

Enteroinvazif Patojenlere Karşı Probiyotik Mikroorganizmaların Hücre Kültüründeki Etkileri

The Effects of Probiotic Microorganisms in Cell Culture Against Enteroinvasive Pathogens

Esra ÇÖREKLİ ÇÖLGEÇEN¹, Derya HIRÇIN CENGER¹, Serhan SAKARYA²

¹ Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye.

² Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Özel Sağlık Hastanesi, İzmir, Türkiye.

Yazışma Adresi/Correspondence:


Esra ÇÖREKLİ ÇÖLGEÇEN

E-posta/E-mail: esra_corekli@hotmail.com

Geliş Tarihi/Received: 12.12.2025 Kabul Tarihi/Accepted:22.01.2026

 Esra ÇÖREKLİ ÇÖLGEÇEN <https://orcid.org/0000-0002-1243-2893> esra_corekli@hotmail.com

 Derya HIRÇIN CENGER <https://orcid.org/0000-0003-1470-1783> deryacenger@gmail.com

 Serhan SAKARYA <https://orcid.org/0000-0001-5252-9211> serhansakarya@yahoo.com



Hippocrates Medical Journal / Hippocrates Med J, 2026/6(1): 5-11 DOI: 10.58961/hmj.1841107

Abstract

Background	Probiotics are defined as live microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate amounts. Consequently, research on their therapeutic and prophylactic applications has expanded across various fields. While gastroenteritis caused by enteroinvasive pathogens is traditionally treated with antibiotics, the adverse effects of antibiotic therapy on microbiota and the rising issue of antimicrobial resistance have necessitated the search for alternative treatments.
Materials and Methods	To elucidate the mechanisms of probiotics against <i>Salmonella Typhi</i> and <i>Shigella dysenteriae</i> , which cause intestinal epithelial damage, <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Saccharomyces boulardii</i> were utilized in an artificial colonic epithelial cell model. Cell culture proliferation was evaluated based on time and culture media.
Results	In the initial phase, probiotics failed to produce inhibition zones against pathogens on Müller-Hinton agar. In the second phase regarding wound healing and cell proliferation, <i>L. acidophilus</i> alone showed no effect on proliferation; however, <i>S. boulardii</i> significantly enhanced the proliferation of damaged cells compared to the control group. In the infection model, the combination of <i>L. acidophilus</i> and <i>S. Typhi</i> accelerated wound healing; conversely, its combination with <i>S. dysenteriae</i> yielded no significant effect. Furthermore, <i>S. boulardii</i> was unable to counteract the destructive effects induced by equal concentrations of <i>S. Typhi</i> and <i>S. dysenteriae</i> .
Conclusion	The efficacy of probiotics in acute infectious, invasive bacterial diarrhea remains unclear. Although statistically significant results were observed, further randomized controlled trials are required to determine their clinical significance.
Keywords	probiotic, enteroinvasive, <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>

Özet

Arka plan	Probiyotikler “yeterli miktarda alımı sonucu konağın sağlıklı kalmasına yardımcı olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır. Bu sebeple uzun yıllardır gerek terapötik gerekse profilaktik olarak çeşitli alanlarda kullanımına yönelik araştırmalar sürdürülmektedir. Enteroinvazif patojenlerle oluşan gastroenteritlerin antibiyotiklerle tedavi edildiği bilinmekte ancak antibiyoterapinin flora üzerindeki olumsuz etkisi, antibiyotiklere karşı gelişen direnç sorunu yeni tedavi arayışlarını gündeme getirmiştir.
Gereç ve Yöntemler	Çalışmada, bağırsak epitel hasarına neden olan; <i>Salmonella Typhi</i> ve <i>Shigella dysenteriae</i> ’ya karşı probiyotiklerin etki mekanizmalarını aydınlatmak adına; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Saccharomyces boulardii</i> ile yapay kalın barsak epitel hücreleri kullanıldı. Hücre kültürünün proliferasyonu değerlendirildi zaman ve kültür ortamları ile yapıldı.
Bulgular	Probiyotik mikroorganizmaların ve solubl ürünlerinin patojen bakteriler üzerine etkinliğini anlamak için yapılan çalışmanın ilk basamağında Müller Hinton plaklarında patojen mikroorganizmalara karşı, probiyotiklerin inhibisyon zonu oluşturmadığı görüldü. Çalışmanın ikinci basamağı olan yara iyileşmesi hücre proliferasyonu bölümünde, <i>L. acidophilus</i> ’un tek başına proliferasyonu üzerine etkisi olmadığı fakat <i>S. boulardii</i> ’nin tek başına kontrol grubuna kıyasla hasarlı hücrenin proliferasyonunu iyileşme yönünde artırdığı görülmüştür. Enfeksiyon modelinde destrüktif etkisiyle bilinen <i>S. Typhi</i> ve <i>S. dysenteriae</i> ’nin patojenitesinin azalmasıyla <i>L. acidophilus</i> ve <i>S. boulardii</i> eşliğinde bakıldığında ise <i>L. acidophilus</i> ’un <i>S. Typhi</i> ile olan kombinasyonunda kontrole göre yara iyileşmesini hızlandırdığı, <i>S. dysenteriae</i> ile olan kombinasyonunda ise yara iyileşmesi üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. <i>S. boulardii</i> ise mevcut kullanılan bakteriyolojik miktarlar ile <i>S. Typhi</i> ve <i>S. dysenteriae</i> ’nin eşit miktarının yarattığı destrüktif etkiyi engelleyememiştir.
Sonuç	Probiyotiklerin akut enfeksiyöz, invazif bakteriyel diyaredeki etkisi net değildir. Anlamlı istatistikler çıkmasına rağmen klinik öneme sahip olup olmadığını anlamak için daha çok randomize kontrollü çalışmaya ihtiyaç vardır.
Anahtar kelimeler	probiyotik, enteroinvazif, <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>

GİRİŞ

Gastrointestinal sistem, intestinal mikroflora ve konakçı arasında hassas denge olan bir ekosistemdir (1). Konakçı ile simbiyotik, komensal ve patojenik bir ilişki içerisinde yaşayan bağırsak florası esas olarak anaerob bakterilerden oluşur, mideden kolona doğru anaerob bakteri yoğunluğu artar (2). Gastrointestinal sistem doğumda sterildir ve doğumdan sonra değişir, erişkin yaşamda kısmen stabildir (3). İnsanlarda bağırsak popülasyonunun yaklaşık olarak %95'i; *Bifidobacterium spp*, *Clostridium spp*, *Eubacterium spp*, *Fusobacterium spp*, *Peptococcus spp*, *Peptostreptococcus spp* ve *Bacteroides spp* türlerinin gibi zorunlu anaeroplardan oluşmaktadır. Geri kalan popülasyonun yaklaşık %1-10'unda ise *Lactobacillus spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* ve *Bacillus spp* türlerinin dahil olduğu fakültatif anaeroplardan bulunmaktadır (1,4). Flora bakterilerinin, besin ve yapışma yerleri için doğrudan yarışma, indükledikleri mukozal immünite artışı, patojen bakterinin virülansını azaltma mekanizmaları ile patojen mikroorganizmaların patojen etkilerini önleyebildiği düşünülmektedir (5). Nitekim, insanlarla karşılıklı yarar sağlama çerçevesinde canlılıklarını devam ettiren çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar probiyotikler "yeterli miktarda alımı sonucu konağın sağlıklı kalmasına yardımcı olan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır (6). Enteroinvazif patojenlerle oluşan gastroenteritler antibiyotiklerle tedavi edilmekte ancak antibiyoterapinin flora üzerindeki olumsuz etkisi ve mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı gelişen direnç sorunu yeni tedavi arayışlarını gündeme getirmektedir. Bu sebeple uzun yıllardır terapötik anlamda probiyotik kullanımına yönelik araştırmalar sürdürülmektedir.

Çalışmada, in vitro bakteri ve in vitro hücre kültürü kullanılarak, probiyotiklerin patojen bakterilere karşı koruyuculuğunu araştırmak, bu mikroorganizmaların invazif bağırsak patojen bakterilerine karşı hangi patofizyolojik mekanizmalarla etkili olduğunu anlamak ve probiyotikleri kullanarak patojen bağırsak bakterilerine karşı tedavi stratejileri geliştirmek hedeflendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan standart *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) (ATCC 11975), *Salmonella Typhi* (*S. Typhi*) (RSK6) ve *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) (RSK. 4070) Refik Saydam kültür koleksiyonundan, *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) Bicodex-Fransa firmasından temin edilmiştir. *L. acidophilus* ve *S. boulardii*'nin, *S. Typhi* ve *S. dysenteriae* üzerine antibakteriyel etkinliği olup olmadığını araştırmak üzere bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları olarak, *L. acidophilus* %5 koyun kanlı agara ve *S.*

boulardii Sabouraud Dekstroz agara (SDA) ekilip 24 saatlik canlandırma inkübasyonuna bırakıldı.

Patojenlere Karşı Probiyotik Mikroorganizmaların in Vitro Etkinliği

Petrilerde saf olarak üreyen *Lactobacillus acidophilus* ve *Saccharomyces boulardii* kolonilerinden 10 mikrolitrelik steril öze ile yarım öze alınarak MRS Broth ve Sabouraud Dekstroz Broth içinde 1 gece 35°C inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu tüpler 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ve çökelti kısımları ayrıldı. Çökelti kısmından alınan *L. acidophilus* ve *S. boulardii* 0,5 Mac Farland olacak şekilde %0,9 Serum Saline (SF) ile sulandırıldı. Sonrasında her iki bakteri de 10⁵ yoğunlukta olacak şekilde %0,9 SF ile dilüe edildi. *L. acidophilus* ve *S. boulardii*'nin santrifüj sonrası ayrılan süpernatant kısımları 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında %0,9 SF ile dilüe edildi. Çökelti kısmından elde edilen mikroorganizmalar da 10⁵, 10⁴, 10³ olacak şekilde %0,9 SF içinde dilüe edildi. *S. Typhi* ve *S. dysenteriae* %5 koyun kanlı agarda saf olarak üretildikten sonra steril öze ile alınan kolonilerden %0,9 SF kullanılarak 0,5 Mac Farland'lık süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon 10⁵ koloni oluşturan ünite olacak şekilde %0,9 SF ile dilüe edildikten sonra steril eküvyon yardımıyla her bakteri 2 ayrı Müller Hinton besiyerine ekildi. Her bir plak 2 ye bölünerek bir bölümüne bakteri diğer bölümüne de bakterinin süpernatant dilüsyonları 10 µl olacak şekilde ekilerek 35 °C de 18 saat bekletilmek üzere etüve konuldu. İnkübasyon sonrasında *S. Typhi* ve *S. dysenteriae* üremelerinde Müller Hinton petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı belirlendi.

Hücre Kültürü Çalışmamızda insan kolon kanser hücre dizisi (Caco-2) olan 25 cm³ lük flask içerisine, Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), %1 lik Sodyum Pirüvat ve %20 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma) eklenerek hazırlanmış besiyerinden 5 ml konularak %5 CO² ve 37°C de inkübe edildi. Her iki günde bir besiyeri değiştirilerek 1 hafta sonrasında hücreler flaskı tamamen kaplayınca hücreler pasajlanmak üzere PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra 1 mililitre tripsin ile muamele edildi. 3 dakika inkübatörde bekletildi ve mikroskopta 10x büyütmede hücreler matriks tabakasından ayrılmış ve yüzer halde görüldü. Flask içerisine tripsin solüsyonunun 5 katı kadar (5 mililitre) besiyer eklendi ve tripsin inaktive edildi. Sonrasında elde edilen solüsyon flasktan 10 mililitrelik pipet yardımıyla alınıp, 15 mililitrelik falkona aktarıldı. 400g 10dk, 4°C de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan falkonun süpernatantı atılarak pelleti bırakıldı. Pelletin üzerine 1 mililitre MEM besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak homojenizasyonu sağlandı. 1 mililitrelik mevcut hücre-MEM solüsyonundan 20 mikrolitre alınıp, 20

mikrolitre tripan blue ile muamele edildi. Thoma hematometre kamarasında tripan blue ile boyanmayan canlı hücreler sayıldı ve 1 mililitredeki hücre sayısı; büyük karenin sayılan hücresi x dilüsyon faktörü x 10000 ile belirlendi.

Yara İyileşmesi-Hücre Proliferasyon Deneyi

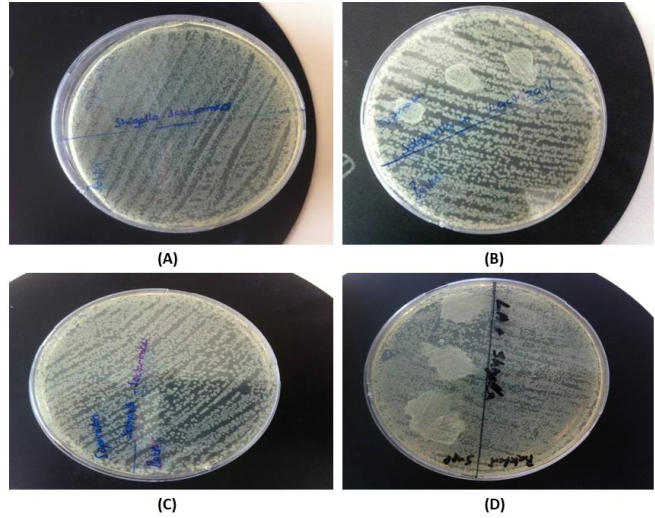
Hücreler 2×10^5 /ml hücre olacak şekilde dilüe edilerek 24 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 10^5 Caco-2 hücresi ekildi. 48 saatte hücreler değerlendirildi. Plak tabanından dışarıdan dikey ve yatay olacak şekilde kalemle çizgiler çizildi. Yatay çizgilere paralel doğrultuda 100-1000 ml steril pipet ucuyla içeriden monolayer çizilerek mekanik zarar verildi. Mevcut zarar gören epitel hücrelerine her biri 2 kontrol kuyucuk olacak şekilde *S. bouldardii* ve *L. acidophilus* tek başlarına, *S. Typhi* ve *S. dysenteria* ile kombinasyonları konuldu. Hasarlanmış epitel üzerine patojen bakterilerin ve probiyotiklerin etkilerini araştırmak üzere 35°C etüvde inkübasyona bırakıldı. 0. saat, 4. saat inverted mikroskop (Olympus) ile 4x lik büyütmede hücre görüntüleri fotoğraflandı. İmge J programı kullanılarak kareleme metoduyla oluşan hasarlı alan sayıldı.

Deneyisel çalışmamızda iki değişken mevcuttur. Birinci değişken; kontrol kültürü, *L. acidophilus* kültürü, *S. bouldardii* kültürü, *S. Typhi*+*L. acidophilus* kültürü, *S. dysenteria*+*L. acidophilus* kültürü, *S. Typhi*+*S. bouldardii* kültürü, *S. dysenteria*+*S. bouldardii* kültürü olarak kategorilendirilen etken değişkenidir.

İkinci değişken zaman değişkeni olup; yara iyileşmesi her kültür grubu için iki aşamada (sıfırinci saat ve dördüncü saat) gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ölçümlerin saatler arasındaki değişimi bu zaman aralığında değerlendirilmiş ve ölçümler sonucunda negatif bir değer çıkması yara iyileşmesinin gerçekleştiğini, pozitif bir değer çıkması ise yara iyileşmesinin bozulduğunu göstermiştir. Hücre kültürünün proliferasyonu değerlendirmesindeki zaman değişkeni 0.saat ve 4. saat olarak kategorilendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmanın ilk basamağında; probiyotiklerin ve solubl ürünlerinin patojenler üzerine etkinliğini anlamak için yapılan izleminde *S. Typhi* ve *S. dysenteria* ekili plaklara probiyotik çökelti ve süpernatantlarının damlatıldığı noktalarda inhibisyon zonu olmadığı görüldü. Şekil 1'de plakların etüvde 35 °C'de 18 saat bekletilmeleri sonrası görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 1. Plakların etüvde 35 °C'de 18 saat bekletilmelerinin sonrası izlenimi. A) *S. dysenteria* ekili plakta *S. bouldardii*'nin bakteri ve süpernatant dilüsyonlarının damla ekimi. B) *S. Typhi* ekili plakta *L. acidophilus*'un bakteri ve süpernatant dilüsyonlarının damla ekimi. C) *S. Typhi* ekili plakta *S. bouldardii*'nin bakteri ve süpernatant dilüsyonlarının damla ekimi. D) *S. dysenteria* ekili plakta *L. acidophilus*'un bakteri ve süpernatant dilüsyonlarının damla ekimi.

Çalışmanın ikinci basamağı olan yara iyileşmesi ve hücre proliferasyonu bölümünde; Caco-2 ile yapılan yara iyileşmesi verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde sadece 0.saat ve 4.saat arasında istatistiksel anlamlılık olduğu görüldü. Hücre kültüründe saatlere göre hasarlı hücre görüntülerinin inverted mikroskop görüntüleri Şekil 2' de yer almaktadır.



Şekil 2. Hücre kültüründe saatlere göre hasarlı hücre görüntüleri. A) 0.saat B) 4.saat

L. acidophilus'un hasarlı hücrenin proliferasyonu üzerine tek başınayken olan etkisinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır ($p=0,188$). *S. bouldardii*'nin ise tek varlığında, iyileşme yönünde arttırdığı görülmüştür ($p=0,006$). Destruktif etkisiyle bilinen *S. Typhi* ve *S. dysenteria*'nın *L. acidophilus* ve *S. bouldardii*'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile *S. Typhi* + *L. acidophilus* kültür grubunun değerlendirmesinde yara iyileşmesi gerçekleştiği görülmüş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p=0,02$). *S.*

dysenteria+*L.acidophilus*'un kontrol grubuyla karşılaştırılmasında ise hasarlı hücrelerin proliferasyonunu iyileşme yönünde arttırdığı ancak kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadığı saptanmıştır (p=0,133).

S. bouldardii'nin, *S. Typhi* ve *S. dysenteria* ile invitro kültür gruplarında bu patojenlerin eşit miktarının yarattığı destrüktif etkiyi engelleyemediği görülmüştür. *S. bouldardii* ve *S. Typhi*+*S. bouldardii* kültür gruplarında (p= 0,043) ve *S. bouldardii* ve *S. dysenteria*+*S. bouldardii* kültür grupları (p= 0,017) arasında yara iyileşmesinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Hücre kültürlerinin 0.saat ve 4.saat yara iyileşmesi ölçümlerinin dağılımı Tablo 1'de, 0-4 saat zaman aralığı kültür veya kültür grubu yara iyileşmesi-hücre proliferasyonu karşılaştırması ise Tablo 2' de yer almaktadır.

Tablo 1. Hücre kültürlerinin 0.saat ve 4.saat yara iyileşmesi ölçümlerinin dağılımı

Kültür/kültür grubu adı Sayısı (n)	Hücre kültürleri yara iyileşmesi ölçümü		
		0. Saat	4. Saat
Kontrol n: 8	Ortalama ±SD	17,43±15,44	19,25±15,43
	Ortanca (Min-Mak)	15,00 (0,50-38,00)	18,50 (1,00-39,00)
<i>S. Typhi</i> n:7	Ortalama ±SD	12,28±6,57	12,14±6,66
	Ortanca (Min-Mak)	13,00 (5,00-22,00)	12,00 (6,00-25,00)
<i>S. dysenteria</i> n: 8	Ortalama ±SD	14,62±8,08	13,50±6,09
	Ortanca (Min-Mak)	13,50 (3,00-26,00)	13,00 (3,00-23,00)
<i>L. acidophilus</i> n: 8	Ortalama ±SD	16,37±11,85	16,00±8,50
	Ortanca (Min-Mak)	13,50 (3,00-39,00)	15,00 (6,00-31,00)
<i>S. bouldardii</i> n:7	Ortalama ±SD	18,57±9,16	16,85±8,47
	Ortanca (Min-Mak)	21,00 (5,00-31,00)	19,00 (5,00-27,00)
<i>S. Typhi</i> + <i>L. acidophilus</i> n: 8	Ortalama ±SD	20,37±15,4	18,25±12,8
	Ortanca (Min-Mak)	16,00 (6,00-53,00)	15,50 (7,00-44,00)
<i>S. dysenteria</i> + <i>L. Acidophilus</i> n: 8	Ortalama ±SD	14,87±8,49	14,62±7,08
	Ortanca (Min-Mak)	13,00 (4,00-26,00)	14,50 (5,00-27,00)
<i>S. Typhi</i> + <i>S. bouldardii</i> n: 8	Ortalama ±SD	15,00±7,28	15,50±6,78
	Ortanca (Min-Mak)	15,50 (4,00-25,00)	16,00 (5,00-24,00)
<i>S. dysenteria</i> + <i>S. bouldardii</i> n: 8	Ortalama ±SD	14,00±6,76	14,62±5,50
	Ortanca (Min-Mak)	13,00 (7,00-26,00)	14,50 (8,00-23,00)

TARTIŞMA

Probiyotikler, sindirim sistemi florasında belli sayılarda bulunan ve konakçıda yararlı etkiler oluşturan mikroorganizmalardır (7). Gastrointestinal sistem florasının, patojen mikroorganizmaların patojenitelerini

önleyebildiği düşünülmektedir (5). Sağlıklı bağırsak florasının kolonizasyonunun patojenlere karşı koruyucu etkisi, mikrobiyotasız bırakılan hayvan çalışmalarından bilinmektedir (8, 9). Bir fare çalışmasında zayıflatılmış fare bağırsak florasıyla *S. Typhimurium*'un temizlenmesi başarısız olurken tedavinin normal flora transferiyle mümkün olduğu görülmüştür (10). İntestinal bariyer anlamında intestinal flora oldukça önemli bir basamaktır. Koruyucu etkisinin; patojen-flora arasındaki beslenme yarışı, flora bakterilerinin oluşturduğu düşük ortam pH'ı ve flora bakterilerince oluşturulan yağ asitlerinin patojen mikroorganizma üzerine çoğalmayı inhibe edici etkisi ile olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (11, 12). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğu laktik asit bakterileri grubundandır (13). Ek olarak, *Saccharomyces bouldardii* non patojenik probiyotik bir mantardır (14). Çalışmada *S. bouldardii*'nin hasarlı hücrenin proliferasyonunu kontrole göre iyileşme yönünde arttırdığı saptanırken *L. acidophilus*'un hasarlı hücrenin proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı fark oluşturmadığı görülmüştür.

Hücre kültürü yara iyileşmesi modeli kullanılan çalışmamızda bu probiyotiklerin, enteroinvazif bakterilere karşı in vitro ortamda etkinlikleri değerlendirildiğinde, patojenlerin olduğu plaklarda probiyotiklerin kendisi veya süpernatantlarının dilüsyonlarıyla hiçbir probiyotığın patojenler üzerinde üremeyi azaltıcı etkisi saptanmamıştır. Probiyotik mikroorganizmaların patojen mikroorganizmalara direkt değil de mikroorganizmaların patojenite mekanizmalarına etki ettiği düşünülmüştür.

Genellikle kontamine su ve gıda ile bulaşan ve mide pasajında asit toleransı ile asitten kaçan *S. Typhi* intestinal epitele kolonize olur ve epitele adhere olup geçer. Bu geçiş; enterositlere invazyon, özelleşmiş epitelyum hücresi olan M hücresi içine girmesi, yoluyla giriştir. Bu patojen invazif olmasına karşın mukozal inflamatuvar yanıtı ve ishal mekanizmalarını tetiklemez (15). *S. Typhi*'nin Caco-2 hücrelerinin sitoplazmasına penetre olmadan girişi, epitel hücresine sitotoksik etki yapması ve hücreyi hasarlayarak kendine açtığı boşluk yoluyla sağlanır. *S. Typhi*'ye maruz kalan hücreler 15 dakika içinde bu sitotoksik etkiyle karşılaşırlar. Bu sayede *S. Typhi* enfeksiyon yapmak için epitel yüzeyine invaze olmak zorunda kalmaz ve probiyotiklerle de reseptör düzeyinde yarışması gerekmeden sitotoksik etki görülmüş olur. Hasarlı kolon epiteli üzerine probiyotik, patojen + probiyotik etkinliği incelendiğinde *S. Typhi*'nin sitotoksik etkisinin *S. bouldardii* ile engellenememiş olmasının sebeplerinden biri de *S. Typhi*'nin kullandığı bu patojenite mekanizması olabilir.

Tablo 2. 0-4 saat zaman aralığı kültür veya kültür grubu yara iyileşmesi-hücre proliferasyonu karşılaştırması

Karşılaştırılan kültür veya kültür grupları		Ortanca (min-max)	Ortalama \pm SD	t	df	p
Kontrol ve <i>L. acidophilus</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	1,384	14	0,188
	<i>L. acidophilus</i>	0,5 (-8, 3)	-0,37 \pm 3,77			
Kontrol ve <i>S. Typhi</i> + <i>L. acidophilus</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	2,616	14	0,02
	<i>S. Typhi</i> + <i>L. acidophilus</i>	-1,5 (-9, 1)	-2,12 \pm 3,52			
Kontrol ve <i>S. dysenteria</i> + <i>L. acidophilus</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	1,596	14	0,133
	<i>S. dysenteria</i> + <i>L. acidophilus</i>	1 (-6, 2)	-0,25 \pm 2,76			
<i>L. acidophilus</i> ve <i>S. Typhi</i> + <i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	0,5 (-8, 3)	-0,37 \pm 3,77	0,958	14	0,354
	<i>S. Typhi</i> + <i>L. acidophilus</i>	-1,5 (-9, 1)	-2,12 \pm 3,52			
<i>L. acidophilus</i> ve <i>S. dysenteria</i> + <i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	0,5 (-8, 3)	-0,37 \pm 3,77	0,076	14	0,941
	<i>S. dysenteria</i> + <i>L. acidophilus</i>	1 (-6, 2)	-0,25 \pm 2,76			
Kontrol ve <i>S. bouldarii</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	3,243	13	0,006
	<i>S. bouldarii</i>	-2 (-4, 1)	-1,71 \pm 1,70			
Kontrol ve <i>S. Typhi</i> + <i>S. bouldarii</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	1,085	14	0,264
	<i>S. Typhi</i> + <i>S. bouldarii</i>	1(-2, 4)	0,50 \pm 2,07			
Kontrol ve <i>S. dysenteria</i> + <i>S. bouldarii</i>	Kontrol	1,5 (-2, 5)	1,80 \pm 2,38	1,168	14	0,262
	<i>S. dysenteria</i> + <i>S. bouldarii</i>	1(-6, 2)	-0,25 \pm 2,76			
<i>S. bouldarii</i> ve <i>S. Typhi</i> + <i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	-2 (-4, 1)	-1,71 \pm 1,70	2,001	13	0,043
	<i>S. Typhi</i> + <i>S. bouldarii</i>	1(-2, 4)	0,50 \pm 2,07			
<i>S. bouldarii</i> ve <i>S. dysenteria</i> + <i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	-2 (-4, 1)	-1,71 \pm 1,70	2,743	13	0,017
	<i>S. dysenteria</i> + <i>S. bouldarii</i>	1(-6, 2)	-0,25 \pm 2,76			

L. acidophilus *S. Typhi* ile inkübe edildiğinde yara iyileşmesini kontrol grubuna kıyasla arttırmış olması diğer bir deyişle *S. Typhi*'nin sitotoksitite mekanizmalarını baskılaması, invazyon dışı bahsi geçen patojenin inhibisyonu ile açıklanabilir (16). Öte yandan probiyotiklerin tedavide kullanımlarını öngören en önemli özelliklerinden biri, reseptöre bağlanmak için patojenlerle yarışmasıdır. Literatürde yer alan bir çalışmada *Lactobacillus paracasei*'nin, *Salmonella enterica* suşunun Caco-2 hücresine bağlanmasını engellediği gösterilmiştir (17). Hücrelere mekanik hasar verilerek yapılan örnek çalışma olmaması sebebiyle doğrudan bir karşılaştırma yapılamasa da; probiyotiklerin patojenlerin hücreye adezyonu engelleyerek, Caco-2'ye verilecek hasarın azalmasını da sağlayabileceği düşünülmüştür. Bu bakış açısıyla, *L. acidophilus*'un *S. Typhi*'nin canlılığı üzerine etki etmeksizin patojenite mekanizmalarını bloke ettiği düşünülmekteyse de *L. acidophilus*'un *S. Typhi*'nin sitotoksitite mekanizmalarını hangi yolu kullanarak inhibe edildiğini anlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Shigella'lar kontamine su ve gıda ile bulaşırken aside daha az duyarlı olduklarından mide asitinde yaşayabilirler (18). Shigella'lar İnce bağırsak lümeninde çoğalır ve takiben asıl olarak kolonda invazyon ve shiga benzeri toksinlerin etkisi ile dizanteri tablosuna yol açarlar. Virülanslarında en önemli rol invazyona ait olup Shigella tarafından indüklenmiş makropinositoz ile hücre içine girer (19, 20,21). İn vitro ortamda da benzer şekilde Shigella bakterisi tarafından indüklenmiş makropinositoz ile hücre içine girer (21).

L. acidophilus+*S. dysenteria* ve kontrol grubu karşılaştırılmasında *L. acidophilus*'un yara iyileşmesini arttırmadığı görülmüştür. Benzer şekilde *S. bouldarii* +*S. dysenteria* kombinasyonunda da yara iyileşme etkisinin görülmemesi, *S. dysenteria*'nin sitopatik etki mekanizmaları ile *S. bouldarii* ve *L. acidophilus*'un etki mekanizmaları arasında bire bir etkileşim olmadığını düşündürmüştür.

Çalışmada *S. bouldarii* enteropatojenlere karşı sitotoksik hasarı önleyemezken, patojensiz ortamda hücrenin yara iyileşmesini kontrol grubuna kıyasla arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum *S. bouldarii*'nin bakterinin patojenite

mekanizmalarını inhibisyonundan çok, konak iyileşme mekanizmaları üzerine olumlu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. *S. boulardii*'nin anti inflamatuvar ve intestinal epitel üzerine trofik etkisi daha önce yapılmış olan çalışmalarla benzerdir (22, 23). Bunun yanında, *S. boulardii*'de *S. Typhi* ve *S. dysenteria* ile kullanıldığında hücrenin yara iyileşmesini arttırıcı etkinin görülmemesi; *S. boulardii*'nin konsantrasyonuna bağlı olarak değişebileceği ön görüldüğünden *S. boulardii*'nin artan konsantrasyonlarıyla, *S. dysenteria* ve *S. Typhi* ile karşılaştırılmasını ve yara üzerine etkinlik çalışmalarının artan dozlarla yapılmasını gerektirdiği düşünülmektedir.

Probiyotiklerin diyare etkeni patojenlere karşı koruyucu etkilerine yönelik çalışmalarda, patojenlere karşı spesifik ve non spesifik immun yanıtı güçlendirdiği (lenfositlerin proliferasyonunu ve miktarını arttırdığı; interferon gama başta olmak üzere sitokin salınımını da arttırdığı) bildirilmiştir (24). Probiyotiklerin invazif bakterilerle gelişen ishalin süresini kısalttığına dair klinik çalışmalarda da probiyotiklerin koruyuculuğu gösterilmiştir (25, 26). Enteropatojenlere karşı probiyotiklerin etkinliğini gösteren in vitro ve hayvan çalışmalarından anlaşıldığı kadarıyla; patojen adezyonunu azalttığı (27), enterositlerin tight junctionlarını kuvvetlendirdiği (28), mukozal immünite yanıtını arttırdığı (29-31) gösterilmiştir. *S. Typhi* ve *S. dysenteria*'nın patojenite mekanizmaları göz önüne alındığında, in vitro hücre kültürleri ile probiyotik klinik çalışmalarının farklılık gösterdiği görülmüştür. Kültür ortamındaki farklı sonuçların sebebi, patojen mikroorganizmaların kolon epiteline invazyonu sonrası konakçıda beklenen immün yanıtı sağlayacak mediatörlerin ve lenfoid dokuların in vitro ortamda bulunmaması olduğu düşünülmektedir. Probiyotiklerin akut invazif bakteriyel diyaredede etki mekanizması net değildir. Ek olarak klinik öneme sahip olup olmadığını da anlamak için daha çok randomize kontrollü çalışmaya ihtiyaç vardır (32).

SONUÇ

L. acidophilus'un *S. Typhi*'nin sitotoksitite mekanizmalarını hangi yolu kullanarak inhibe ettiğini anlamak; *S. boulardii*'nin *S. dysenteria* ve *S. Typhi* ile enfekte Caco-2 hücre kültüründe yara iyileşmesi etkinlik çalışmalarının, *S. boulardii*'nin artan dozlarıyla tekrarlanması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların beyan edecekleri çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-15005 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Teşekkür

Uzman Biyolog Özgenur Yılmaz'a süreçteki katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. İnanç N, Şahin H, Çiçek B. Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri. *Erciyes Tıp Derg* 2005; 27:122-7.
2. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(18):10452-9.
3. Küküker MA. Barsak florası ve patojen mikroorganizmalarla etkileşimi. *Aktüel Tıp Dergisi* 2003;8:6-8.
4. Salminen S, Isolauri E. Intestinal colonization, microbiota and probiotics. *J Pediatr* 2006; 149:115-20.
5. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(1):946-9.
6. Bergonzelli GE, Blum S, Brussow H, Corthesy-Theulaz I. Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases *Digestion*. 2005; 72(1):57-68.
7. Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*. 2005; 54(3):317-20.
8. Yurist-Doutsch S, Arrieta M-C, Vogt SL, Finlay BB. Gastrointestinal microbiota-mediated control of enteric pathogens. *Annual Review of Genetics*. 2014; 48:361-82.
9. Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta M-C, Finlay BB. Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. *Annual Review of Microbiology*. 2014; 68:217-35.
10. Endt K, Stecher B, Chaffron S, Slack E, Tchitchek N, Benecke A, et al. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS Pathog*. 2010; 6(9):e1001097.
11. Que JU, Casey SW, Hentges DJ. Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. *Infect Immun*. 1986; 53(1):116-23.

12. Tannock GW, Savage DC. Indigenous microorganisms prevent reduction in cecal size induced by *Salmonella typhimurium* in vaccinated gnotobiotic mice. *Infect Immun*. 1976; 13(1):172-9.
13. Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology*. 1997; 15(7): 270-274.
14. Kara I, Yıldırım F, Özgen S, Erganiş S, Aydoğdu M, Dizbay M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after probiotic treatment in an intensive care unit patient. *Journal de Mycologie Médicale*. 2018; 28(1):218-221.
15. Snyder M, Hornick R, McCrumb Jr F, Morse L, Woodward T. Asymptomatic Typhoidal Bacteremia In Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1963; 161:604-7.
16. Kops SK, Lowe DK, Bement WM, West AB. Migration of *Salmonella typhi* through intestinal epithelial monolayers: an in vitro study. *Microbiology and Immunology*. 1996; 40(11):799-811.
17. Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *BioMed Research International*. 2008; 2008:357964.
18. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev Infect Dis*. 1991; 13 Suppl 4:S319-24.
19. Morduchowicz G, Huminer D, Siegman-Igra Y, Drucker M, Block CS, Pitlik SD. *Shigella* bacteremia in adults. A report of five cases and review of the literature. *Arch Intern Med*. 1987; 147(11):2034-7.
20. Struelens MJ, Patte D, Kabir I, Salam A, Nath SK, Butler T. *Shigella* septicemia: prevalence, presentation, risk factors, and outcome. *J Infect Dis*. 1985; 152(4):784- 90.
21. Clerc P, Sansonetti PJ. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect Immun*. 1987; 55(11):2681-8.
22. Pothoulakis C. anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 30(8):826-33.
23. Buts J-P. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Digestive Diseases and Sciences*. 2009; 54(1):15-8.
24. Aattouri N, Bouras M, Tome D, Marcos A, Lemonnier D. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production. *British Journal of Nutrition*. 2002; 87(4):367-73.
25. Htwe K, Yee KS, Tin M, Vandenplas Y. Effect of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 78(2):214-6.
26. Ozkan TB, Sahin E, Erdemir G, Budak F. Effect of *Saccharomyces boulardii* in children with acute gastroenteritis and its relationship to the immune response. *Journal of International Medical Research*. 2007; 35(2):201-12.
27. Rodrigues A, Nardi R, Bambirra E, Vieira E, Nicoli J. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*. 1996; 81(3):251-6.
28. Czerucka D, Rampal P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP-and Ca²⁺- dependent Cl-secretion in T84 cells. *Digestive Diseases and Sciences*. 1999; 44(11):2359-68.
29. Buts J-P, Bernasconi P, Vaerman J-P, Dive C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Diseases and Sciences*. 1990; 35(2):251-6.
30. Qamar A, Aboudola S, Warny M, Michetti P, Pothoulakis C, LaMont JT, et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin a immune response to clostridium difficile toxin a in mice. *Infection and Immunity*. 2001; 69(4):2762-5.
31. Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Chen X, Anton PM, Keates S, et al. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 343(1):69-76.
32. Blaser MJ, Feldman RA. From the centers for disease control. *Salmonella* bacteremia: reports to the Centers for Disease Control, 1968-1979. *J Infect Dis*. 1981; 143(5):743-6.