

Farklı Kalsiyum Konsantrasyonlarının Enterotoksijenik *Bacteroides Fragilis* Kökenlerinin Üremesi Üzerine Etkisi

Neşe Balkan¹, Nilüfer Özaydın², Nurver Toprak Ülger¹

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Nurver Toprak Ülger,
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye
Elektronik posta adresi / E-mail address: nurverulger@yahoo.com
Kabul tarihi / Date of acceptance: 24 Ekim 2012 / October 24, 2012

ÖZET

Farklı kalsiyum konsantrasyonlarının enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* kökenlerinin üremesi üzerine etkisi

Amaç: Bu çalışmada kalsiyumun, çinkoya bağımlı metalloenzim yapısında enterotoksin salgılayan *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) kökenlerinin üremesi üzerine etkili olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) bakterilerinden *bft1* ve *bft2* genleri taşıyan ikişer köken ve toksini olmayan bir *B. fragilis* çalışmaya alınmıştır. Kalsiyum klorür (CaCl_2) ve çinko klorür (ZnCl_2) tuzlarının her birinin bu bakterilerin üremesine etkisi kantitatif kültürler ile araştırılmıştır. Bunun için, gerek normal gıdalarla alındığında, gerekse gıdalara ek olarak, günde 1 gram kalsiyum alındığında, barsak içeriğindeki kalsiyum konsantrasyonlarını temsil edecek, farklı tuz konsantrasyonlarıyla hazırlanmış besiyerleri kullanılmıştır. Bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarında üreme verilerinin istatistiksel analizi Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testleriyle yapılmıştır.

Bulgular: Kalsiyum klorür tuzları tüm ETBF kökenlerinin üremesi üzerine inhibitör etki yapmıştır. Özellikle yüksek düzeyde CaCl_2 , *bft2* + geni taşıyan kökenlerin koloni sayısında belirgin azalmaya neden olmuştur ($p=0,002$). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamakla beraber, ZnCl_2 tuz bulunmayan kontrol besiyerindeki kültürler göre daha fazla sayıda koloni oluşumuna yol açmıştır.

Sonuç: Bulgularımız, kalsiyumun ETBF kökenleri üzerine antimikrobiyal etkisinin olabileceğini göstermektedir; ancak kalsiyumun, bakterinin enterotoksik etkisinde herhangi bir değişiklik yapıp yapmadığının araştırılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*, metalloenzim, iyonize kalsiyum

ABSTRACT

Investigation of the effect of different calcium concentration on the growth of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains

Objective: The aim of the present study was to investigate whether calcium was effective on the growth of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) which produces a zinc-dependent metalloenzyme.

Methods: A total of four ETBF strains (two *bft1* +, two *bft2* + strains) and one nontoxicogenic *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) were tested. Individual effects of calcium (CaCl_2), and zinc (ZnCl_2) chloride salts on growth of these strains were carried out with quantitative cultivation. In order to assess potential activities of different salt concentrations on growth parameters and dose-response profiles of the strains, media with different salt concentrations which represent the normal and high dose calcium intake levels as in intestines, were used. The data were analyzed by using Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests.

Results: Calcium salts exerted inhibitory effect on the growth of all ETBF strains; particularly, high level of CaCl_2 resulted in significant decrease in the number of bacterial colonies of *bft2* + strains ($p=0,002$). Although not statistically significant, slightly more colonies were grown on the culture media with ZnCl_2 when compared with the medium without salt.

Conclusion: Our results indicate the presence of an antimicrobial effect of calcium on ETBF strains, however, whether calcium leads to a change on the enterotoxic effect remains to be established.

Key words: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, metalloenzyme, ionized calcium

GİRİŞ

Normal barsak florasında bulunan *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) kökenlerinin bazıları frajilizin adı verilen, aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) bulunduran metalloenzim yapısında

bir enterotoksin salgılamaktadır. Bu enterotoksin, barsak epitel hücrelerinde birtakım morfolojik değişikliklere yol açmakta, özellikle küçük çocuklarda ishale neden olmaktadır (1). Son yıllarda enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) kökenlerinin, bazı kronik inflamatuvar barsak hastalıklarıyla ilişkisi

gösterilmiştir (2,3).

Frajilizin etkisini, barsak epitel hücreleri arasında yer alan, bir tutundurucu bağlantı tipi olan zonula adherens'in ekstraselüler parçası E-kaderin'i parçalayarak göstermektedir. E-kaderin'in yıkılmasıyla hücre içi sinyal mekanizmaları devreye girmekte, çekirdekte c-Myc gibi birtakım onkogen proteinlerin ekspresyonu artmaktadır. Bu bağlamda, kolon kanseri oluşumunda frajilizin etkili olabileceği yönünde varsayımlar bulunmaktadır (4-6). Nitekim hastanemiz ve GATA Genel Cerrahi Anabilim Dalı ile yapılan ortak çalışmada, kolon kanserli hastaların dışkı örneklerinde ETBF pozitifliği, normal kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (7).

Mekanizması tam olarak anlaşılammakla beraber, diyetle düzenli alınan yüksek doz kalsiyumun (1-1,5 gram/gün), kolon kanserini önlediği tespit edilmiştir (8). Kalsiyum bu etkisini gastrointestinal sistemde safra asitleri ve yağ asitleriyle bağlanarak, kalsiyum sabunları olarak bilinen çözünmeyen kompleksler yaparak gerçekleştirmektedir (9). Ayrıca moleküler çalışmalar kalsiyumun, E-kaderin ekspresyonunu arttırdığını ve β -katenin/TCF (transkripsiyon faktörleri) aktivasyonunu baskıladığını göstermiştir (10).

Bu bilgilerin ışığında, ETBF'nin mukoza hücrelerinde oluşturacağı toksik etkiyi kalsiyumun onaracağı fikri mantığa uygun gelmektedir. Diğer yandan "Kalsiyumun bakteri üzerine doğrudan herhangi bir etkisi olabilir mi?" sorusu da akla gelmektedir. Literatürde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda kalsiyumun bakteri üremesine bir etkisinin olup olmayacağı sorusuna yanıt aranmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda kalsiyum bulunduran besiyerlerinde ETBF kökenlerinin üreme durumları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, ikisi standart, üçü hastalardan izole edilen toplam beş *B. fragilis* kökeni çalışılmıştır. Standart kökenlerden, enterotoksin genine sahip olmayan ATCC 25285 *B. fragilis* negatif kontrol, *bft2* genine sahip NCTC 11295 *B. fragilis* ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer çalışılan bakteriler ikisi kolon kanserli hasta dışkısından üretilmiş (*A18-bft2* geni pozitif, *A24 bft1* geni pozitif) kökenler, diğeri ise apsedan üretilmiş *bft1* + 87-T1 (Prof. Dr. Sydney M. Finegold, Medical Center West Los Angeles, USA'dan temin edilmiştir.) kökeninden oluşmaktadır.

"Skimmed Milk" besiyerinde, -80°C'de stokta tutulan

kökenlerimiz hemin, K1 vitamini ve %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş besiyerlerine ekilerek, anaerop ortamda, 35-37°C'de, 48 saat inkübe edilmiştir. Bakterilerin kendilerine gelmelerini sağlamak için toplam üç kez kültürleri yenilenmiştir. Son kültürden 1-2 koloni alınarak K1 vitamini ve hemin ilave edilen beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerlerine ekilmiş ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kültürden 0,5 Mc Farland (10^8 cfu/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve onar kez seri sulandırılmaları yapılmıştır. Bu bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak, belirli miktar $CaCl_2$ ve $ZnCl_2$ tuzlarının ilave edilmesiyle hazırlanan 6 farklı besiyerine sayım plağı yöntemiyle ekilerek, 5 gün anaerop ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir (9,11). Çalışmada kullanılan; Medium Bazal [içinde kalsiyum ve çinko bulundurmeyen temel besiyeri; 1M KH_2PO_4 33,4 ml, 1M K_2HPO_4 66,6 ml, $FeSO_4$ (7,3 mg/ml) 1 ml, $(NH_4)_2SO_4$ 0,4 gr, glukoz (%5) 2 ml, hemin, K vitamini, B_{12} vitamini, Na_2CO_3 (%10) 4 ml, L-Sistein (%5) 10 ml, agar 15 gr, distile su 1lt], ve Medium Bazal'e mineral tuzu eklenmiş besiyerleri: Ca^{+2} (normal gıdalarla alınan kalsiyumun miktarı), **Ca^{+2} ekstra** (normal gıdalarla alınan kalsiyuma ilaveten, günde 1 gramlık kalsiyum preparatının alınması halinde kalsiyum miktarı), **Zn^{+2}** (normal gıdalarla alınan çinko miktarı), **$Ca^{+2}+Zn^{+2}$** (normal gıdalarla alınan kalsiyum ve çinko miktarı), **Ca^{+2} ekstra+ Zn^{+2}** (ilave alınan 1 gram kalsiyum preparatı ve günlük çinko miktarı) barsaktaki kalsiyum ve çinko miktarlarını temsil edecek şekilde hazırlanmıştır. Barsaktaki kalsiyum ve çinko miktarları alınan yiyeceklere bağlı olarak kişilerde farklılıklar göstermektedir. Bununla beraber çalışmamızda genel durumu yansıtan ortalama değerler alınmıştır; günlük gıdalarla alınan kalsiyumu temsilen 2,57 gr/L, ilave alınan kalsiyumu temsilen 4,8 gr/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, günlük gıdalarla alınan çinkoyu temsilen 20,84 mg/L $ZnCl_2$ kullanılmıştır (9).

İstatistiksel analizde, değişik konsantrasyonlarda kalsiyum içeren altı farklı besiyerine (MB, Ca^{+2} , Ca^{+2} ekstra, Zn^{+2} , $Ca^{+2}+Zn^{+2}$, Ca^{+2} ekstra+ Zn^{+2}) ekilmiş 5 kökenin üreme sayıları ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Tek bir bakteri suşunun 6 farklı besiyerlerindeki üreme miktarları Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak $p=0,05$ ($p<0,05$ olmalı) kabul edilmiştir. Kruskal-Wallis testi ile farklı besiyerlerindeki üreme miktarları arasında farklılık saptandığında, farklılığın hangi besiyerlerinde olduğunu saptayabilmek için ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Burada anlamlılık düzeyi için Bonferroni düzeltmesi gereği $p=0,008$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum içeren altı farklı besiyerlerine ekilen 5 kökenin üreme durumu değerlendirilmiştir. Her bir köken için altı ölçüm değerinin minimum, maksimum, aritmetik ortalama ve standart sapmaları

hesaplanmış, kalsiyum ve çinko bulunduran besiyerlerinde oluşan koloni sayısı ile bu mineralleri bulundurmeyen Medium Bazal'deki koloni sayıları karşılaştırılmıştır. Koloni sayımları yapılan kültürlerin istatistiksel analizi, kökenlere göre ortalama değerleri ve p değerleri hesaplanarak, sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Farklı bakterilerin, altı farklı besiyerinde üreme-koloni sayımlarının ($\times 10^3$ cfu/ml) ortalamalarının karşılaştırılması

BESİYERLERİ*	n	Aritmetik Ortalama	SS	25. persentil	50. persentil	75 persentil	P**
Tüm bakteriler (ATCC hariç)							
MB	22	151.59	107.98	46.75	130.00	245.50	0.002
Ca ⁺²	22	85.14	91.67	12.00	64.50	110.00	
Ca ⁺² ekstra	22	68.73	98.39	3.75	18.50	82.75	
Zn ⁺²	22	153.95	103.01	55.50	161.50	263.50	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	22	120.23	149.14	12.75	79.50	131.50	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	22	85.59	130.37	0.00	20.00	95.50	
ATCC, toksin Ø							
MB	6	66.67	71.13	11.00	32.50	156.25	0.453
Ca ⁺²	6	114.83	64.88	68.00	115.50	175.50	
Ca ⁺² ekstra	6	51.00	28.44	28.00	47.50	78.75	
Zn ⁺²	6	98.33	83.87	10.50	95.50	182.25	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	67.83	46.91	31.25	58.00	114.00	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	47.33	26.32	20.00	51.00	72.00	
NCTC, bft2+							
MB	6	73.83	57.13	31.50	43.50	145.50	0.001
Ca ⁺²	6	51.33	26.60	23.00	53.00	77.00	
Ca ⁺² ekstra	6	14.17	9.28	5.75	11.50	24.75	
Zn ⁺²	6	111.83	66.421	28.75	144.50	157.75	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	39.17	37.33	11.50	19.50	85.50	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	4.83	5.34	0.75	4.00	7.50	
A18, bft2+							
MB	5	188.60	76.05	105.50	238.00	247.00	0.001
Ca ⁺²	5	1.20	1.30	0.00	1.00	2.50	
Ca ⁺² ekstra	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Zn ⁺²	5	234.60	50.83	180.00	262.00	275.50	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	7.60	7.02	0.00	11.00	13.50	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
A24, bft1+							
MB	6	83.50	62.31	20.75	79.50	133.25	0.034
Ca ⁺²	6	71.00	41.94	40.50	66.00	102.50	
Ca ⁺² ekstra	6	41.33	26.46	11.00	51.00	63.50	
Zn ⁺²	6	41.67	25.85	10.00	51.00	63.50	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	103.83	31.20	71.25	112.00	131.50	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	73.00	30.70	47.50	73.00	95.50	
87-T1, bft1+							
MB	5	289.60	70.37	251.00	266.00	340.00	0.382
Ca ⁺²	5	226.60	72.13	171.13	250.00	270.00	
Ca ⁺² ekstra	5	235.75	58.76	186.00	252.00	277.50	
Zn ⁺²	5	258.60	58.180	199.50	284.00	305.00	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	349.80	147.55	202.50	420.00	462.00	
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	283.20	141.52	155.00	323.00	391.50	

*Altı farklı besiyerinde üremeleri (koloni sayımları) ölçülmüş ve ortalama koloni sayımları Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır.

**Çalışmada kullanılan, barsak ortamını yansıtmak besiyerleri: MB: Medium Bazal, Ca⁺²: Normal gıdalarla alınan kalsiyumun miktarı, Ca⁺² ekstra: Normal gıdalarla alınan kalsiyuma ilaveten, günde 1 gramlık kalsiyum preparatının alınması halinde kalsiyum miktarı, Zn⁺²: Normal gıdalarla alınan çinko miktarı, Ca⁺²+Zn⁺²: Normal gıdalarla alınan kalsiyum ve çinko miktarı, Ca⁺² ekstra+Zn⁺²: ilave alınan 1 gram kalsiyum preparatı ve günlük çinko miktarı.

Tablo 2: NCTC 11295 *B. fragilis* kökeni için ayrı ayrı, ikili üreme ortamlarındaki koloni sayımlarının karşılaştırılması

	n	P değeri (2 yönlü)
NCTC <i>bft2</i> +		
MB	6	0.631
Ca ⁺²	6	
MB	6	0.004
Ca ⁺² ekstra	6	
MB	6	0.470
Zn ⁺²	6	
MB	6	0.109
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	
MB	6	0.004
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	
Ca ⁺²	6	0.020
Ca ⁺² ekstra	6	
Ca ⁺²	6	0.109
Zn ⁺²	6	
Ca ⁺²	6	0.423
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	
Ca ⁺²	6	0.004
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	
Ca ⁺² ekstra	6	0.006
Zn ⁺²	6	
Ca ⁺² ekstra	6	0.229
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	
Ca ⁺² ekstra	6	0.030
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	
Zn ⁺²	6	0.025
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	
Zn ⁺²	6	0.004
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	6	0.010
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	6	

Ek kalsiyum miktarının *bft2* geni taşıyan NCTC 11295 ve A18 *B. fragilis* kökenleri üzerine inhibitör etkisi kalsiyum bulundurmayan ortama göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu iki bakterinin, besiyerlerindeki koloni sayılarının ortalamaları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Bonferroni düzeltmesi yapıldığından, burada anlamlılık düzeyi olarak 0,008 kabul edilmiştir (Tablo 2, 3).

A24 bakteri suşunun altı farklı besiyerindeki koloni sayımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($\chi^2_{K-W} = 12.024$, $SD=5$, $p=0.034$) (Tablo 1). Farklılığın hangi besiyerlerinden kaynaklandığını bulabilmek için Bonferroni düzeltmesi yapılarak, ikili ortamlardaki koloni sayıları karşılaştırılmıştır, ancak hiçbir ikili karşılaştırmada anlamlı farklılık saptanamamıştır (Man-Whitney U testi). Bu sonuç, her bir farklı besiyeri için ölçüm sayısının sadece 6 olması, ölçümlerin standart sapmalarının çok büyük olmasına bağlı olabilir.

Tablo 3: *bft2*+ A18 bakterisi için ayrı ayrı, ikili üreme ortamlarındaki koloni sayımlarının karşılaştırılması

	n	P değeri (2 yönlü)
A18 <i>bft2</i> +		
MB	5	0.009
Ca ⁺²	5	
MB	5	0.005
Ca ⁺² ekstra	5	
MB	5	0.175
Zn ⁺²	5	
MB	5	0.009
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	
MB	5	0.005
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	
Ca ⁺²	5	0.054
Ca ⁺² ekstra	5	
Ca ⁺²	5	0.009
Zn ⁺²	5	
Ca ⁺²	5	0.332
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	
Ca ⁺²	5	0.054
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	
Ca ⁺² ekstra	5	0.005
Zn ⁺²	5	
Ca ⁺² ekstra	5	0.054
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	
Ca ⁺² ekstra	5	1.000
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	
Zn ⁺²	5	0.009
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	
Zn ⁺²	5	0.005
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	
Ca ⁺² +Zn ⁺²	5	0.054
Ca ⁺² ekstra+Zn ⁺²	5	

TARTIŞMA

Önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan kolon kanseri, günümüzde gastrointestinal sistem kanserleri içinde görülme sıklığı açısından birinci sırada yer almaktadır (12). Yüksek miktarda kalsiyumun, kolonda adenom rekürrens riskini azalttığı çalışmalarla gösterilmiştir (13). Mekanizması tam açıklanmış olmamakla beraber kalsiyumun, E-kaderin ekspresyonunu arttırarak, hücrel sinyal aktivasyonunu baskılayarak etkili olabileceği gösterilmiştir (10). Bu sebeple koruyucu etki elde etmek için kişinin günlük 1-1,5 gram ek kalsiyum preparatı alması önerilmektedir (8).

Kalsiyumun E-kaderin ekspresyonunu arttırdığı bilgisinden yola çıkarak, ETBF'nin E-kaderin üzerinde yaptığı yıkımın kalsiyumun onarıcı etkisiyle giderilebileceği, dolayısıyla uzun vadede kanser oluşumunun önlenilebileceği düşünülebilir.

Literatürde kalsiyumun bazı bakteriler üzerine antimikrobik etkide bulunduğunu, bazı bakterilerin ise üremesini veya

virülansını arttırdığını saptayan çalışmalar mevcuttur. Üremeyi arttırıcı etkisi hücre duvarı yapısında oluşturduğu stabilizasyona bağlanmıştır. Antibiyotik etki ise daha çok besinlerin saklanması yüksek dozda kalsiyum kullanılması ile gerçekleşmiştir (14,15). Ancak, kalsiyumun ETBF üremesine etkisini araştıran herhangi çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, ikisi *bft2* (NCTC 11295, A18), ikisi *bft1* geni taşıyan (A-24, 87-T1) toplam 4 ETBF kökeni ve negatif kontrol amacıyla toksin üretmeyen bir *B. fragilis* (ATCC 25285) kökeni kullanılmıştır. Kökenler, normal beslenme durumunda veya ek kalsiyum alındığında barsakta bulunabilecek ortalama kalsiyum miktarı ve günlük çinko miktarı göz önüne alınarak hazırlanan besiyerlerine ekilmiş ve elde edilen kültürler değerlendirilmiştir. Ek kalsiyum içeren besiyerlerinde, *bft2* geni taşıyan iki kökenin koloni sayısı, kalsiyum bulunmayan Medium Bazal'e göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (NCTC, p=0.004, A18; p=0.008). Diğer bakterilerin koloni sayısı da düşük olmakla beraber, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Benzer şekilde, *bft2* genine sahip bu iki köken, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, çinko bulunduran ortamda daha fazla koloni oluşturmuştur. Bununla beraber çinko bulunan besiyerinde ek kalsiyum varlığında koloni sayısında yine anlamlı düşüşler görülmüştür. Bu durumda ek kalsiyumun, çinkonun üremeyi arttırıcı etkisini de baskıladığını söyleyebiliriz (Tablo 1).

Sonuçlarımıza göre ek kalsiyumun, *bft2* bulunduran ETBF kökenleri üzerine antimikrobik etkide bulunduğu, ancak diğer bakterilerin üremesini etkilemediği görülmektedir. Benzer etkinin barsaktaki ETBF kökenleri üzerinde olduğunu varsayarak, kalsiyumun gerek bozulmuş E-kaderin ekspresyonunu onararak, gerekse bakterinin

çoğalmasını inhibe ederek ETBF'nin onkojenik etkisini azaltabileceğini söyleyebiliriz.

ETBF'de *bft1*, *bft2* ve *bft3* genlerinden kopyalanan üç toksin varyantı (BFT1, BFT2, BFT3) tanımlanmıştır. BFT2'nin daha yüksek toksik potense sahip olduğu, hücre kültürü deneyleri ile gösterilmiştir. BFT2 toksini salgılayan kökenlerin çocuklarda, erişkinlere göre nispeten daha fazla ishal oluşturduğu anlaşılmıştır (16-17). ETBF kökenleri çoğunlukla BFT1 salgılamaktadır, BFT1'in toksik etkisi BFT2'den az ancak BFT3'ten daha fazladır. BFT3 batı toplumlarında bulunmayıp, Uzak Doğu ülkelerinde görülmektedir (18). Kolon kanserinin genellikle bir ileri yaş hastalığı olduğu ve bu yaş grubunda genellikle *bft1* geni taşıyan kökenlerin bulunduğu göz önüne alınırsa, literatür bilgileri ve sonuçlarımıza göre, ek alınacak kalsiyumun barsakta bulunan ETBF kökenlerinin üremesine etki yapmayacağı, ancak toksininin E-kaderin üzerindeki hasarlandırıcı etkisini onarabileceği söylenebilir.

Elde ettiğimiz veriler, günlük tüketilen ek kalsiyum miktarının *in vitro* koşullarda bazı ETBF kökenlerinin üremesini baskıladığını göstermiştir. Literatürde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuçlarımız, yeni çalışmalara ışık tutacak yararlı veriler sunmaktadır, ancak daha fazla köken ile yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kalsiyumun, bakterinin toksik özelliklerinde ya da salgılanmış toksinin fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik yapıp yapmadığı yönünde ileri araştırmaların yapılmasını önerebiliriz.

Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından, SAG-C-YLP-171209-0334 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Oldfield EC 3rd. (2009). Diarrhea. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: newly recognized cause of inflammatory diarrhea. Rev Gastroenterol Disord, 9(2):E65-E66.
2. Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL. (2007). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. Inflamm Bowel Dis. 2007; 13(12):1475-1483.
3. Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. Are Helicobacter species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? Dig Dis Sci. 2004; 49 (9):1425-1432.
4. Saidin RF, Jaeger K, Montrose MH, Wu S, Sears CL. (1997). *Bacteroides fragilis* toxin rearranges the actin cytoskeleton of HT29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decrease in F-actin content. Cell Motil Cytoskeleton. 37(2): p.159-165.
5. Housseau F. and Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (*Apc*+/-) mice: A human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. Cell Cycle. 2010; 9 (1): 3-5.
6. Goodwin AC, Destefano Shields CE, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL, Casero RA Jr. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A.2011; 108 (37):15354-15359.
7. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. Clin Microbiol Infect. 2006; 12 (8):782-786.
8. Simon GL, Gorbach SL. (1994). Intestinal health and disease. Gastroenterology 86; p.174-193.

9. Der Meer R.V, Welberg JWM, Folkert Kuipers, Kleibeuker JH, Mulder N.H, Termont D. S. M. L, Vonk RJ, De Vries H.T. and De Vries E.G.E. Effects of Supplement Diatery Calcium on the Intestinal Association of Calcium, Phosphate, and Bile Acids. American Gastroenterological Association. 1990; 99: 1653-1659.
10. Chakrabarty S. Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular Calcium and Calcium Sensing Receptor Function in Human Colon Carcinomas: Promotion of E-Cadherin Expression and Suppression of β -Catenin/TCF Activation. Cancer Research.2003; 63: 67–71.
11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC J, editors. Color Atlas and Textbok of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.p. 709-784.
12. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistic. CA Cancer J Clin. 2007; 57 (1):43-66.
13. Milner JA, McDonald SS, Anderson DE, Greenwald P. Molecular targets for nutrients involved with cancer prevention. Nutrition and Cancer. 2001; 41 (1-2):1-16.
14. Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J Bacteriol. 2005; 187 (13):4327-4337.
15. Hall PJ, Yang GC, Little RV, Brubaker RR. Effect of Ca^{2+} on morphology and division of *Yersinia pestis*. Infect Immun. 1974; 9 (6):1105-13.
16. Sears CL. (2001). The toxins of *Bacteroides fragilis*. p.1737-46. ????????
17. San Joaquin VH, Griffis JC, Lee C, Sears CL. Association of *Bacteroides fragilis* with childhood diarrhea. USA, Scand J Infect Dis.1995; 27 (3):211-215.
18. Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, Sears CL. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. Infect Immun. 1999; 67 (9):4945-4959.