım sonuçları

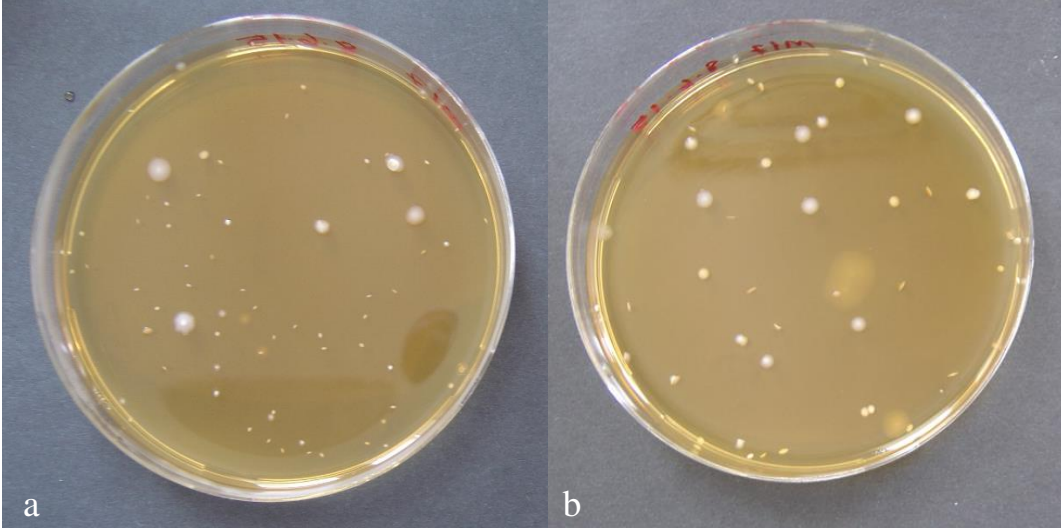
Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için PCA agar üzerinde dane kefir ile yapılan bakteri sayımında en düşük log kob/ml değeri 6,35, en yüksek log kob/ml değeri 8,06 ve ortalama log kob/ml değeri 7,31 olarak bulunmuştur. Starter kefir ile yapılan bakteri sayımında hesaplanabilen tek dilüsyondan log kob/ml değeri 4,83 bulunmuştur. Sayım yapılan petrilerin görüntüsü Şekil 4.9.'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Starter ve dane kefirin PCA agar üzerindeki koloni oluşumları. a) Starter kefir 3. dilüsyon koloni oluşumu, kob=4,83 b) Dane kefir 4. dilüsyon koloni oluşumu, kob=6,35

4.3.4. Laktokok sayım sonuçları

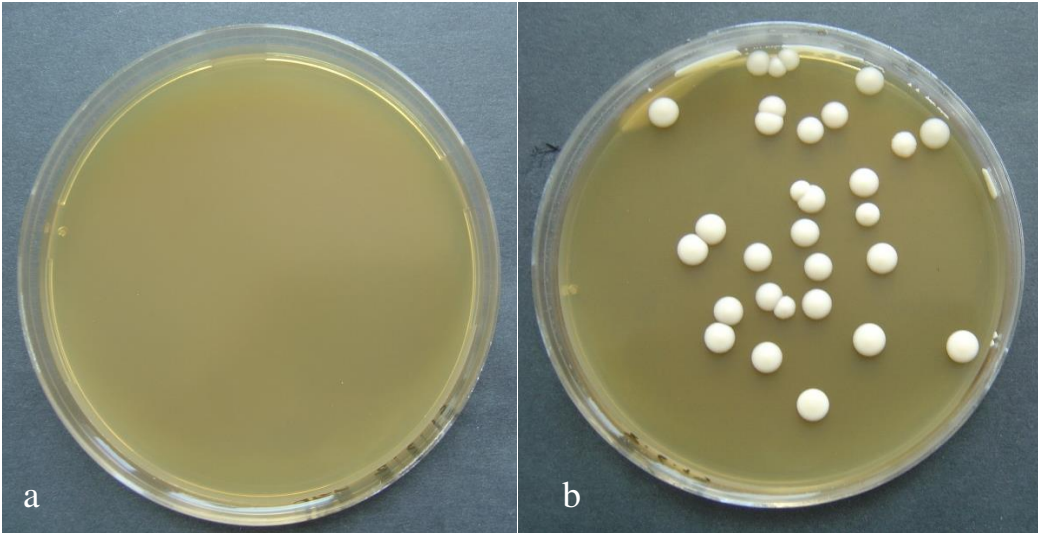
Laktokok bakteri sayımı için M 17 agar üzerinde dane kefir ile yapılan bakteri sayımında en düşük log kob/ml değeri 6,38, en yüksek log kob/ml değeri 8,50 ve ortalama log kob/ml değeri 7,41 olarak bulunmuştur. Starter kefir ile yapılan bakteri sayımında hesaplanabilen tek dilüsyondan log kob/ml değeri 6,88 bulunmuştur. Sayım yapılan petrilerin görüntüsü Şekil 4.10.'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Starter ve dane kefirin M17 agar üzerindeki koloni oluşumları. a) Starter kefir 5. dilüsyon koloni oluşumu, kob=6,88 b) Dane kefir 6. dilüsyon koloni oluşumu, kob=7,64

4.3.5. Maya sayım sonuçları

Maya sayımı için YGC agar üzerinde dane kefir ile yapılan bakteri sayımında yalnızca 1. dilüsyondan yapılan petrilerde sayım yapılabilmektedir. YGC agar üzerindeki log kob/ml değeri 3,46 olarak bulunmuştur. YGC agar üzerinde starter kefir ile yapılan ekimde koloni oluşumu gözlenmemiştir. Sayım yapılan petrilerin görüntüsü Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Starter ve dane kefirin YGC agar üzerindeki koloni oluşumları. a) Starter kefir 1. dilüsyon koloni oluşumu, kob=0 b) Dane kefir 1. dilüsyon koloni oluşumu, kob=3,46

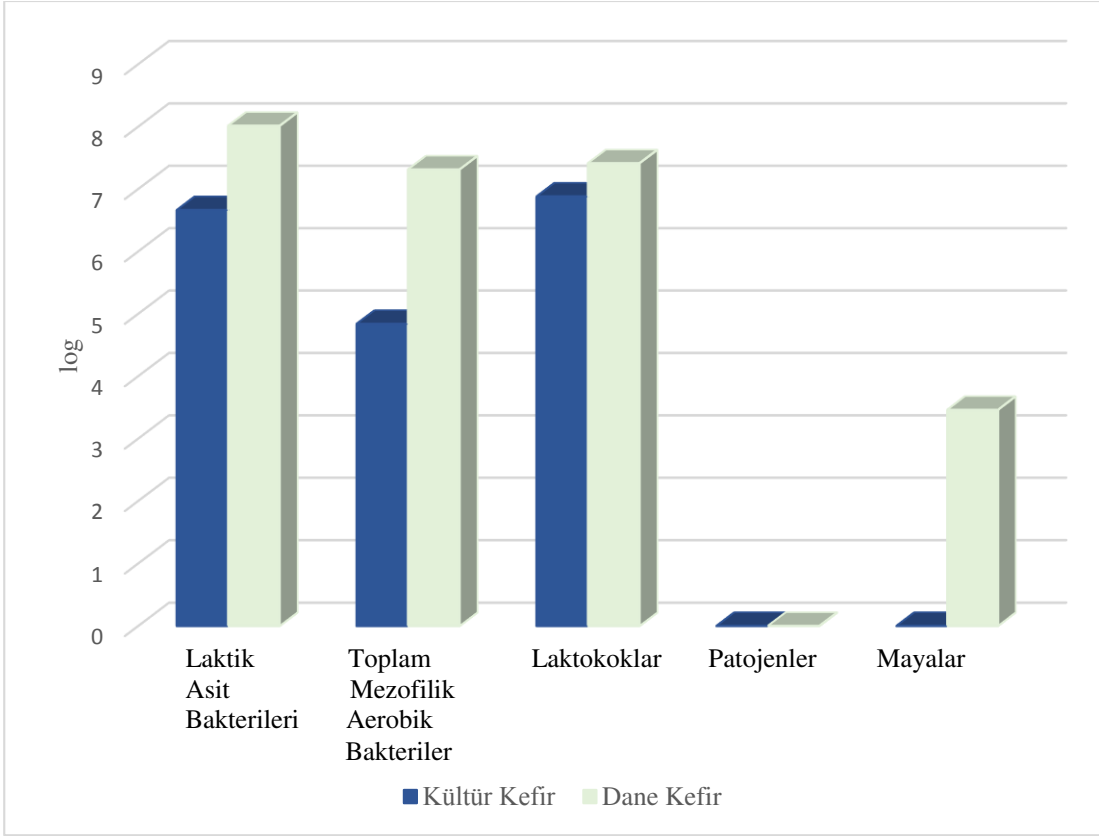
4.3.6. Patojen kontrolü (koliform bakteri sayımı) sonuçları

Dane kefir ve kültür kefir üretiminde gelişebilecek olası kontaminasyonları gözlemlemek amacıyla VRB agar ile yapılan testte herhangi bir koliform bakteri grubuna rastlanmamıştır.

Yapılan analizde kefir örneklerinde belirlenen laktobasil, toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, koliform bakteri ve maya sayımlarının logaritmik değerleri Çizelge 4.1.'te ve log değerlerin ortalamaları Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Dane kefir ve kültür kefirin mikrobiyolojik analiz sonuçlarını (log kob/ml)

	Kültür Kefir	Dane Kefir
Laktik Asit Bakterileri	6,662	8,013
Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri	4,838	7,313
Laktokoklar	6,880	7,412
Patojenler	0	0
Mayalar	0	3,46



Şekil 4.12. Kültür ve dane kefirlerdeki laktik asit bakterileri, toplam mezofilik aerobik bakteriler, laktokoklar, koliform bakteriler ve mayaların kob değerleri (log₁₀).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, yaşlanma, ısı stresi ve ömür uzunluğu araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir model organizma olan *C. elegans* 'ta bir besin maddesi olan kefirin etkileri araştırılmıştır. Geleneksel halk sağlığında adından sıkça bahsedilen ve uzun ömürlülük içkisi denilen kefirin, gerçekten böyle bir etkisinin olup olmadığına bir yaklaşım getirmek amacıyla *in vivo* deneyler tasarlanmıştır. Literatürde kefir ile yapılan çalışmaların çok sayıda olmasına karşın, bu çalışmaların çoğunluğunun kefirin bir içecek olarak bileşimi ve kalitesine yönelik olduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışmada, geleneksel kefir olarak bilinen dane kefir ile endüstriyel olarak üretilen kültür kefirin *C. elegans* ısı stresi altındayken (37°C) ve normal sıcaklıktayken (20°C) ömür uzunluğu üzerine etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, *C. elegans*'ın ısı stresine gösterdiği direncin kültür kefir ve dane kefir gruplarında kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Kontrole (*E. coli*) karşı kültür kefir karşılaştırmasındaki istatistiksel anlamlılık $p<0,01$ değeri ile oldukça güvenilir bir sonuç vermiştir. Kültür kefir ile yapılan ısı stresi deneyinde ömür uzunluğu kontrol grubuna göre % 29.62 oranında artış göstermiştir. Kontrole (*E. coli*) karşı dane kefir karşılaştırmasındaki istatistiksel anlamlılık $p<0,035$ değeri ile yine güvenilir bir sonuç elde edilmiştir. Dane kefir ısı stresinde ömür uzunluğunda % 22.2 oranında artış göstermiştir. Isı stresi altında maksimum yaşam süresini hesapladığımızda kontrole (*E. coli*) karşı kültür kefir karşılaştırmasındaki istatistiksel anlamlılık $p<0,01$ değeri ile oldukça güvenilir bir sonuç vermiştir. Kültür kefir ile yapılan ısı stresi deneyinde maksimum ömür uzunluğu kontrol grubuna göre % 29.03 oranında artış göstermiştir. Kontrole (*E. coli*) karşı dane kefir karşılaştırmasındaki istatistiksel anlamlılık $p<0,033$ değeri ile yine güvenilir bir sonuç elde edilmiştir. Dane kefir ısı stresinde hesaplanan maksimum ömür uzunluğunda % 22.58 oranında artış göstermiştir.

Yapılan normal sıcaklıktaki ömür uzunluğu deneylerinde *E. coli* ve kültür kefir karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiştir. *E. coli* ve dane kefir grupları karşılaştırıldığında da yine istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç göstermemiştir. İki deneyde de ortalama yaşam süresinde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Normal sıcaklıktaki ömür uzunluğu deneyinde hesaplanan maksimum yaşam süresi sonuçlarına bakıldığında ise bir miktar artış görülmüş olsa da bu artış istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır.

Pogacic vd (2013) dane kefirin mikrobiyolojisini araştırdığı çalışmasında kefir içeriğinde laktik asit bakterileri, mezofilik bakteriler, laktokoklar, lökonostoklar ve mayalar bulunduğunu belirtmiştir. Ebner vd (2015) Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği'ndeki kefirin peptid içeriğini araştırdıkları çalışmalarında kefir içeriğinde laktikobasiller, mezofilik bakteriler, laktokoklar, lökonostoklar, asetik asit bakterileri ve

mayalar olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan mikrobiyolojik analizlerde bu mikroorganizmaların varlıkları benzer şekilde çalışmalarımızda da tespit edilmiştir.

Yaşlanma hem genetik hem de çevresel birçok faktörden etkilenen bir süreçtir. Model organizma kullanılarak laboratuvar ortamında çevresel şartlar optimize edilerek, kefirin olası etkilerinin ömür uzunluğuna katkısı gözlemlenmeye çalışılmıştır.

Duncan ve Flint (2013) prebiyotik ve probiyotiklerin yaşlı sağlığındaki etkileri konusunda yaptıkları derlemelerinde, sağlıklı yaşlanmanın yüksek kalitede besinlerle ve uzun süre kişisel sağlığına özen gösteren bireylerde mümkün olabileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar iyi tasarlanmış uzun vadeli araştırmalarla yaşlılardaki bağırsak fonksiyonlarını anlamak için probiyotik ve prebiyotiklerle birlikte çalışmalar yapılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Böylece bu çalışmaların yaşlanan nüfusun sağlığının iyileştirilmesi için tedavi stratejilerinin gelişimine katkı sağlayacağını önermişlerdir.

Woodmansey (2007) bağırsak bakterileri ve yaşlılık ile yaptığı derlemede probiyotik ve prebiyotiklerin oluşturduğu simbiyotik bileşenlerle yapılan tedavilerin bu alanda ulaşılan bilimsel kanıtların varlığında gelişebileceğini vurgulamıştır. Bu çalışmaların Amerika İlaç ve Gıda Kurumu ile İngiltere İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Kurulu gibi kuruluşların da değerlendirmesi altında olması gerektiğini belirtmiştir. Önerisi ise, bu düzenlemelerle birlikte fonksiyonel gıdaların değerlendirme ve sınıflandırılmalarının geliştirileceği yönündedir. Böylece gelecek uygulamalar yaşlı insanların bağırsak sağlığını ve yaşam kalitesini arttıracaktır.

Literatürde *C. elegans* ile probiyotik ve prebiyotiklerle ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. *C. elegans*'ın termotoleransa cevabının ve ömür uzunluğu değişiminin doğrudan kefir ile araştırıldığı çalışmalara ise literatürde hiç rastlanmamıştır. Bu bağlamda bizim çalışmamız bir ilk olma niteliğindedir. Kefir, laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalardan oluşan probiyotik bir karışımdır. *C. elegans* her ne kadar laboratuvar ortamında standart olarak *E. Coli OP50* ile beslenerek deneyler yapılıyor olsa da, doğası gereği toprakta bulunabilen her türlü bakteri ve maya ile beslenebildiği için bu çalışmada çok kolaylıkla kullanılabilmiştir. Ancak her ne kadar doğası böyle olsa da beslendiği mikroorganizma tipine bağlı olarak kurtçuğun yaşam uzunluğu, beslendiği besinin çeşidine bağlı olarak da yaşam kalitesi, yaşam uzunluğu ve strese karşı verdiği yanıtı değiştirebilir, bağışıklık sistemi etkilenebilir.

Ikeda vd (2007) probiyotikler ve patojenler ile yaptıkları bir çalışmada laktobasiller ve bifidobakterlerin *C. elegans*'ın yaşam uzunluğu üzerine etkisini ve *Salmonella enterica* patojenine karşı direncini araştırmışlardır. Bunun için öncelikle patojenle enfekte ettikleri *C. elegans*'ları probiyotiklerle beslemişlerdir. Yaptıkları çalışmada *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerini kullanmışlardır. Elde

ettikleri sonuçlarda probiyotik ile beslenen *C. elegans* patojene karşı direnç göstermiştir. Patojen ile enfekte etmedikleri *C. elegans*'larda ise bu türlerle beslendiğinde ömür uzunluklarında artış gözlemlenmiştir. Besin olarak kullanılan bakterilerden, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* bakterilerinin kefir yapısında bulunduğu bilinmektedir (Pogacic vd 2013). Bu bağlamda bizim çalışmamızda kullandığımız kefir içindeki bulunabilecek bu bakteri gruplarının aynı sonucu göstermiş olması muhtemeldir.

Lee vd (2001) laktobasillerin *C. elegans*'taki immun sistem üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus plantarum* türleri ile beslenen *C. elegans*'ların interferon gama seviyesi ve lenfosit proliferasyonunda artış gözlemlenmiştir. Çalıştıkları bakterilerin immun sisteme etki ettiğini yorumlamışlardır. Bu çalışmadaki *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus plantarum* türleri Ikeda'nın yaptığı çalışmayla benzer şekilde kefirin yapısında bulunan bakterilerdir (Pogacic vd 2013).

Kim ve Mylonakis (2012) *Enterococcus faecalis* ile enfekte ettikleri *C. elegans*'ları *Lactobacillus acidophilus* ile besleyerek kurtçukların patojene karşı direncini araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları genetik analizlerde laktobasillerle beslenen enfekte kurtçukların immun sistemlerinde cevap oluşturan tir-1, bar-1 ve pmk-1 genlerinin ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Besin olarak kullanılan laktobacillus bağışıklık sistemi üzerinde etkili olarak nematodun yaşamını devam ettirmesini sağlamıştır. Laktobasiller kefirde bulunan esas grup bakterilerden olduğundan bu çalışma, çalışmamızın sonuçlarına benzerlik göstermesi yönünden önemlidir.

Kamaladevi vd (2013) öldürücü olmayan oksidatif stres koşullarında *C. elegans*'ları *Lactobacillus casei* ile besleyerek stres direncini araştırmışlardır. Oksidatif stres kaynağı olarak malatasyon kullanan araştırmacılar elde ettikleri sonuçlarda laktobasillerle beslenen kurtçukların H₂O₂ seviyelerinde azalma, süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerinde ise artış olduğunu gözlemlenmiştir. Antioksidan sistemi pozitif yönde etkilediği görülen *Lactobacillus casei* kefirin yapısında da bulunmaktadır (Pogacic vd 2013).

Pinto vd (2009) *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus* türleri ile yaptıkları çalışmada laktobasillerin HT29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerindeki Toll benzeri hücre reseptörlerine etkisini araştırmışlardır. Öncelikle *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ile enfekte edilmiş HT29 hücrelerinde laktobasillerin bağışıklık yanıtı üzerine etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda enfekte hücreler laktobasillerle muamele edildiğinde bu hücrelerde IL-8 seviyesinde oldukça yüksek değerler gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* türünün kefir yapısında bulunduğu bilinmektedir (Pogacic vd 2013). Kefirde bulunan bağışıklığı düzenleyici mekanizmanın laktobasillerin sitokinleri uyarıcı etkisinden kaynaklanmış olabileceği muhtemeldir.

Fahmy ve Ismail (2015) ratlarda indüklenmiş ülserle karşı ranitidin ve kefirin sindirim sistemine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında mide asidi düzenleyici olan ranitidin ilacı ile kefirin, radyasyon ve etanol maruziyetinde kalarak ülser oluşturulmuş ratlardaki etkisini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda kefir tüketen gruptaki hayvanlarda ülser iyileşme oranının ranitidine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da kefirin gastrointestinal tedavilerdeki önemini vurgulamaktadır. Ayrıca kefirin ilaçlara alternatif bir ürün olma yolundaki görüşleri de desteklemektedir.

Chen ve Chen (2013) kefirde izole edilen *Lactobacillus kefiranofaciens* türünün fareler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada kör bağırsak gelişimi, bağırsak duvarındaki epitel hücrelerin gelişimi ve IL seviyelerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda farelerde *Lactobacillus kefiranofaciens*'in bağırsaktaki mikrobiyotaya eksikliğinden genişleyen kör bağırsağın gelişimini engellediğini, bağırsak epitel hücrelerinin gelişimini arttırdığını ve immün sistem sitokini IL-12 seviyesindeki artış sağladığını gözlemlemişlerdir. Kefirde izole edilen laktobasillerin immün sistemi ve bağırsak fonksiyonlarını düzenleyici etkisini destekler nitelikte bulgular öne sürmüştür.

Daha sağlıklı bir yaşam için ve/veya etkili çalışan bir sindirim sistemine sahip olmak için halk arasında tüketilen ve doktorlar tarafından önerilen fermente süt ürünleri dışında, bazı gıda katkı maddeleri ve probiyotik besin takviyelerinin de kullanımı son günlerde önem kazanmıştır. Bunlar genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerini içermektedir. Kapsül, tablet ya da toz olarak kullanımının yanında ishal ve kabızlık gibi problemlere karşı iyileştirici etkisinden dolayı bebek mamalarına takviye olarak eklenmeye başlanmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular literatüre katkı vermekle birlikte, özellikle bizim için bir başlangıç çalışmasıdır. Bu çalışmanın devamında daha fazla ayrıntı içeren deneysel tasarımlar gerekmektedir.

6. SONUÇ

Kefir, dünyada bazı ülkelerde çok iyi bilinen, bazı ülkelerdeyse hemen hiç bilinmeyen fermente bir süt ürünüdür. Hatta aynı ülke içinde bile bazı insanların düzenli olarak tükettiği kefir, diğer insanlar tarafından hiç duyulmamış ya da hiç tüketilmemiş olabilmektedir. Bu çalışma öncelikle bir model organizmada ve yansımasında da insanlarda *in vivo* etkisini gösterdiğinden dolayı, hem sağlık yararı için içilmesi, hem de pazarlanması konusunda büyük dikkat çekecek bir bulgu ortaya koyma yönünde olduğundan, ulusal sağlık ve ekonomiye de katkı yapacak boyuttadır. Bu çalışma gıda endüstrisinde yapılmaya çalışılan büyük ölçekli üretimlerin, ne kadar yerini bulduğu konusuna da bir başka bakış açısıyla değerlendirme getirebilir.

Kefirdeki probiyotik bakteriler ve bunların ürettiği ekzopolisakkaritler immun sistemin düzenlenmesinde etkilidir. Bazı çalışmalar sonucunda kefirin yararları arasında antikanserojen, antimutajen, antifungal, antiviral ve antibakteriyel (patojenlere karşı) etkilerinin olabileceği bulunmuştur. Kefirde bulunan kolesterol parçalayıcı enzimler kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir. Ayrıca laktik asit bakterileri laktozu parçaladıkları için laktoz intoleransı bulunan bireylerin rahatlıkla tüketebileceği bir süt ürünüdür. Kefirin yararlı etkileri uzun yıllardır bilinmekle birlikte yukarıda verilen olumlu etkiler henüz hipotez olarak görülmektedir. Bu sebeple bu konuda yapılacak ileri düzeydeki araştırmaların devam etmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda kefirin ısı stresi altında pozitif sonuçlar verdiği görülmüş, ancak etki ettiği yollar, proteinler ve moleküller belirlenememiştir. Hangi proteinlerin stres toleransında önemli olduğu literatüre bakılarak tahmin edilmesine karşın, kesin olarak belirlemek için genetik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Genetik çalışmalar için *C. elegans* mutantlarıyla yapılacak olan araştırmalar bu hedefe uygun olacaktır.

İleriki çalışmalarda kefir içinde bulunan bakteri ve mayalar önce grup olarak, gerekirse sonra bireysel olarak her bir suşu ayrıştıırılarak hangi türlerin ısı stresinde ve normal sıcaklıktaki ömür uzunluğunda etkili olduğu ve hangi hücresel yollara etki ettiğinin araştırılması gereken noktalardır.

Kefirin normal sıcaklıktaki ömür uzunluğu üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamsız olmasına rağmen küçük de olsa bir artış söz konusudur. Bu artış özellikle normal sıcaklıktaki maksimum yaşam süresi üzerinde etkili gibi görülmektedir. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamsızdır. Yaşam süresinde istatistiksel anlamda değişiklik olmamasının nedenleri arasında *C. elegans* 'ın ömür boyu yüksek yoğunlukta bakterilerle beslenmeleri ve bu nedenle bağırsaklarında aşırı bakteri birikimine bağlı olarak ömür uzunluklarının etkilenmiş olması söz konusu olabilir. Kefirin ısı stresine karşı direnç göstermeye yardım etmesiyle birlikte normal sıcaklıktaki ömür uzunluğu üzerine etki etmemiş olması tam olarak yorumlayamadığımız bir sonuç olmakla beraber, normal

sıcaklıktaki ömür uzunluğu deneylerinin yaş gruplarına bölünerek yapılması gerektiğini ve böylece her yaş döneminde etkinin daha net aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Yapılacak olan yeni ve farklı çalışmalar ile normal sağlığı devam ettirme, hastalıkları önleme ve hastalıkların tedavi süreçleri gibi konular üzerine etkisi olan kefir ile yeni çalışmaların yapılma gerekliliği görülmüştür.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz verilerin ileride yapılacak olan ömür uzunluğu ve ısı stresi deneylerinde araştırmacılara yol gösterici olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca endüstriyel ve geleneksel olarak üretilen kefirin kullanımına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Olası etkiler tam olarak aydınlatılamadığından kefir tüketilmeli ancak alınan miktara dikkat edilmelidir diyebiliriz. Günümüzde zaten marketlerde satışının olması ile birlikte kefir tüketen insan sayısı gittikçe artmaktadır. En azından iyi bir besin olması ve dengeli beslenmeyi desteklemesi bakımından kefir tüketilmelidir. Strese karşı direnç göstermeyi etkilediği ve ısı stresi altında maksimum yaşam süresinde gösterdiği artış ile kefirin beslenme ve sağlık alanındaki önemini göstermiş bulunmaktayız.

7. KAYNAKLAR

- ACCILI, D. and ARDEN, K.C. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117: 421-426.
- ALTUN, Z.F. and HALL, D.H. 2009. Introduction. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1 (Son erişim tarihi: Mayıs 2015)
- AMRIT, F.R.G., RATNAPPAN R. and KEITH S.A. 2014. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods*, 68(3): 465–475.
- ANGULO, L., LOPEZ, E. and LEMA, C. 1993. Mikroflora present in kefir grains of the galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research* 60: 263-267.
- ANONİM, 2009. Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği. Tebliğ No: 2009/25. Resmi Gazete, Sayı:27143.
<http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.12872&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=2009/25> (Son erişim tarihi: Mayıs 2015).
- ANONİM, 2015a. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2002 - Press Release". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/press.html (Son erişim tarihi: Mayıs 2015).
- ANONİM, 2015b. "Press Release: The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html (Son erişim tarihi: Mayıs 2015).
- ANONİM, 2015c. "The Nobel Prize in Chemistry 2008 - Press Release". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html (Son erişim tarihi Mayıs 2015).
- BARSYTE, D., and LITHGOW G. 2001. Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Faseb*, 15: 627-634.
- BIAGI, E., CANDELA, M., FAIRWEATHER-TAIT, S., FRANCESCHI, C., and BRIGIDI, P. 2012. Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age*, 34: 247-67.
- BRENNER, S. 1974. The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics*, 77: 71-79.

- BYERLY, L., CASSADA, R.C. and RUSSELL, R.L. 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 51: 23-33.
- CHEN, Y. and CHEN, M. 2013. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 Isolated from Kefir Grains on Germ-Free Mice. *PLoS One*, 8(11): 1-7.
- CORSI, A.K. 2006. A Biochemist's Guide to *C. elegans*, *Anal. Biochem.*, 359(1): 1–17.
- DİNÇ, A. 2008. Kefirin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 59 s.
- DOĞAN, M. 2012. Probiyotik Bakterilerin Gastrointestinal Sistemdeki Etki Mekanizması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7: 20-27.
- DUNCAN, S.H. and FLINT H.J. 2013. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 75: 44-50.
- EBNER, J., ARSLAN, A.A., FEDOROVA, M., HOFFMANN, R., KÜÇÜKÇETİN, A., and PISCHETSRIEDER, M. 2015. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117: 41-57.
- ENGELMANN, I and PUJOL, N. 2010. Innate immunity in *C. elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 708: 105-121.
- EWBANK, J. J. 2006. Signaling in the immune response. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.83.1,
- FAHMY, H.A. and ISMAIL, A.F.M. 2015. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 144: 85-93.
- FALLON, P.G., ALLEN, R.L. and RICH, T. 2011. Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man, *Trends Immunol.*, 22: 63–66.
- FARNWORTH, E.R. 2005. Kefir a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1): 1-17.
- FARNWORTH, E.R.T. 2008. Handbook of Fermented Functional Foods, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 571p.

- GERITS, N., KOSTENKO, S. and MOENS, U. 2007. *In vivo* functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res.* 16: 281–314.
- GLENN, R. and GIBSON, M.R. 2008. Handbook of Prebiotics, CRC PressTaylor & Francis, Boca Raton, 485p.
- GOURBEYRE, P., DENERY, S. and BODINIER, M. 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J. Leukoc. Biol.*, 89(5): 685-95.
- GÜLMEZ, M. ve GÜVEN, A. 2002. Probiyotik, Prebiyotik ve Sinbiyotikler, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 8(1): 83-89.
- GÜZEL-SEYDİM, Z.B., WYFFELS, J.T., SEYDİM, A.C., and GREENE, A.K. 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *Int. J. Dairy Tech.*, 58(1): 25-29.
- HOLLIDAY, R. 1995. Understanding Ageing. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 207.
- HOPKINS, M.J., SHARP, R. and MACFARLANE, G.T. 2001 Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 305-344.
- HU, P.J. 2007. Dauer. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>. [Son erişim tarihi: 28.5.2015].
- IKEDA, T., YASUI, C., HOSHINO, K., ARIKAWA, K., and NISHIKAWA, Y. 2007 Influence of Lactic Acid Bacteria on Longevity of *Caenorhabditis elegans* and Host Defense against *Salmonella enterica* and *Serovar Enteritidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20): 6404–6409.
- IMAHORI, K. 1992. How I Understand Aging. *Nutrition Reviews*, 50(12): 351-352.
- INOUE, H., HISAMOTO, N., AN, J.H., OLIVEIRA, R.P., NISHIDA, E., and BLACKWELL, T.K., and MATSUMOTO, K. 2005. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & Development*, 19: 2278–2283.
- IRIGOYEN, A., ARANA, I., CASTIELLA, M., TORRE, P., and IBANEZ, F. C. 2005. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90: 613–620.

- JIN, K. 2010. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* 1(2):72-74.
- KAMALADEVI, A., GANGULI, A., KUMAR, M. and BALAMURUGAN, K. 2013. *Lactobacillus casei* protects malathion induced oxidative stress and macromolecular changes in *Caenorhabditis elegans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105: 213–223.
- KIM, K.K., KIM, R. and KIM, S.H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394: 595-599.
- KIM, Y. and MYLONAKIS, E. 2012. *Caenorhabditis elegans* Immune Conditioning with the Probiotic Bacterium *Lactobacillus acidophilus* Strain NCFM Enhances Gram-Positive Immune Responses. *Infection and Immunity*, 80(7): 2500–2508.
- KÖK-TAŞ, T., SEYDİM, A.C., ÖZER, B. and GÜZEL-SEYDİM, Z. 2013. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2): 780–789.
- KRISHNA, M. and NARANG, H. 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65: 3525–3544.
- KÜÇÜKKAYA, B. and AFRASYAP, L. 2012. Regulation of mitogen activated protein kinases through heterotrimeric G proteins. *Turkish Journal of Biochemistry*, 37(2): 218–228.
- KWAK, H.S., PARK, S.K. and KIM, D.S., 1996. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast, *J. Dairy Sci.*, 79(6): 937-942.
- LEE, J., YUN, H.S., CHO, K.W., OH, S., KIM, S.H., CHUN, T., KIM, B. and WHANG, K.Y. 2001. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immunomodulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 80–86.
- LEE, R., HENCH, J. and RUVKUN, G. 2001. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Current Biology*, 11: 1950-1957.
- LEE, Y.K., LIM, C.Y., TENG, W.L., OUWEHAND, A.C., TUOMOLA, E.M. and SALMINEN, S. 2000. Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 66: 3692–3697.

- LEROUX, M.R., MELKI, R., GORDON, B., BATELIER, G. and CANDIDO, E.P. 1997. Structurefunction studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 272: 24646-24656.
- LI, G.C. and WERB, Z. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 3218-3222.
- LI, G.C., PETERSEN, N.S. and MITCHELL, H.K. 1982. Induced thermal tolerance and heat shock protein synthesis in Chinese hamster ovary cells. *International Journal of Radiation Oncology*, 8(1): 63-67.
- LIM, C.C., FERGUSON, L.R. and TANNOCK, G.W. 2005. Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 49(6): 609-619.
- LIU, H. 2013. Interactions between Dietary Chicory, Gut Microbiota and Immune Responses, PhD. Thesis, Swedish University, Upsala, 74 p.
- MAGLIONI, S., SCHIAVI, A., RUNCI, A., SHAIK, A. and VENTURA, N. 2014. Mitochondrial stress extends lifespan in *C. elegans* through neuronal hormesis. *Experimental Gerontology*, 56: 89–98.
- METCHNIKOFF, I.I. 2004. The Prolongation of Life. Springer Publishing Company. New York. 264 p.
- MILLET, A.C.M. and EWBANK, J.J. 2004. Immunity in *Caenorhabditis elegans*, *Current Opinion in Immunology*, 16: 4-9.
- MOCHII, M., YOSHIDA, S., MORITA, K., KOHARA, Y. and UENO, N., 1999. Identification of transforming growth factor-beta- regulated genes in *Caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 15020-15025.
- MORLEY, J.F. and MORIMOTO, R.I. 2004. Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 657–664.
- MURPHY, C.T. 2006. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp. Gerontol.*, 41(10): 910-21.

- MURPHY, C.T., MCCARROLL, S.A., BARGMANN, C.I., FRASER, A., KAMATH, R.S., AHRINGER J., LI, H. and KENYON, C. 2003 Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424: 277-283.
- MURPHY, E. and O'MAHONY, L. 2009. Microbiology and Aging. Springer, New York, 348p.
- NAIR, G. and TAKEDA, Y. 2011. Probiotic foods in health and disease. Science Publishers, Enfield, 122p.
- OELSCHLAEGER, T. A. 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.*, 300: 57-62.
- OH, S.W., MUKHOPADHYAY, A., DIXIT, B.L., RAHA, T., GREEN, M.R. and TISSENBAUM, H.A. 2006. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.*, 38: 251-257.
- OLSEN, A., VANTIPALLI, M.C. and LITHGOW, G.J. 2006. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1067: 120-128.
- ÖTLEŞ, S. and ÇAĞINDI, Ö. 2003. Kefir: A probiotic dairy composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2): 54-59.
- ÖTLEŞ, S. 2014. Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton. 504 p.
- PETERSEN, C., DIRKSEN, P. and SCHULENBURG, H. 2015. Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans*. *Trends in Genetics*, 31(3): 120-127.
- PINTO, M.G.V., GÓMEZ, M.R., SEIFERT, S., WATZL, B., HOLZAPFEL, W.H. and FRANZ, C.M.A.P., 2009. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro, *International Journal of Food Microbiology*, 133: 86-93.
- POGACIC, T., SINKO, S., ZAMBERLIN, S. and SAMARZJIA, D. 2013. Microbiota of kefir grains, *Mljekarstvo* 63(1): 3-14.
- PRAHLAD, V., CORNELIUS, T. and MORIMOTO, R.I. 2008. Regulation of the Cellular Heat Shock Response in *Caenorhabditis elegans* by Thermosensory Neurons. *Science*, 320(5877): 811-814.

- QUEITSCH, C., HONG, S., VIERLING, E. and LINDQUIST, S., 2000. Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(4): 479-492.
- RAIZEN, D.M., ZIMMERMAN, J.E., MAYCOCK, M.H., TA, U.D., YOU, Y., SUNDARAM, M.V. and PACK, A.I. 2008. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451: 569-572.
- REA, S.L., WU, D., CYPSEY, J.R., VAUPEL, J.W. and JOHNSON, T.E. 2005. A Stress-Sensitive Reporter Predicts Longevity in Isogenic Populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.*, 37(8): 894–898.
- RIDDLE, D.L., SWANSON, M.M. and ALBERT, P.S. 1981. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*, 290: 668–671.
- RUSCH V. 2002. Probiotics and definitions: a short overview, in: Heidt P.J., Midtvedt T., Rusch V., Waaij, D. (Eds.) Probiotics: Bacteria and Bacterial Fragments as Immunomodulatory agents. pp. 1-4 (Old Hernorn University, Herborn-Dill, Germany).
- RUTSCHMANN, S., KILINC, A. and FERRANDON, D. 2002. Cutting edge: the Toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.*, 168: 1542-1546.
- SAKAGUCHI, A., MATSUMOTO, K. and HISAMOTO, N. 2004. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.*, 136: 7–11.
- SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y. and LEE, Y. K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10: 107-110.
- SARKAR, S. (2008): Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*, 110: 283-295.
- SCHEID, M.M.A., MORENO, Y.M.D., MARÓSTICA, M.R. and PASTORE, G.M. 2013. Effect of prebiotics on the health of the elderly. *Food Research International*, 53: 426–432.
- SO, S., TOKUMARU, T., MIYAHARA, K. and OHSHIMA, Y. .2011. Control of lifespan by food bacteria, nutrient limitation and pathogenicity of food in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132: 210–212.
- TAMIME, A.Y. 2006. Fermented Milk. Blackwell Science. Oxford. 262 p.

- TIMMERMAN, H.M., KONING, C.J.M., MULDER, L., ROMBOUTSD, F.M. and BEYNEN, A.C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food. Microbiol.*, 96: 219-33.
- URDANETA, E., BARRENETXE, J., ARANGUREN, P., IRIGOYEN, A., MARZO, F. and IBANEZ F.C. 2007. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*, 27: 653–658.
- VANFLETEREN, J. and BRAECKMAN, B.P. 1999. Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Aging*, 20: 487-502.
- www.wormbase.org/resources/gene_class/#1-0-2 (Son erişim tarihi: Mayıs 2015)
- www.wormbook.org/toc_wormmethods.html (Son erişim tarihi: Mayıs 2015)
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Kefir#/media/File:Kefirpilze.jpg> (Son erişim tarihi: Mayıs 2015)
- WAGNER, E.F. and NEBRED, A.R. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer*, 9: 537–549.
- WALKER, G.A. and LITHGOW, G.J., 2003. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*, 2(2): 131-139
- WOODMANSEY, E.J. 2007. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1178-86.
- YÜKSEKDAĞ, Z.N. ve BEYATLI Y. 2003. Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2): 49-69.
- ZUBILLAGA, M., WEILL, R., POSTAIRE, E., GOLDMAN, C., CARO, R. and BOCCIO, J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases *Nutrition Research*, 21: 569–579.

8. EKLER

Ek-1 : Isı Stresinde Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>E. coli</i>	14	32,7143	8,32446	2,22481	27,9079	37,5207	22,00	46,00
Kültür	13	42,1538	8,26485	2,29226	37,1594	47,1482	28,00	50,00
Dane	14	40,1429	10,15160	2,71313	34,2815	46,0042	22,00	52,00
Toplam	41	38,2439	9,66639	1,50964	35,1928	41,2950	22,00	52,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	677,297	2	338,649	4,205	,022
Within Groups	3060,264	38	80,533		
Total	3737,561	40			

Multiple Comparisons

(I)		Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-9,43956*	3,45648	,010	-16,4368	-2,4423
	3,00	-7,42857*	3,39187	,035	-14,2950	-,5621
2,00	1,00	9,43956*	3,45648	,010	2,4423	16,4368
	3,00	2,01099	3,45648	,564	-4,9863	9,0083
3,00	1,00	7,42857*	3,39187	,035	,5621	14,2950
	2,00	-2,01099	3,45648	,564	-9,0083	4,9863

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Ek-2 : Isı Stresinde Maksimum Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>E. coli</i>	14	31,4286	8,95900	2,39439	26,2558	36,6013	16,00	46,00
Kültür	13	40,7692	7,63930	2,11876	36,1528	45,3856	28,00	50,00
Dane	14	38,8571	9,85165	2,63296	33,1690	44,5453	20,00	50,00
Toplam	41	36,9268	9,58225	1,49650	33,9023	39,9514	16,00	50,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	667,330	2	333,665	4,219	,022
Within Groups	3005,451	38	79,091		
Total	3672,780	40			

Multiple Comparisons

(I)		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
E. coli	Kültür	-9,34066*	3,42538	,010	-16,2750	-2,4063
	Dane	-7,42857*	3,36135	,033	-14,2333	-,6239
Kültür	E. coli	9,34066*	3,42538	,010	2,4063	16,2750
	Dane	1,91209	3,42538	,580	-5,0222	8,8464
Dane	E. coli	7,42857*	3,36135	,033	,6239	14,2333
	Kültür	-1,91209	3,42538	,580	-8,8464	5,0222

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Ek-3 : Normal Sıcaklıktaki Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>E. coli</i>	19	24,0526	4,75481	1,09083	21,7609	26,3444	15,00	32,00
Kültür	20	25,5000	5,33607	1,19318	23,0026	27,9974	20,00	42,00
Dane	21	23,5714	2,85607	,62325	22,2714	24,8715	19,00	29,00
Toplam	60	24,3667	4,41863	,57044	23,2252	25,5081	15,00	42,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40,843	2	20,422	1,048	,357
Within Groups	1111,090	57	19,493		
Total	1151,933	59			

Ek-4 : Normal Sıcaklıktaki Maksimum Yaşam Süresi İstatistik Sonuçları

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>E. coli</i>	19	21,5789	4,36292	1,00092	19,4761	23,6818	15,00	29,00
Kültür	20	24,9500	5,65197	1,26382	22,3048	27,5952	19,00	42,00
Dane	21	22,4286	3,42887	,74824	20,8678	23,9894	18,00	29,00
Toplam	60	23,0000	4,70485	,60739	21,7846	24,2154	15,00	42,00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	121,276	2	60,638	2,917	,062
Within Groups	1184,724	57	20,785		
Total	1306,000	59			

ÖZGEÇMİŞ



Merve GÜNEŞ 1988 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Ankara’da orta öğrenimini ise İstanbul’da tamamladı. 2006 yılında girdiği Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden 2011 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Ocak 2013’te Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.