Özgün Araştırma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2026;60(4):448-466*/doi: 10.5578/mb.20260432

Geliş Tarihi (Received): 06.02.2026 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.06.2026

Caco-2 Kolon Hücre Hattı Üzerinde *Escherichia coli* Serotipleri ile Kültürlenmiş İnsan Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Antagonistik Etkileri ve Sitokin, Kemokin, TLR4 Profilinin Araştırılması

Investigation of the Antagonistic Effects and Cytokine, Chemokine and TLR4 Profiles of Human-Derived Lactic Acid Bacteria Co-cultured with *Escherichia coli* Serotypes on the Caco-2 Colon Cell Line

Münevver KAHRAMAN(ID)

Akdeniz Üniversitesi, Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü İleri Sağlık Araştırma Merkezi, Antalya.
Akdeniz University, Tuncer Karpuzoğlu Organ Transplantation Institute Advanced Health Research Center, Antalya, Türkiye.

**Bu çalışma, Türkiye Bilim ve Teknolojik Araştırma Konseyi (TÜBİTAK) tarafından 124S505 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.*

***Bu proje, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doç. Dr. Esma Kırımlıoğlu'nun laboratuvar olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.*

Makale Atıfı: *Kahraman M. Caco-2 kolon hücre hattı üzerinde Escherichia coli serotipleri ile kültürlenmiş insan kaynaklı laktik asit bakterilerinin antagonistik etkileri ve sitokin, kemokin, TLR4 profilinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2026;60(4):448-466.*

ÖZ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) antagonistik yeteneği, probiyotiklerin değerlendirilmesinde önemli bir faktördür. Bu nedenle, probiyotiklerin gastrointestinal kanalda kolonizasyon yeteneği ve kalıcılığı, patojen ilişkili hastalıkları azaltmak için patojenik bakterilerin epitel hücrelerine yapışmasını önlemede önemli kriterlerden biridir. Bu çalışmada, bir bağırsak epitel (Caco-2) hücre kültürü enfeksiyon modelinde probiyotik olma özellikleri daha önceki çalışmalarda belirlenmiş LAB'ın, *Escherichia coli* suşlarıyla etkileşiminin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada LAB ve patojenik suşların yapışması üzerindeki rekabet, dışlama ve yer değiştirme inhibisyonu kültürel sayım yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmada, probiyotik LAB suşlarının immünomodülatör etkisi, *E.coli*'nin Caco-2 hücrelerinden dışlanma, rekabet ve yer değiştirme sonrasında alınan lizat ve süpernatantlarda kemoatraktan sitokin IL-8, anti-enflamatuvar sitokin IL-10 ve pro-enflamatuvar yanıtı tetikleyen TLR4, "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) ile saptanmıştır. LAB suşlarının Caco-2 hücrelerine yapışma kapasiteleri sırasıyla 6.82, 7.62, 6.42, 6.64 ve 7.22 log CFU/mL olarak belirlenmiştir. *E.coli*'nin Caco-2 hücrelerinde LAB tarafından dışlanma kapasitelerinin LAB suşlarının Caco-2 hücrelerine yapışma kapasitelerinden düşük olduğu görülmüştür. Aynı grupların rekabet deneyi sonuçlarının dışlama kapasitelerinin altında, yer değiştirme kapasiteleri ise rekabet kapasitelerinden daha düşük olarak belirlenmiştir. ELISA ile ölçüm sonucu sitokinlerden IL-8 ekspresyonunun önemli ölçüde düştüğü ($p< 0.001$) ancak IL-10 seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. TLR4 seviyeleri ise önemli ölçüde LAB tarafından baskılanabilmiştir ($p< 0.001$). İn vitro deneyler, seçilen LAB'ın Caco-2 hücrelerine yapıştığı ve bu olayda yüzey ilişkili proteinlerin önemli bir rol oynadığını

İletişim (Correspondence): *Dr. Münevver Kahraman, Akdeniz Üniversitesi, Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü İleri Sağlık Araştırma Merkezi, Antalya.* ***Tel (Phone):*** *+90 (506) 380 57 85,* ***E-posta (E-mail):*** *munevverkahraman@msn.com*

göstermiştir. Ayrıca test edilen patojenlere karşı oldukça antagonistik oldukları ve immünomodülatör olarak etki edebildikleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Probiyotik; E. coli; antagonistik etki; sitokin.*

ABSTRACT

The antagonistic ability of lactic acid bacteria (LAB) is an important factor in the evaluation of probiotics. Therefore, the colonization ability and persistence of probiotics in the gastrointestinal tract is one of the most important criteria in preventing the adhesion of pathogenic bacteria to epithelial cells to reduce pathogen-associated diseases. This study aimed to investigate the interaction of LAB, whose probiotic properties were determined in previous studies, with *Escherichia coli* strains in an intestinal epithelial (Caco-2) cell culture infection model. Initially, competition, exclusion and displacement inhibition on the adhesion of LAB and pathogenic strains were evaluated by culture counting method. Additionally, the immunomodulatory effect of probiotic LAB strains was investigated by enzyme-linked ımmunosorbent assay (ELISA) in lysates and supernatants obtained after exclusion, competition and displacement of *E.coli* from Caco-2 cells, targeting the chemoattractant cytokine IL-8, the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the pro-inflammatory response-triggering TLR4. As a result, the adhesion capacities of LAB strains to Caco-2 cells were determined as 6.82, 7.62, 6.42, 6.64, 7.22 log CFU/mL, respectively. The exclusion capacities of *E.coli* by LAB in Caco-2 cells were found to be lower than the adhesion capacities of LAB strains to Caco-2 cells. The competition experiment results of the same groups were determined to be below the exclusion capacities and the displacement capacities were lower than the competition capacities. ELISA measurements revealed a significant decrease in IL-8 cytokine expression ($p< 0.001$), while IL-10 levels increased. TLR4 levels were significantly suppressed by LAB ($p< 0.001$). In vitro experiments have shown that the selected LAB adhered to Caco-2 cells and that surface-associated proteins played a significant role in this process. Additionally, they were determined to be highly antagonistic against the tested pathogens and capable of acting as immunomodulators.

Keywords: *Probiotic; E. coli; antagonistic effect; cytokine.*

GİRİŞ

Probiyotiklerin gastrointestinal sistem mikrobiyotasının ve immün sisteminin düzenlenmesindeki rolünün yanı sıra gıdaların, vitamin ve minerallerin sindirimini ve emilimini sağlamak, patojenik bakteri ve virüsleri inhibe etmek, tümör ve diyare oluşumunu engellemek, laktoz intoleransını azaltmak, kalsiyum absorbsiyonunu geliştirmek, idrar yolu enfeksiyonlarını önlemek, alerji oluşumunu engellemek, β-galaktozidaz gibi sindirim enzimlerini ve vitaminleri üretmek, sinir sistemini rahatlatıcı etki göstermek, yaşlanmayı geciktirmek, serum kolesterol seviyesini düşürmek gibi pek çok önemli yararı bulunmaktadır[1]. Son yıllarda, insan sağlığına katkıları açısından laktik asit bakterileri (LAB) türlerinin karakterizasyonuyla ve probiyotiklerin etki mekanizmalarının araştırılmasıyla ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. Probiyotiklerin değerlendirilmesinde, LAB suşlarının antagonistik yeteneği oldukça önemlidir ve probiyotikler antagonistik etki mekanizmaları, bağırsak hücrelerine yapışma ve rekabet yoluyla patojen inhibisyonu ile konakçının epitel hücrelerine yapışan ve enfeksiyona neden olan patojenlerin büyümesini önlemek için bağırsak mikrobiyotasını modüle etmektedirler[2,3]. Probiyotiklerin kolonizasyonu ve gastrointestinal sistemde kalıcılığı, patojenle ilişkili hastalıkları azaltmada ve epitel hücrelerine patojenik bakterilerin yapışmasını önlemede önemli kriterlerden biridir.

Caco-2 hücreleriyle yapılan in vitro çalışmalarda, probiyotiklerin, *Escherichia coli* gibi çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini bu enteropatojenler ile rekabet edip yer değiştirerek inhibe ettiği gösterilmiştir[4]. Farklı çalışmalarda bazı probiyotik bakterilerin *E.coli* ve *Clostridium difficile*'nin büyümesini engellediği ve hem *Lactobacillus crispatus* hem de *Lactobacillus helveticus* gibi probiyotik bakterilerin enteropatojenik bakterilerle rekabet ederek elimine ettikleri gösterilmiştir[5-8]. Zhang ve arkadaşlarının[9] çalışmalarında *Lacticaseibacillus paracasei* subp. *paracasei* M5-L, *Lacticaseibacillus rhamnosus* J10-L ve *Lacticaseibacillus casei* Q8-L'nin Shigella sonnei'nin HT-29 hücrelerine yapışmasını önlemede etkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde başka bir çalışmada, bazı laktobasil suşlarının bağırsak epiteline yapıştığı, patojenlerin istilasını önlediği ve epitel bariyer fonksiyonunu geliştirdiği bildirilmiştir[10].

Laktobasillerin, patojenler, lipoprotein veya diğerleriyle muamele edilen ökaryotik hücrelerin (HT-29, Caco-2 veya diğer ökaryotik hücreler) pro-enflamatuvar yanıtlarını (TNF-α, IL-8) ve anti-enflamatuvar yanıtlarını (IL-10) etkileyebildiği gösterilmiştir[11,12]. Örneğin bazı laktobasil suşlarının, pro-enflamatuvar sitokin IL-8'in salgılanmasını azaltabildiği ve anti-enflamatuvar IL-10'unun ise salgılanmasını teşvik edebildiği rapor edilmiştir[13]. Johnson-Henry ve arkadaşları[7], *L.helveticus* yüzey tabakası proteininin, EHEC O157:H7'nin insan bağırsak hücrelerine yapışmasını engellediğini göstermiştir. Lactobacillus acidophilus A4, EHEC O157:H7'nin HT29 bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasını önemli ölçüde inhibe ettiği ve aynı anda MUC2 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, *L.rhamnosus* GG, EHEC O157:H7'nin bir insan epitel hücre hattına içselleştirilmesini baskılamış, epitelyal tek tabakadaki morfolojik değişiklikleri azaltmış, onları sıkı bağlantı proteinlerinin EHEC kaynaklı yeniden dağılımına karşı korumuş ve ayrıca enfekte Caco-2 hücrelerinin EHEC kaynaklı kemokin ekspresyonunu önemli ölçüde bastırdığı tespit edilmiştir[14-16]. Aynı zamanda *Bacillus subtilis*, *Bacteroides ovatus*, *E.coli*, *L.rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis*, *L.casei* veya *L.acidophilus* gibi bazı kommensal bakterilere maruz kalan bağırsak epitel hücrelerinin (BEH) enflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-8 ve TNF-α) veya kemokinler (CCL2 ve CCL20) üretebileceği de bildirilmiştir[17].

Bağırsak epitel hücreleri, TLR'ler gibi korunmuş örüntü tanıma reseptörlerinin (PRR'ler) ekspresyonu yoluyla bakterileri algılayabilmektedir[18,19]. Toll benzeri reseptör 4 (TLR4)/miyeloid farklılaşma faktörü-2 (MD-2), gram-negatif bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) birincil doğal TLR4 agonisti olmak üzere, çok çeşitli patojen ilişkili ve endojen moleküller tarafından aktive edilebilmektedir[20]. Bu konu ile ilgili çalışmalar, TLR2 ve TLR4'ün hem BEH hücre hatlarında hem de bağırsak dokusundan izole edilen birincil BEH'de yapısal olarak ifade edildiğini göstermiştir[19].

Bu çalışmada, LAB'ların, çeşitli *E.coli* suşları ile insan bağırsağı Caco-2 hücre hattı hücrelerine yapışmasına karşı antagonistik yeteneğini, rekabet, dışlama ve yer değiştirme yoluyla probiyotiklerin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Buna ilaveten, patojenik ve non-patojenik floraya sahip Caco-2 insan bağırsak epitel hücrelerinde probiyotik özellikli LAB'ların sitokin profili üzerindeki rolü belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada insan orijinli laktik asit bakterilerinin kullanılması, Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 10/05/2017 ve Karar no: 288).

İn Vitro İnsan Caco-2 Hücre Kültürü

Bakterilerin gastrointestinal sisteme in vivo yapışmasının incelenmesinin zorluğu nedeniyle, normal enterositlerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini ifade eden adenokarsinom hücre dizisi Caco-2 kullanılmasıyla yapılan in vitro değerlendirmelerin yaygın olarak kabul gördüğü bilinmektedir. Bu sebeple çalışmada Caco-2 hücrelerini kullanmak tercih edildi21. İnsan adenokarsinom kolon hücreleri Caco-2 (T.C. Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre Bankası Bölüm Başkanlığı, Ankara, Türkiye) kültürü, %5 CO_2 içeren bir atmosferde 37 °C'de %10 (h/h) ısıyla inaktive edilmiş FBS ve %1 (h/v) esansiyel olmayan amino asit ve %1 penisilin streptomisin ile takviye edilmiş DMEM içinde hazırlandı. Hücre kültürlerinde mikoplazma olmadığından emin olmak için düzenli olarak kontrol edildi. Caco-2 hücreleri, yapışma deneyi için altı kuyucuklu plakalara 1x105 hücre/kuyu konsantrasyonda ekildi. Büyüme ortamı iki günde bir değiştirildi. Hücreler, yapışma çalışması için kullanılan farklılaşmış ve sabit epitelyal/enterosit benzeri tek tabakalar oluşturmak üzere 21 gün boyunca büyütüldü[22]. Farklılaşmanın değerlendirilmesi morfolojik inceleme ile yapıldı.

Bakteriyel Suşlar ve İn Vitro Kültür Koşulları

Önceki çalışmamızda insan dışkısından izole edilen LAB suşları gönüllülerden çalışmanın niteliği tam olarak açıklandıktan sonra, bilgilendirilmiş onam alınarak elde edildi23. Lactiplantibacillus plantarum MK55 16S rRNA gen dizilimi, Lactobacillus curvatus MK8, *L.paracasei* MK73, Lactobacillus fermentum MK77 ve *L.crispatus* MK81 MALDI Biotyper®, matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon - uçuş süreli kütle spektrometrisi ile tanımlandı. Probiyotik olma özellikleri ile tümör baskılama yetenekleri belirlenen suşların çeşitli özellikleri Tablo I'de verilmiştir. Suşlar 37 °C'de deMan, Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyerlerinde üretildi. Çalışmada patojenik suşlar *E.coli* DSM 10973 (Migula 18959 Castellani and Chalmers 1919) ve önceki çalışmalardan elde edilen *E.coli* N18-9 ile *E.coli* N18-2 kullanıldı. Triptik soya besiyerinde 37 °C'de muhafaza edildi. Bakterilerin canlı sayımı (CFU/mL), LAB suşları için MRS agar, *E.coli* suşları için SS agar (Merck) kullanılarak gerçekleştirildi[22].

Tablo I. *Çalışmada Kullanılan Laktik Asit Bakterilerinin Daha Önceki Çalışmada Belirlenen Özellikleri*[23]

Mikroorganizmalar	Düşük pH (log CFU/mL)	%0.3 ST (log CFU/mL)	EPS	PA	% AOA	% TB (CT26)
L.curvatus MK8	8.6	8.7	-	+	50.97	31.2
L.plantarum MK55	8.9	8.85	-	+	52.3	32.4
L.paracasei MK73	7:28	6.6	+	-	56.76	41.1
L.fermentum MK77	9.1	8.7	+	+	54.86	38.1
L.crispatus MK81	8.9	9.04	+	-	57.65	40.2

ST: Safra tuzu, EPS: Ekzopolisakkarit üretimi, PA: Proteolitik aktivite, AOA: Antioksidan aktivite, TB: Tripan mavisi.

Caco-2 Hücrelerine İn Vitro Yapışma

Probiyotik suşlar, yüzey proteinlerinin elde edilmesi için bir saat boyunca 5M lityum klorür (LiCl) (CAS No: 7447-41-8 Sigma-Aldrich) içerisinde bekletildi. Bakteri kültürleri (probiyotik ve patojenik suşlar) santrifüjleme (2100 xg, üç dakika) sonrasında üç kez fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkandı. Hücre yoğunluğu, her kültür için $1x10^8$ CFU/mL elde etmek üzere 600 nm'de absorbans ölçülerek ayarlandı. Ayrı kuyucuklardaki 105 Caco-2 hücresine bir mililitre (yaklaşık $1x10^8$ CFU/mL) probiyotik (yüzey proteinleri olan ve olmayan) ve her bakteri patojeninden 1 ml (yaklaşık $1x10^8$ CFU/mL) ilave edildi. 37 °C'de iki saatlik inkübasyondan sonra, bakteriyel hücreler kuyucuklardan alınıp, Caco-2 hücreleri üç kez 1 ml steril PBS ile yıkandı. Caco-2 hücrelerine yapışan bakteri hücreleri, 1 ml %0.5 (v/v) Triton X-100 (108603 Sigma-Aldrich) ile muamele edilerek çıkarıldı. Karışımların seri dilüsyonlarından daha sonra Tryptic Soy agarlara (104323 Sigma-Aldrich) ekim yapıldı ve 48-72 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bakteri sayısı "en muhtemel sayı" (EMS) yöntemiyle log CFU/mL olarak ifade edildi[22,24]. Bütün kuyucuklar üçerli olarak hazırlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirildi.

Bağırsak Hücre Hatlarına Patojen Yapışmasının İnhibisyonu (Dışlama Ölçümü)

Üçerli olarak hazırlanan deney kuyucukları ve Caco-2 hücre tek tabakaları, steril PBS tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra, Caco-2 hücre hattına antibiyotiksiz hücre kültürü besiyerinde hazırlanan 1 ml probiyotik suş (10^8 CFU/mL) ilave edilip, bir saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Altmış dakikalık inkübasyondan sonra Caco-2 hücrelerine yine aynı şekilde hazırlanmış 1 ml bakteriyel patojen (10^8 CFU/mL) eklendi ve standart koşullarda iki saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, tek tabakalar, yapışmayan hücreleri atmak için üç kez steril PBS ile yıkandı ve ardından hücreler, %0.5 (h/h) Triton X-100 ile parçalandı. Karışımların seri dilüsyonları daha sonra Tryptic Soy agara ekilip, 48-72 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bakteri sayımı EMS yöntemiyle log CFU/mL olarak ifade edildi[22,24].

Bağırsak Hücre Hatlarına Yapışan Patojenin Rekabet Ölçümü

Caco-2 hücrelerinin tek tabakaları steril PBS tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra, antibiyotiksiz hücre kültürü besiyerinde hazırlanan 1 ml (10^8 CFU/mL) her bir probiyotik suş ve 1 ml (10^8 CFU/mL) *E.coli* suşu karışımı her bir kuyucuğa aynı anda konuldu ve iki saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tek tabakalar, steril PBS ile üç kez yıkandı. Hücreler daha sonra %0.5 (h/h) Triton X-100 ile parçalandı. Karışımların seri dilüsyonları daha sonra Tryptic Soy agara ekildi ve 48-72 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bakteri sayısı EMS yöntemi ile log CFU/mL olarak ifade edildi. Bütün deney kuyucukları üçerli olarak hazırlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirildi.

Bağırsak Hücre Hatlarına Yapışan Patojenin Yer Değiştirmesi (Yer Değiştirme Ölçümü)

Caco-2 hücre tek tabakaları üç kez steril PBS tamponu ile yıkandıktan sonra, her bir patojenden (10^8 CFU/mL) antibiyotiksiz hücre kültürü besiyerine hazırlanmış 1 ml Caco-2 hücre hattına ayrı ayrı ilave edilip, bir saat 37 °C'de inkübe edildi. Altmış dakikalık inkübasyondan sonra, bakteri patojenini içeren Caco-2 hücrelerine antibiyotiksiz hücre

kültürü besiyerinde hazırlanan 1 ml probiyotik suş (10^8 CFU/mL) ilave edildi ve iki saat daha 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, hücreler %0.5 (h/h) Triton X-100 ile parçalanmadan önce, yapışmayan hücreleri atmak için tek tabakalar steril PBS ile üç kez yıkandı. Karışımların seri dilüsyonları daha sonra Tryptic Soy agara ekildi ve 48-72 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bu işlemler üçerli tekrar olarak hazırlandı. Bakteri sayısı EMS yöntemi ile log CFU/mL olarak elde edildi[22,24]. Ortalamaları alınıp değerlendirmeleri yapıldı.

İn Vitro İnsan Caco-2 Hücre Hattında Probiyotiklerin Etkinlik Testlerinin Sonrası ELISA ile Sitokinlerin Tayini

Antagonistik etki hücre kültürü deneyleri sonrası toplanan süpernatantlardan kemotaktik Human IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (E-EL-H6008), ölçüm aralığı 7.81-500 pg/mL, anti-enflamatuvar sitokin Human IL-10 ELISA Kit (E-EL-H6154), ölçüm aralığı 1.56-100 pg/mL, toplanan hücre kültürü lizatlarından da Human TLR4 ELISA Kit (E-EL-H5820) (Elabscience, ABD) ölçüm aralığı 6.25-400 pg/mL olarak belirlenmiş olan kitler kullanılarak ölçüldü. Testin uygulanmasında üretici firmanın protokolü esas alınarak uygulandı. Kit içerisindeki bütün çözeltiler, örnekler ve standartlar hazırlandı. Örnekler dilüe edilmeden paralel olarak kuyucuklara eklendi. Absorbanslar 10 dakika içinde ELISA okuyucu (Microplate Reader, BIO-RAD iMark, Hercules, California, ABD) kullanılarak belirtilen nm'de okundu. Paralel kuyucukların sonuçları ortalamaları alınarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlardan probiyotik suşların etkinliği, kit içinde bulunan standartların sınır değerleri dikkate alınarak ve örneklerdeki total protein miktarına göre normalize edilerek hesaplandı.

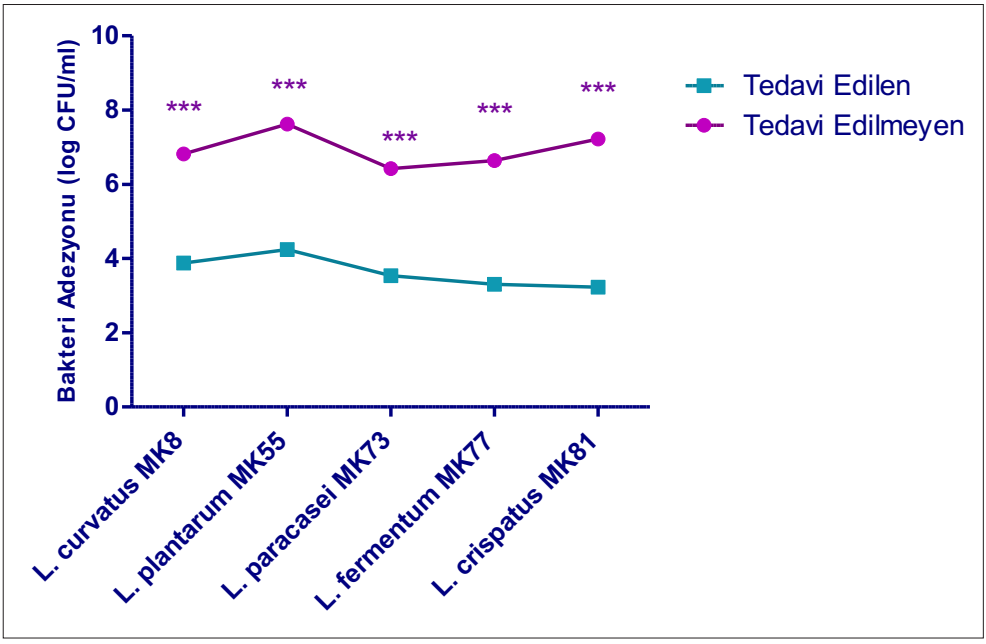
İstatistiksel Analiz

Projede uygulanan yöntemlerden elde edilen sayım verileri üçerli olarak elde edildi ve ortalamaları alınarak grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırıldı. ELISA örnekleri paralelli olarak çalışıldı ve ortalamaları alınarak, negatif ve pozitif kontrollere karşı değerlendirildi. Veriler GraphPad Prisms8 istatistik programına yüklenerek tanımlayıcı testlerin sonuçlarına göre ortalamalar arasındaki farklılıklar için varyant analizi ANOVA testi uygulandı. $p< 0.001$'in altında olanlar anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama ±ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

BULGULAR

L.curvatus MK8 (6.82 log CFU/mL), *Lpb. plantarum* MK55 (7.62 log CFU/mL), *L.paracasei* MK73 (6.42 log CFU/mL), *L.fermentum* MK77 (6.64 log CFU/mL), *L.crispatus* MK81 (7.22 log CFU/mL) suşlarının tamamı Caco-2 hücrelerine yüksek ($p< 0.001$) yapışma kapasitesi göstermiştir. Hücre hattı LiCl ile muamele edildikten sonra yapışma kapasitesinde *L.curvatus* MK8 (3.88 log CFU/mL), *Lpb. plantarum* MK55 (4.24 log CFU/mL), *L.paracasei* MK73 (3.54 log CFU/mL), *L.fermentum* MK77 (3.31 log CFU/mL) ve *L.crispatus* MK81 (3.23 log CFU/mL) için azalma tespit edilmiştir (Şekil 1).

Beş laktobasil suşunun, üç *E.coli* suşu ile Caco-2 hücre monokatmanlarına bağlanmasını dışlama yoluyla önleme yeteneği incelenmiştir. *E.coli* DSM suşuna karşı laktobasil suşlarının dışlama kapasiteleri karşılaştırıldığında en yüksek değer *Lpb. plantarum* MK55 (4.86 log CFU/mL) suşunda, en düşük değer ise *L.paracasei* MK73 (3.24 log CFU/mL)

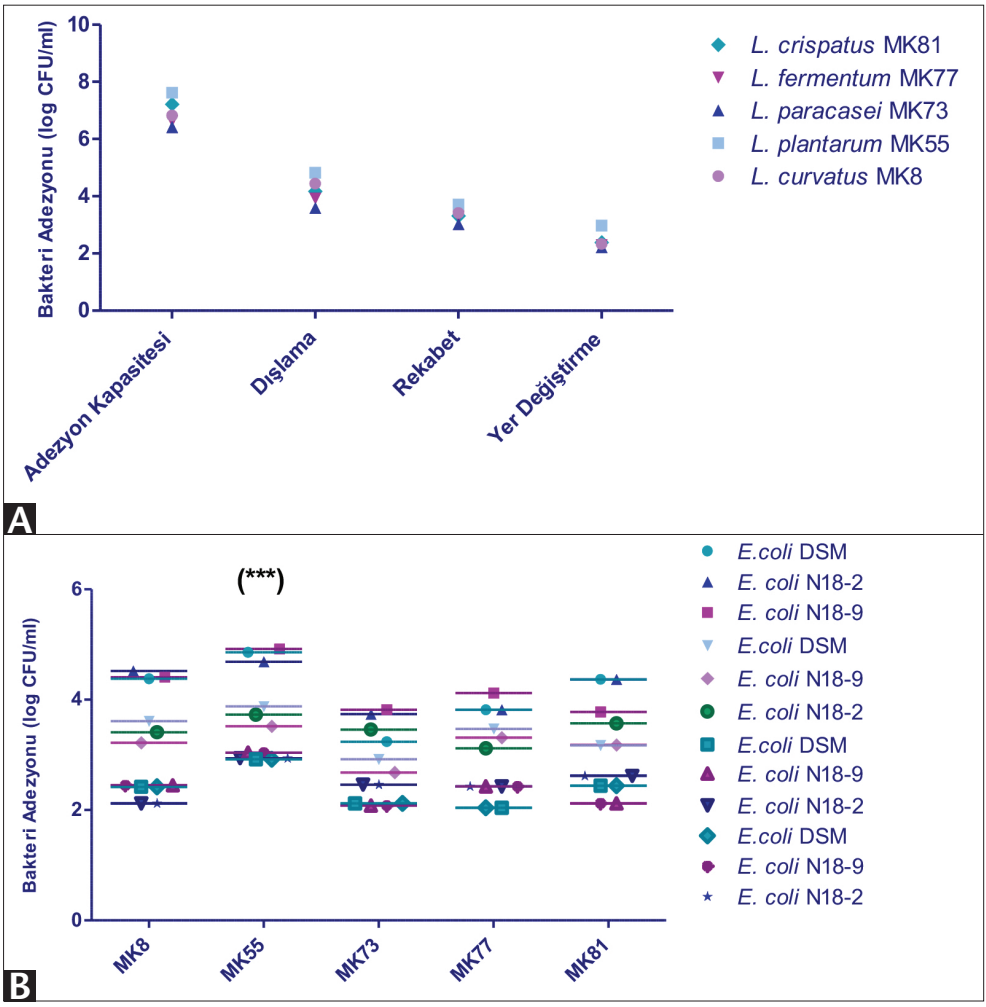


Şekil 1. *5M LiCl muamelesinden önce ve sonra LAB'ın Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışma kapasitesi. Yıldız işaretleri, suşların muamele öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklarını göstermektedir (***, p< 0.001).*

suşunda belirlenmiştir. *E.coli* N18-9 suşuna karşı laktobasil suşları arasında *Lpb. plantarum* MK55 (4.92 log CFU/mL) ile en yüksek, *L.crispatus* MK81 (3.78 log CFU/mL) ile en düşük dışlama kapasitesi tespit edilmiştir. *E.coli* N18-2 suşuna karşı laktobasil suşlarının dışlama kapasitesi değerlendirmesinde *Lpb. plantarum* MK55 (4.69 log CFU/mL) en yüksek, *L.paracasei* MK73'in (3.74 log CFU/mL) ise en düşük sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Sayısal verilerin karşılaştırması ise Tablo II'de verilmiştir.

Laktobasil suşları önce Caco-2 hücre monokatmanlarına yapıştığında, *Lpb. plantarum* MK55 suşu anlamlı olmak üzere (p< 0.001) *E.coli* suşlarının Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışmasını önledikleri görülmüştür.

Laktobasil suşlarının, *E.coli* suşları ile Caco-2 hücre monokatmanlarına bağlanmak için rekabeti incelenmiştir. *E.coli* DSM suşuna karşı laktobasil suşlarının dışlama kapasiteleri karşılaştırıldığında en yüksek değer *Lpb. plantarum* MK55 (3.88 log CFU/mL), en düşük değer ise *L.paracasei* MK73 (2.92 log CFU/mL) için belirlenmiştir. *E.coli* N18-9 suşuna karşı laktobasil suşlarının arasında *Lpb. plantarum* MK55'in (3.52 log CFU/mL) en yüksek, *L.paracasei* MK73'ün (2.68 log CFU/mL) ise en düşük rekabet edebildiği tespit edilmiştir. *E.coli* N18-2 suşuna karşı laktobasil suşlarının rekabet kapasitesi değerlendirildiğinde *Lpb. plantarum* MK55'in (3.73 log CFU/mL) en yüksek, *L.fermentum* MK77'in (3.12 log CFU/mL) ise en düşük sonucu verdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Sayısal verilerin karşılaştırması Tablo II'de verilmiştir.



Şekil 2. *E.coli'nin Caco-2 hücrelerine yapışmasının ve ardından LAB tarafından dışlanma, rekabet ve yer değiştirmesinin ortalama değerleri Şekil a'da gösterilmektedir. Şekil b'de ise E.coli'nin dışlanması, rekabeti ve LAB tarafından yer değiştirmesine ilişkin sayım verileri gösterilmektedir. Yıldız işaretleri, MK55 suşu ile diğer suşlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir (***, p< 0.001).*

E.coli suşları ile Caco-2 hücre monokatmanlarına birlikte muamele edildiklerinde, laktobasil suşlarının tamamının Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışmak için rekabet edebildiği ve kontrole göre *E.coli* suşlarının yapışmasını anlamlı bir fark ile (p< 0.001) engellediği tespit edilmiştir.

Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışan *E.coli* suşları ile laktobasil suşlarının, yer değiştirme potansiyeli incelenmiştir. *E.coli* DSM suşuna karşı laktobasil suşlarının rekabet kapasiteleri en yüksek olarak *Lpb. plantarum* MK55 (2.92 log CFU/mL) suşunda, en düşük olarak *L.fermentum* MK77 (2.04 log CFU/mL) suşunda tespit edilmiştir. *E.coli* N18-9 suşuna karşı laktobasil suşlarının rekabet kapasiteleri karşılaştırıldığında en yüksek *Lpb.*

Tablo II. *Dışlama, Rekabet ve Yer Değiştirme Deneylerinden Elde Edilen Her Bir Suş İçin Bakteri Sayıları (log CFU/mL)*

Dışlama	**MK8**	**MK55**	**MK73**	**MK77**	**MK81**
E.coli DSM	4.38	4.86 (***)	3.24	3.82	4.37
E.coli N18-9	4.41	4.92 (***)	3.82	4.12	3.78
E.coli N18-2	4.52	4.69 (***)	3.74	3.82	4.37
Rekabet	**MK8**	**MK55**	**MK73**	**MK77**	**MK81**
E.coli DSM	3.61	3.88 (***)	2.92	3.47	3.17
E.coli N18-9	3.22	3.52 (***)	2.68	3.31	3.18
E.coli N18-2	3.41	3.73 (***)	3.46	3.12	3.57
Yer Değiştirme	**MK8**	**MK55**	**MK73**	**MK77**	**MK81**
E.coli DSM	2.42	2.92 (***)	2.12	2.04	2.44
E.coli N18-9	2.45	3.04 (***)	2.08	2.43	2.12
E.coli N18-2	2.12	2.94 (***)	2.46	2.43	2.62

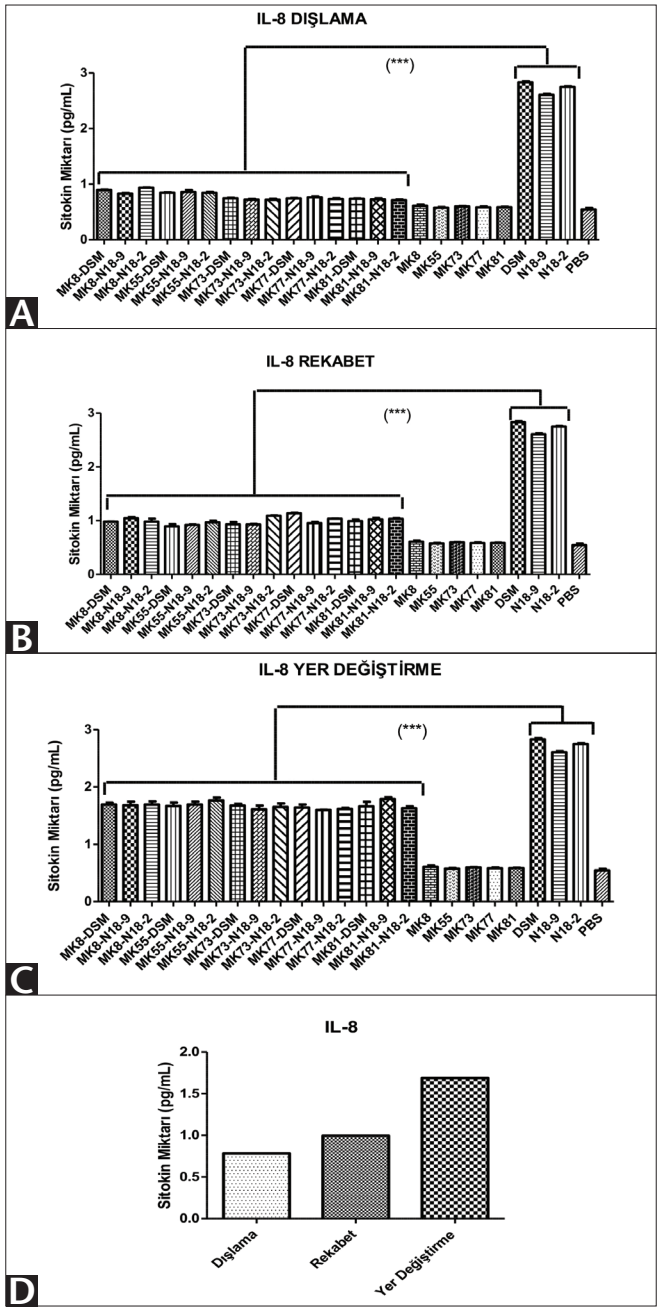
Yıldız işaretleri, MK55 suşu ile diğer suşlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir (***, $p< 0.001$).

plantarum MK55'in (3.04 log CFU/mL) ve en düşük olarak *L.paracasei* MK73'in (2.08 log CFU/mL) olduğu belirlenmiştir. *E.coli* N18-2 suşuna karşı laktobasil suşlarının rekabet kapasitesinin en düşük *L.curvatus* MK8'de (2.12 log CFU/mL) ve en yüksek ise *Lpb. plantarum* MK55'te (2.94 log CFU/mL) olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). Sayısal verilerin karşılaştırması ve anlamlılıkları Tablo II'de verilmiştir.

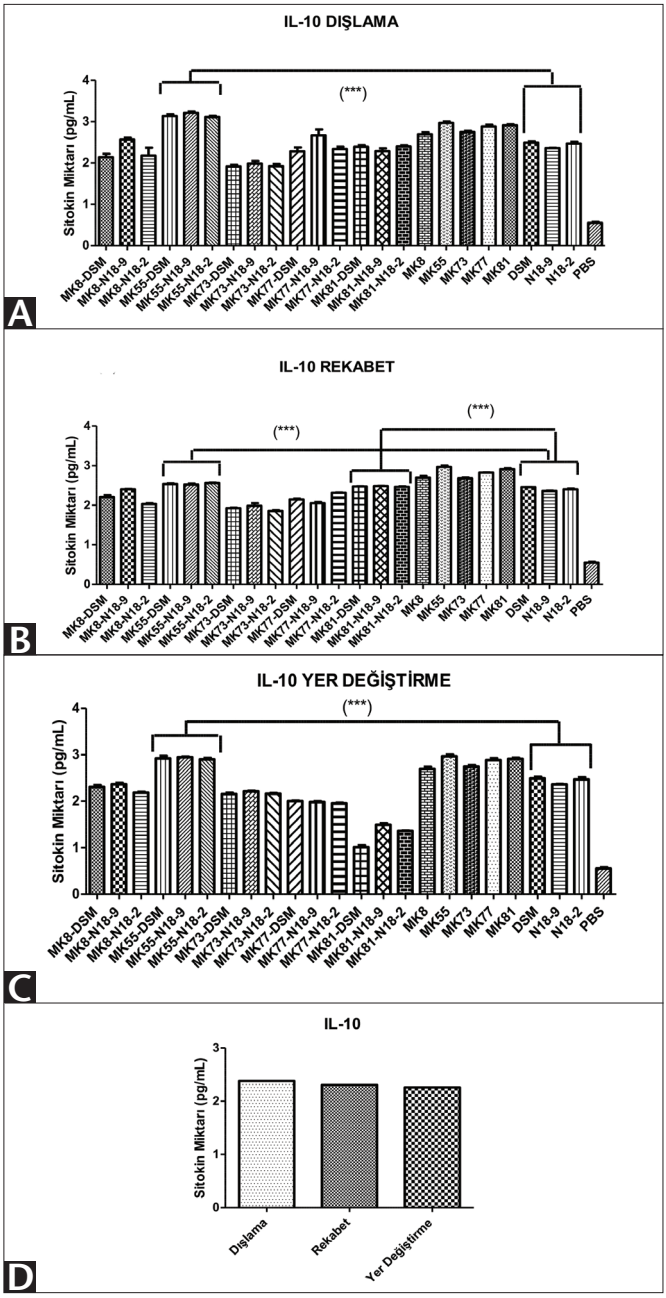
E.coli suşlarının Caco-2 hücre monokatmanlarına önceden yapışmasına rağmen *Lpb. plantarum* MK55 suşunun anlamlı olmak üzere ($p< 0.001$) , Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışmak için *E.coli* suşları ile yer değiştirebildikleri belirlenmiştir.

Tablo II'de görüldüğü gibi probiyotik bakteri suşları ile *E.coli* suşları arasında gerçekleştirilen dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri sayım sonuçları suşlar arasında farklılık göstermiştir. Bu farklılığa rağmen MK55 suşunun her bir deney grubunda en yüksek yapışma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ANOVA testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Gruplar arası farklılıklar anlamlı olarak saptanmıştır ($p< 0.001$).

Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri sonrasında elde edilen hücre kültürü süpernatantlarından IL-8 seviyeleri Şekil 3'te gösterilmiştir. Kullanılan beş adet LAB, üç adet *E.coli* suşu ve PBS ile hazırlanmış olan negatif-pozitif kontrolün sonuçları Şekil 3'te sunulmuştur. Şekil 3a'da gösterildiği gibi laktobasiller tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinin IL-8 seviyeleri, *E.coli* tarafından tetiklenenlerden önemli ölçüde düşük olarak bulunmuştur ($p< 0.001$). Şekil 3b'de ise benzer şekilde, laktobasil suşları *E.coli* suşlarının IL-8 üretimini önemli ölçüde ($p< 0.001$) inhibe etmiştir. Şekil 3c'de ise benzer bir sonuç gösterilmiştir. *E.coli* kaynaklı Caco-2 hücrelerinin IL-8 üretimi önemli ölçüde ($p< 0.001$) engellenebilmiştir. Ayrıca Şekil 3d'de dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri IL-8 seviyelerinin ortalama değerlerinin kıyaslamaları sunulmuştur. Bu deney sonucunda, beş LAB suşunun tamamının *E.coli* yapışmasını inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olabilecek Caco-2 hücre monokatmanları tarafından *E.coli* kaynaklı IL-8 üretimini hafifletebilmiş olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3. *IL-8 düzeyleri üzerinde antagonistik etki. Caco-2 hücrelerinde IL-8 düzeyleri, laktobasillerin dışlama* ***(a)****, rekabet* ***(b)*** *ve yer değiştirme* ***(c)*** *deneyleriyle belirlenmiştir. Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneylerindeki IL-8 düzeylerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması* ***(d)****'de verilmiştir. Yıldız işaretleri, karşılaştırılan suşlar ile E.coli suşları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (***, p< 0.001).*



Şekil 4. *IL-10 düzeyleri üzerinde antagonistik etki. Caco-2 hücrelerinde IL-10 düzeyleri, laktobasillerin dışlama* ***(a)****, rekabet* ***(b)*** *ve yer değiştirme* ***(c)*** *deneyleriyle belirlenmiştir. Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneylerindeki IL-10 düzeylerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması* ***(d)****'de verilmiştir. Yıldız işaretleri, karşılaştırılan suşlar ile E.coli suşları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (***, p< 0.001).*

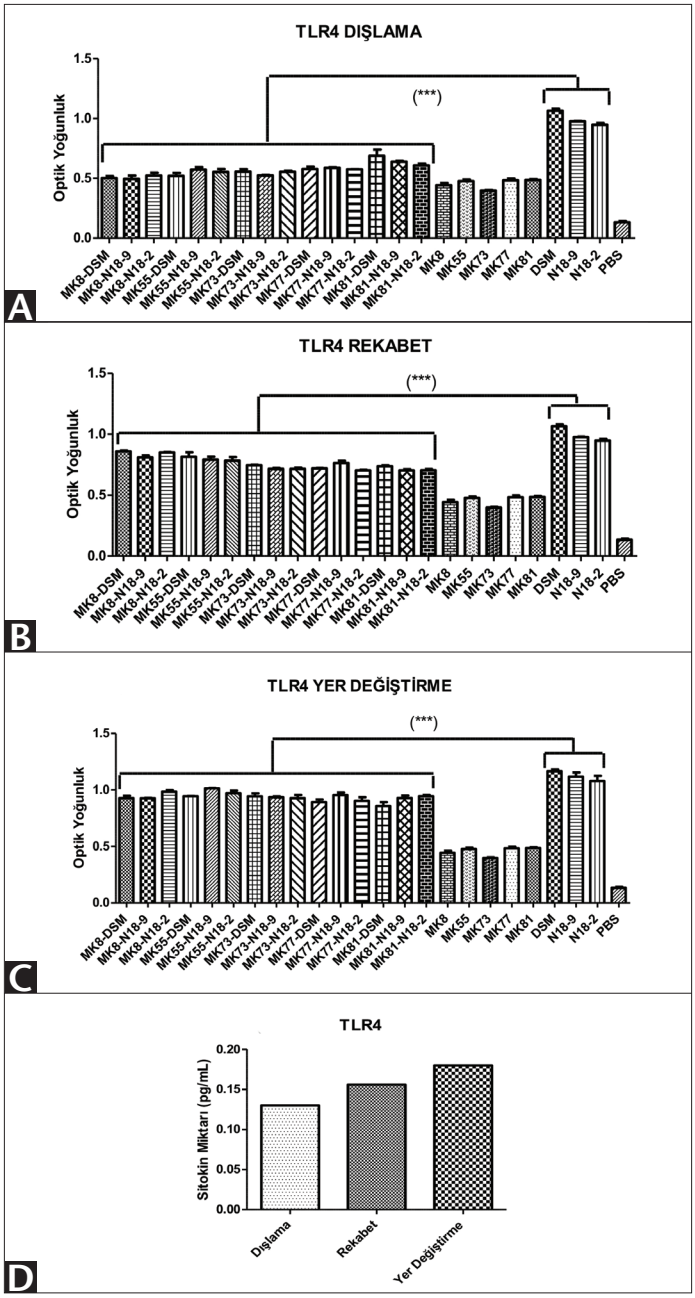
Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri sonrasında elde edilen hücre kültürü süpernatantlarından IL-10 seviyeleri Şekil 4'te verilmiştir. Bu şekilde kullanılan LAB suşları, *E.coli* suşları ve PBS ile hazırlanmış olan negatif-pozitif kontrol sonuçları sunulmuştur. Şekil 4a'da görüldüğü gibi laktobasiller tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinin IL-10 seviyeleri, *E.coli* tarafından tetiklenenlerden önemli ölçüde farklı bulunmamakla beraber daha yüksek olarak gözlenmiştir. Oluşturulan MK55 ile DSM, N18-9 ve N18-2 *E.coli* kombinasyonlarının IL-10 seviyeleri anlamlı bir şekilde ($p< 0.001$) yükselmiştir. Şekil 4b'de ise MK55 ve MK81 ile oluşturulan *E.coli* kombinasyonlarında anlamlı bir şekilde IL-10 üretiminin ($p< 0.001$) arttığı gözlenmiştir. Şekil 4c'de görüldüğü gibi *E.coli* kaynaklı Caco-2 hücrelerinin IL-10 üretimini MK55 suşu önemli ölçüde ($p< 0.001$) arttırabilmiştir. Şekil 4d'de dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri IL-10 seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Bu deney sonucunda, LAB suşlarından MK55'in *E.coli* yapışmasını inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olabilecek Caco-2 hücre monokatmanları tarafından *E.coli* kaynaklı IL-10 üretimini önemli ölçüde arttırabilmiş olduğu kanıtlanmıştır.

Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri sonrasında hücre kültürü lizatlarından elde edilen TLR4 seviyeleri Şekil 5'te verilmiştir. Kullanılan LAB suşları, *E.coli* suşları ve PBS ile hazırlanmış olan negatif-pozitif kontrol sonuçları bu şekil içerisinde gösterilmiştir. Şekil 5a'da görüldüğü gibi laktobasiller tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinin TLR4 seviyeleri, *E.coli* tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinden önemli ölçüde düşük olarak bulunmuştur. TLR4 miktarında *E.coli* eklendiğinde artış izlenmiş fakat sadece *E.coli* bulunan kuyucuklara göre LAB+*E.coli* bulunanlarda anlamlı derecede baskılandığı ($p< 0.001$) görülmüştür. Şekil 5b'de ise benzer şekilde, laktobasil suşları *E.coli* suşlarının TLR4 üretimini önemli ölçüde ($p< 0.001$) inhibe edebilmiştir. Şekil 5c'de benzer sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. *E.coli* kaynaklı Caco-2 hücrelerinin TLR4 üretimi önemli ölçüde ($p< 0.001$) engellenebilmiştir. Şekil 5d'de ise dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri TLR4 seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. Bu deney sonucunda, beş LAB suşunun tamamının, *E.coli* yapışmasını inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olabilecek Caco-2 hücre monokatmanları tarafından *E.coli* kaynaklı TLR4 üretimini hafifletebilmiş olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Laktobasillerin temel özelliklerinden biri epitel hücrelerine yapışma kapasiteleridir ve bu epitel hücrelerindeki yapışma ve istila bölgeleri için patojenlere karşı rekabet avantajı sağlayabilir[2]. Bu mekanizmayı anlayabilmek açısından kullanılan Caco-2 hücreleri, normal ince bağırsak villuslarından farklı olan birkaç belirteç ifade eder ve probiyotik bakterilerin yapışmasında ve patojenlerin istilasında mükemmel bir in vitro model görevi görmektedir[13]. Ayrıca Caco-2 tek tabakalarının uygun protokolle 18-21 gün içinde homojen bir şekilde farklılaştığı kaynaklarda belirtilmiştir[25]. Bu çalışmada belirtilen kaynaktaki protokol uygulanarak farklılaşması sağlanmıştır ve bu halk sağlığı tehdidini etkili bir şekilde ortadan kaldırabilecek probiyotikler üzerinde alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada insan dışkısından izole edilen ve probiyotik olma özellikleri belirlenen LAB suşları kullanılmıştır[23]. Kullanılan LAB suşlarının Caco-2 hücrele-



Şekil 5. *TLR4 düzeyleri üzerinde antagonistik etki. Caco-2 hücrelerindeki TLR4 düzeyleri, laktobasillerin dışlama* ***(a)****, rekabet* ***(b)*** *ve yer değiştirme* ***(c)*** *deneyleriyle belirlenmiştir. Dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneylerindeki TLR4 düzeylerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması* ***(d)****'de verilmiştir. Yıldız işaretleri, karşılaştırılan suşlar ile E.coli suşları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (***, p< 0.001).*

rine in vitro yapışma kapasiteleri, bakteri sayıları belirlenmesi amacıyla kültürel yöntem kullanılarak yapılmıştır. Suşların tamamı Caco-2 hücrelerine büyük bir yapışma kapasitesi göstermiştir. Hücre hattı LiCl ile muamele edildikten sonra yapışma kapasitesinde azalma tespit edilmiştir. Bu sonuç, Jessie Lau ve arkadaşlarının[22] *Lpb. plantarum* 0612 ile yaptıkları çeşitli kolon ortamlarında seçilmiş gıda kaynaklı enteropatojenlerin yapışması üzerindeki antagonistik etkileri çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Zommiti ve arkadaşları26, Pediococcus pentosaceus MZF16'nın, önemli bir gıda kaynaklı patojen olan Listeria monocytogenes CIP 55143 yapışmasını güçlü bir şekilde engellediğini bildirmiştir. Bu çalışma ile benzer şekilde çalışmamızda, Caco-2 hücrelerine en yüksek yapışma gösteren suş olan *Lpb. plantarum* MK55, diğer probiyotik suşlar ile birlikte, *E.coli* suşlarının Caco-2 monokatmanlarına yapışmasına karşı yüksek bir inhibisyon oranı göstermiştir.

Çalışmada Caco-2 hücrelerine *E.coli* suşlarının yapışmasının inhibisyonunu yani dışlama yeteneğini gözleyebilmek için bakteriler sayılmıştır. Laktobasil suşlarının tamamı önce Caco-2 hücre monokatmanlarına yapıştığında, *E.coli* suşlarının Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışmasını önledikleri görülmüştür. Bu sonuç kullanılan LAB suşlarının gastrointestinal sistemde kolonize olabileceğini ve probiyotik işlevlere sahip olabileceklerini göstermiştir. *E.coli* suşlarından daha yüksek bir dışlama derecesi gösteren bu probiyotik suşların, *E.coli*'nin etken olabileceği bağırsak hastalıklarının önlenmesinde olası kullanımı söz konusu olabilir. Genel olarak, probiyotik suşlar enterosit patojen reseptörlerindeki sterik engelleme yoluyla patojenik bakterilerin bağlanmasını engelleyebilir[27]. Bu konudaki ileri çalışmalarda *Lpb. plantarum* BMCM12'nin ortama saldığı proteinlerin, patojenin mukus katmanlarına yapışmasını engellemede rol oynadığı gösterilmiştir[28]. Çalışmada laktobasil suşlarının, *E.coli* suşları ile Caco-2 hücrelerine bağlanmak için rekabet özellikleri incelenmiş ve laktobasil suşları ile *E.coli* suşlarının, Caco-2 hücre monokatmanlarında birlikte yer aldıklarında, laktobasil suşlarının Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışmak için rekabet edebildiği ve *E.coli* suşlarının yapışmasını engellediği tespit edilmiştir. Çalışmalar, bakterilerin yüzey hidrofobisitesinin yalnızca bakterilerin konakçıya yapışmasıyla değil aynı zamanda patojenik bakterilerin uzaklaştırılmasıyla da ilişkili olduğunu göstermiştir[29]. Epitel hücre bağlama yeteneğine sahip probiyotikler, patojen bağlanmasını rekabetçi bir şekilde önleyebilir ve böylece kolonizasyonlarını engelleyebilir[10]. Seçilen LAB suşlarının aynı yüzey reseptörleri için test edilen enteropatojenlerle rekabet edebildiği ve/veya bağırsak epitel hücrelerindeki potansiyel bağlanma bölgelerini işgal edebildiği ve böylece bağırsak hastalıklarıyla mücadelede potansiyel bir terapötik stratejiyi temsil ettiği söylenebilir. Benzer şekilde Feng ve arkadaşları[4] *Lpb. plantarum* P2'nin, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 suşunun Caco-2 hücrelerine yapışmasına ve istila etmesine karşı güçlü bir inhibisyon gösterdiğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada *L.casei* ve *Lpb. plantarum*, *L.monocytogenes*'in HT-29 hücrelerine yapışmasını önemli ölçüde azaltarak, rekabet yeteneği göstermişlerdir[3].

Caco-2 hücre monokatmanlarına yapışan *E.coli* suşları ile laktobasil suşlarının, yer değiştirme potansiyeli incelendiğinde *E.coli* suşlarının, Caco-2 hücre monokatmanlarına önceden yapışmasına rağmen laktobasil suşlarının Caco-2 hücre monokatmanlarına ya-

pışmak için *E.coli* suşları ile yer değiştirebildikleri belirlenmiştir. Bu tür antagonistik etkiler, patojenler için reseptörler üzerindeki büyüklükten kaynaklanan engelleme mekanizması, metabolik ürünlerin (organik asitler, ekzopolisakkaritler) ve bakteriyosinlerin üretimi gibi diğer inhibe edici mekanizmalarla açıklanabilir. Rouhi ve arkadaşları çalışmalarında30 *Lpb. plantarum* TW57-4'ün, *L.monocytogenes* ATCC 19115'te biyofilm oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. *Lpb. plantarum*'un *L.monocytogenes* gibi patojenik bakterilerin insan bağırsağının epitel hücreleri ve kolonuna yapışmasını ve invazyonunu etkili bir şekilde azalttığı ve engellediği tespit edilmiştir.

Sitokinler, pro-enflamatuvar faktörler ve anti-enflamatuvar faktörler dahil olmak üzere bağışıklık tepkilerini düzenleyebilen ve aracılık edebilen moleküler habercilerdir. Bu rolleri sayesinde canlı vücudu enfeksiyon ve diğer patolojik durumlarla savaşabilmektedir[31]. Bu çalışmada, LAB'ın, *E.coli* suşlarının dışlanmasına sebep olduğu sayısal olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın devamında dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneyleri sonrasında elde edilen Caco-2 hücre kültürü süpernatant ve lizatlarından IL-8 (kemokin), IL-10 (anti-enflamatuvar), TLR4 düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Laktobasiller tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinin IL-8 seviyeleri, *E.coli* suşları tarafından değiştirilememiş ve düşük olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde, rekabet deneylerinde de laktobasil suşları *E.coli* suşlarının IL-8 üretimini önemli ölçüde inhibe edebilmiştir. Yer değiştirme deneyinde *E.coli* kaynaklı Caco-2 hücrelerinin IL-8 üretimi probiyotik suşlar tarafından önemli ölçüde engellenebilmiştir. Cao ve arkadaşları[32], laktik asit bakterisi *L.paracasei* XII ile tedavi edilen enfekte farelerde pro-enflamatuvar faktörlerin seviyesinin azaldığını bulmuşlardır. Bu veri çalışmanın sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir. Bir başka çalışmada 19 farklı laktobasil, bifidobakteri ve stafilokok suşu, *E.coli* O157:H7 str. EDL933 ile enfekte edilmiş HT29 hücrelerinin IL-8 yanıtını düzenleme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Test edilen suşlardan yedisinin IL-8 yanıtında %30'dan fazla azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20086 suşu, EDL933 ile enfekte edilmiş hücrelerin IL-8 salgılanmasında yaklaşık %50'lik bir azalmaya neden olurken, *B.adolescentis* DSMZ 20083 suşu IL-8 seviyelerini %15'e kadar azaltabilmiştir. LAB, test edilen EHEC suşlarını aynı şekilde etkilememiştir. Bu örnek, koruyucu etkinin suş özgüllüğünü açıkça göstermektedir12. Bu ve benzeri çalışmalarda ticari suşların antagonistik etkilerinin üzerinde durulmuştur. Fakat önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi tümör baskılama ya da yara iyileşmesi gibi konularda türe hatta suşa özgü farklılıklar görülmektedir[23,33].

Grangette ve arkadaşları çalışmalarında[34] *L.plantarum* NCIMB8826 suşunun pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF-α, IL-1β, IL-6 ve IL-8) salgılanmasını azalttığını, aynı zamanda IL-10 üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Bu immünomodülatör özellikler ile *L.plantarum* NCIMB8826 suşunun bağışıklık tepkilerini modüle edebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da IL-8 seviyeleri düşük bulunurken, IL-10 ortalama seviyelerinin anlamlı olmamakla birlikte yükseldiği dikkat çekmektedir. Özellikle MK55 ile DSM, N18-9 ve N18-2 *E.coli* kombinasyonlarının dışlama, rekabet ve yer değiştirme deneylerinin hepsinde IL-10 seviyeleri anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Bu deney sonucunda, LAB suş-

larından MK55'in *E.coli* yapışmasını inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olabilecek Caco-2 hücre monokatmanları tarafından *E.coli* kaynaklı IL-10 üretimini önemli ölçüde arttırabilmiş olduğu gösterilmiştir. Na Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada[35] anne sütünden izole edilen *L.rhamnosus* SHA113'ün, anti-enflamatuvar faktör IL-10 seviyesini önemli ölçüde artırdığını ve farelerde *E.coli*'nin gıda kaynaklı enfeksiyonu üzerinde iyi bir terapötik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Tedaviden sonra, hücrelerdeki anti-enflamatuvar faktörlerin seviyesinin arttığını belirtmişlerdir, bu da bu çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır.

Ökaryotik hücreler laktobasil suşlarıyla temas halinde olduğunda, özellikle IL-6, IL-8 ve IL-10 olmak üzere çeşitli sitokinlerin salgılanma düzeylerinde değişiklikler olduğu, laktobasillerin etkisi altında modüle edildiği, benzer veriler ile daha önceki raporlarda bildirilmiştir[36]. Çalışmamızda LAB'ların Caco-2 hücreleri üzerinde gösterdiği anti-enflamatuvar yanıtı teşvik eden ve pro-enflamatuvar yanıtı sınırlayan bu birleşik etki, iltihap yanıtlarının sınırlandırılmasında da etkili olabilir. Bağırsak epitel hücreleri tarafından sitokin üretiminin probiyotik indüksiyonunun hem suşa özgü hem de doza bağlı olduğu bilinmektedir. IL-10 seviyelerindeki farklılığın sebebinin de suşa bağlı olduğu düşünülmektedir.

TLR4, enflamatuvar bir süreçte aşırı büyüme eğiliminde olan Enterobacteriaceae ailesi gibi gram (-) bakterilerinin zarında bulunan LPS'yi tanımaktadır. Enflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarının kolon mukozasında, yüksek *Enterobacteriaceae* ve *Bacteroides* konsantrasyonları şiddetli inflamasyon ve TLR4 artışı ile ilişkilendirilmiştir[37]. Bu çalışmada dışlama deneyinde laktobasiller tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinin TLR4 seviyeleri, *E.coli* tarafından tetiklenen Caco-2 hücrelerinden önemli ölçüde düşük olarak bulunmuştur. TLR4 miktarında *E.coli* suşları eklendiğinde artış izlenmiş fakat sadece *E.coli* suşları bulunan kuyucuklara göre LAB ve *E.coli* suşlarının birlikte bulunduğu kuyucuklarda anlamlı derecede baskılandığı görülmüştür. Rekabet deneyinde ise benzer şekilde, laktobasil suşları *E.coli* suşlarının TLR4 üretimini önemli ölçüde inhibe edebilmiştir. Yer değiştirme deneyinde durum çok farklı değildir. *E.coli* kaynaklı Caco-2 hücrelerinin TLR4 üretimi önemli ölçüde engellenebilmiştir. Bu deney sonucunda, beş LAB suşunun tamamının *E.coli* yapışmasını inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olabilecek Caco-2 hücre monokatmanları tarafından *E.coli* kaynaklı TLR4 üretimini hafifletebilmiş olduğu gösterilmiştir.

Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar, *L.curvatus* MK8, *Lpb. plantarum* MK55, *L.paracasei* MK73, *L.fermentum* MK77, *L.crispatus* MK81 probiyotiklerinin bağırsaktaki patojenik bakteriyel yapışmayı (dışlama, rekabet, yer değiştirme) inhibe edebildiklerini göstermiştir. Ardından pro-enflamatuvar sitokinleri yukarı düzenleyebildiği ve bağırsaktaki anti-enflamatuvar sitokinleri aşağı düzenleyebildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar bu laktobasillerin antagonistik etkileri hakkında aydınlatıcı bilgiler sunarak probiyotik olma özelliklerini güçlendirmektedir. Ayrıca bu veriler, özellikle *Lpb. plantarum* MK55 suşu olmak üzere kullanılan suşların faydalı etkileri açısından daha fazla incelenebileceğini ve gastrointestinal enfeksiyon hastalıklarını kontrol etmek için yeni bir aday probiyotik olarak sunulabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan faydalı probiyotik suşlarının altta yatan etki mekanizmasını aydınlatmak, ayrıca bu probiyotiklerin enfeksiyon sürecini kesintiye uğratma ve böylece *E.coli* enfeksiyonunun neden olduğu insan hastalıklarını önleme potansiyelini ortaya koymak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda hayvan deneyleri planlanarak bu konudaki in vivo veriler değerlendirmeye alınacaktır. Klinik olarak kullanım açısından yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmada insan orijinli laktik asit bakterilerinin kullanılması, Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 10/05/2017 ve Karar no: 288).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

MADDİ DESTEK

Bu çalışma, Türkiye Bilim ve Teknolojik Araştırma Konseyi (TÜBİTAK) tarafından 124S505 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kahraman M, Karahan AG. Tumor suppressor effects of probiotics. Turk Hij ve Deney Biyol Dergisi 2018; 75: 421-42. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.15428
2. Poimenidou SV, Caccia N, Paramithiotis S, Hébraud M, Nychas GJ, Skandamis PN. Influence of temperature on regulation of key virulence and stress response genes in Listeria monocytogenes biofilms. Food Microbiol 2023; 111: 104190. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104190
3. Zadeh G, Asgharzadeh R, Darbandi S A, Aliramezani A, Jazi MF. Characterization of bacteriocins produced by Lactobacillus species against adhesion and invasion of Listeria monocytogenes isolated from different samples. Microbial Pathogenesis 2022; 162: 105307. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105307
4. Feng J, Liu P, Yang X, Zhao X. Screening of immunomodulatory and adhesive Lactobacillus with antagonistic activities against Salmonella from fermented vegetables. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2015; 31(12): 1947-54. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1939-6
5. Schoster A, Kokotovic B, Permin A, Pedersen PD, Bello FD, Guardabassi L. In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and Clostridium perfringens by commercial probiotic strains. Anaerobe 2013; 20: 36-41. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.006
6. Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella typhimurium. International Journal of Food Microbiology 2007; 115(3): 307-12. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007
7. Johnson-henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. Cellular Microbiology 2007; (2): 356-67. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x
8. Wine E, Gareau MG, Johnson-Henry K, Sherman PM. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of Campylobacter jejuni invasion of human intestinal epithelial cells. FEMS Microbiology Letters 2009; 300(1): 146-52. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x
9. Zhang YC, Zhang LW, Tuo YF, Guo CF, Yi HX, Li JY, et al. Inhibition of Shigella sonnei adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. Research in Microbiology 2010; 161(8): 667-72. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.06.005

10. Yu X, Jääskeläinen SA, Koort J, Lindholm A, Rintahaka J, Ossowski I, et al. A comparative characterization of different host-sourced Lactobacillus ruminis strains and their adhesive, inhibitory, and immunomodulating functions. Front Microbiol 2017; 8: 1-17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00657

11. Preising J, Gleinser PM, Wei H, Blum S, Eikmanns BJ, Niess JH, et al. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 3048-51. https://doi.org/10.1128/AEM.03127-09

12. Stöber H, Maier E, Schmidt H. Protective effects of Lactobacilli, Bifidobacteria and Staphylococci on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. Int J Food Microbiol 2010; 144: 133-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.010

13. Belguesmia Y, Domenger D, Caron J, Dhulster P, Ravallec R, Drider D, et al. Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells. J Funct Foods 2016; 24: 276-86. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.014

14. Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. Microbiology and Immunology 2003; 47(6): 405-9. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03377.x

15. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infection and Immunity 2008; 76(4): 1340-8. https://doi.org/10.1128/IAI.00778-07

16. Matsumoto T, Kagaya S, Shinohara M, Wakiguchi H, Matsumoto T, Takahata Y, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and Lactobacillus casei Suppress *Escherichia coli*-Induced Chemokine Expression in Intestinal Epithelial Cells. Int Arch Allergy Immunol 2009; 148(1): 45-58. https://doi.org/10.1159/000151505

17. Zeuthen LH, Fink LN, Metzdorff SB, Kristensen MB, Licht TR, Nellemann C, et al. Lactobacillus acidophilus induces a slow but more sustained chemokine and cytokine response in naïve foetal enterocytes compared to commensal *Escherichia coli*. BMC Immunology 2010; 11: 2. https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-2

18. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human Intestinal Epithelial Cells Are Broadly Unresponsive to Toll-Like Receptor 2-Dependent Bacterial Ligands: Implications for Host-Microbial Interactions in the Gut. The Journal of Immunology 2003; 170(3): 1406-15. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1406

19. Lan JG, Cruickshank SM, Singh C I, Farrar M, Lodge JPA, Felsburg PJ, et al. Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. World Journal of Gastroenterology 2005;11(22): 3375-84. https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i22.3375

20. Fu Y, Kim H, Lee DS, Han A, Heine H, Zamyatina A, et al. Structural insight into TLR4/MD-2 activation by synthetic LPS mimetics with distinct binding modes. Nat Commun 2025; 16(1): 4164. https://doi.org/10.1038/s41467-025-59550-3

21. Nantavisai K, Puttikamonkul S, Chotelersak K, Taweechotipatr M. In vitro adhesion property and competition against enteropathogens of Lactobacillus strains isolated from thai infants. Songklanakarin J Sci Technol 2018; 40: 69-74.22.

22. Jessie Lau LY, Chye FY. Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. Food Control 2018; 91: 237-47. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.001

23. Kahraman M, Karahan AG, Terzioğlu ME. Characterization of Some Microorganisms from Human Stool Samples and Determination of Their Effects on CT26 Colorectal Carcinoma Cell Line. Curr Microbiol 2022; 79: 225. https://doi.org/10.1007/s00284-022-02915-4

24. Choi AR, Patra JK, Kim WJ, Kang SS. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. Front Microbiol 2018; 9: 1-12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963

25. Verhoeck K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models. Impact Food Bioact Heal Vitr Ex Vivo Model 2015; 103-11. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4

26. Zommiti M, Bouffartigues E, Maillot O, Barreau M, Szunerits S, Sebei K, et al. In vitroassessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of Pediococcus pentosaceus MZF16 isolated from artisanal tunisian meat "dried ossban. Front Microbiol 2018; 9: 1-15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02607

27. Bermudez-Brito A, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil M. Probiotic Mechanisms of Action. Ann Nutr Metab 2012; 61(2): 160-74. https://doi.org/10.1159/000342079

28. Lee HB, Kim KH, Kang GA, Lee KG, Kang SS. Antibiofilm, AntiAdhesive and Anti-Invasive Activities of Bacterial Lysates Extracted from Pediococcus acidilactici against Listeria monocytogenes. Foods 2022; 11. https://doi.org/10.3390/foods11192948

29. Zeng H, Liu Y, Huang K, Chen H, Yang B, Wang J. Lactiplantibacillus plantarum A1, C1 and C10 Are Potential Probiotics Isolated from Pineapple Residual Silage. Microorganisms 2023; 11: 29. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010029

30. Rouhi A, Falah F, Azghandi M, Behbahani BA, Mortazavi SA, Yazdi FT, et al. Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. Lwt 2024; 191: 115669. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669

31. Li JQ, Li ZH, Dong P, Liu P, Xu YZ, Fan ZC. Effects of parasternal intercostal block on surgical site wound infection and pain in patients undergoing cardiac surgery: A meta-analysis. Int Wound J 2024; 21: 1-8. https://doi.org/10.1111/iwj.14433

32. Cao J, Liu Q, Hao H, Bu Y, Tian X, Wang T, et al. Lactobacillus *paracasei* X11 Ameliorates Hyperuricemia and Modulates Gut Microbiota in Mice. Front Immunol 2022; 13: 1-12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940228

33. Yalçınkaya S, Yalçın Azarkan S, Karahan Çakmakçı AG. Determination of the effect of L. plantarum AB6-25, L. plantarum MK55 and S. boulardii T8-3C microorganisms on colon, cervix, and breast cancer cell lines: Molecular docking, and molecular dynamics study. Journal of Molecular Structure 2022; 1261. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132939

34. Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf J, et al. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 10321-6. https://doi.org/10.1073/pnas.0504084102

35. Li N, Pang B, Liu G, Zhao X, Xu X, Jiang C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* from human breast milk shows therapeutic function against foodborne infection by multi-drug resistant *Escherichia coli* in mice. Food Funct 2020; 11: 435-47. https://doi.org/10.1039/C9FO01698H

36. Oguntoyinbo FA, Narbad A. Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. Journal of Functional Foods 2015; 17: 621-31. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.022

37. Schultz Michael ALL. Rationale for probiotic treatment strategies in inflammatory bowel disease. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 2008; 2(3): 337-55. https://doi.org/10.1586/17474124.2.3.337

Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.
Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.
©Telif Hakkı 2026 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.