

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KEFİRİN SIÇANLARDA DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE  
UYARILAN KOLİT MODELİNDE KORUYUCU ETKİNLİĞİ**

**Dr. Altuğ ŞENOL**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet İŞLER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi  
tarafından 1564-TU-07 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2010 - ISPARTA**

## TEŞEKKÜR

Gastroenteroloji uzmanlık eğitimimde, tecrübe ve bilgisini esirgemeyen ve yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet İŞLER, Prof. Dr. Yıldırım Songür, Doç. Dr M. Cem Koçkar, Prof. Dr.Ülkü Sarıtaş'a, her zaman beni destekleyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Doç. Dr. Ş. Ercan TUNÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Güçhan Alanoğlu, Yrd. Doç. Dr. Z.Dilek Aydın, Yrd. Doç. Dr. Banu Köroğlu'na, gastroenteroloji yan dal ihtisası yapan arkadaşlarım Dr.Gökhan Aksakal, Dr.Mete Akın'a, tez çalışmamın biyokimyasal analizlerinin çalışılmasında emeği geçen Doç. Dr. Recep Sütçü'ye ve projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim ve çocuklarıma derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

**Dr. Altuğ Şenol**

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>iii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>v</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ .....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>vii</b>
<b>KISALTMALAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etyopatogenez.....	4
2.1.3. İBH'ı Patogenezinde Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü .....	6
2.1.4. İBH Patogenezinde iNOS (Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentetaz) .....	7
2.1.5. İBH'nın Klinik Özellikleri .....	8
2.1.6. İBH'da Endoskopik Bulgular.....	9
2.1.7. İBH'da Histolojik Bulgular.....	9
2.1.8. İBH'da Tedavi.....	10
2.2. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarının Tedavisinde Probiyotikler.....	12
2.2.1. Probiyotik Bakterilerin Etki Mekanizması.....	12
2.2.2. Epitel Bariyer Fonksiyonlarına Probiyotiklerin Etkisi.....	13
2.2.3. Probiyotiklerin Antimikrobiyal Etkileri.....	14
2.2.4. Probiyotikler ve Epitel Hücrelerinin İnflamatuvar Cevabı .....	14
2.2.5. Sistemik ve Mukozal İmmünitede Probiyotiklerin Etkileri .....	15
2.3. DSS Deneysel Kolit Modeli.....	15
<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>17</b>
3.1. Materyal .....	17
3.1.1. Deney Hayvanları.....	17
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler .....	17
3.2. Metod .....	18
3.2.1. Projede Kullanılan Kefir .....	18
3.2.2. Kolit İndüksiyonu .....	18

3.2.3. İlaç Uygulamaları.....	18
3.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması.....	18
3.2.5. Deneyin Sonlandırılması.....	19
3.2.6. İncelemelerde Kullanılacak Kolon Dokusunun Ayrılması.....	19
3.2.7. Hastalık Aktivite İndeksi'nin (HAI) Belirlenmesi.....	19
3.2.8. Histopatolojik Değerlendirme.....	20
3.2.9. Biyokimyasal Analizler İçin Dokuların Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması.....	21
3.2.10. Dokularda Biyokimyasal Analizler.....	21
3.2.11. iNOS Değerlendirmesi.....	21
3.2.12. MDA Ölçümü.....	22
3.2.13. İstatistiksel Analiz.....	22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
4.1. Çalışma Sürecinde Sıçanlarda Ağırlık Değişimi.....	24
4.2. Sıçanların Kolon Boy, Kilo ve Kilo/Boy Ölçümleri.....	24
4.3. Hemogram Parametrelerinde Değişiklikler.....	25
4.4. Hastalık Aktivite İndeksinin Değerlendirilmesi.....	26
4.5. Mikroskopik Kolit Skorlaması.....	28
4.6. Biyokimyasal Analizler.....	30
4.6.1. Kolon Dokusunda TNF-alfa Düzeyi.....	30
4.6.2. Kolon Dokusunda MPO Düzeyi.....	30
4.6.3. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi.....	31
4.6.4. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyi.....	32
4.6.5. Kolon Dokusundaki iNOS Düzeyleri.....	33
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>44</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>46</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1: Gruplara göre hemogram parametreleri.....	25
Şekil 4.2: Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri.....	27
Şekil 4.3: Gruplara göre mikroskopik kolit skoru.....	28
Şekil 4.4: Gruplara göre kolon TNF- $\alpha$ aktivitesi .....	30
Şekil 4.5: Gruplara göre kolon MPO aktivitesi.....	31
Şekil 4.6: Gruplara göre kolon MDA aktivitesi.....	32
Şekil 4.7: Gruplara göre kolon IL-10 aktivitesi .....	32
Şekil 4.8: Gruplara göre iNOS konsantrasyonları.....	33

**RESİMLER DİZİNİ**

Resim 4.1. Kontrol grubundaki sıçan kolonu .....	26
Resim 4.2. Kolit indüksiyonu yapılmış sıçan kolonu .....	26
Resim 4.3. Normal sıçan kolon dokusu (H&E, X100) (kontrol grubu).....	29
Resim 4.4. L.propriada hafif derecede akut inflamasyon (H&E, X100) (kefir- kontrol grubu) .....	29
Resim 4.5. Yüzey epiteli ve kript kaybı ile yaygın ülserasyon (H&E, X100) (kolit grubu)29	29
Resim 4.6. Yüzey epiteli ve kript kaybı ile yaygın ülserasyon, submukozal hafif inflamasyon ve orta derecede ödem (H&E, X100) (kefir-kolit grubu) .....	29
Resim 4.7: Western blot yöntemi ile gruplara göre iNOS ekspresyonu .....	33

**TABLolar DİZİNİ**

Tablo 3.1: Kullanılan malzeme ve aletler .....	17
Tablo 3.2. Hastalık aktivite indeksi .....	20
Tablo 3.3: Mikroskopik kolit skoru .....	20
Tablo 4.1: Gruplara göre tedavi öncesi ve sonu sıçan ağırlıkları.....	24
Tablo 4.2: Gruplara göre kolon boy, kilo ve kilo/boy ölçümleri .....	24
Tablo 4.3: Gruplara göre hemogram parametreleri.....	25
Tablo 4.4: Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri.....	27
Tablo 4.5: Gruplara göre mikroskopik kolit skoru.....	28
Tablo 4.6: Gruplara göre kolon TNF-alfa aktivitesi .....	30
Tablo 4.7: Gruplara göre kolon MPO aktivitesi.....	31
Tablo 4.8: Gruplara göre kolon MDA aktivitesi.....	31
Tablo 4.9: Gruplara göre kolon IL-10 aktivitesi .....	32

## KISALTMALAR

<b>CH</b>	: Crohn hastalığı
<b>ÜK</b>	: Ülseratif kolit
<b>İBH</b>	: İnflamatuvar barsak hastalığı
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>DSS</b>	: Dekstran sülfat sodyum
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>MDA</b>	: Malondiladehid
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>iNOS</b>	: Inducible nitrik oksit sentaz
<b>HLA</b>	: Human lökosit antijen
<b>TGF</b>	: Transforming growth factor
<b>EGF</b>	: Epidermal growth factor
<b>KGf</b>	: Keratinocyte growth factor
<b>APC</b>	: Antigen-presenting cell
<b>IFN</b>	: Interferon
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dizmutaz
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>O<sub>2</sub>-</b>	: Süperoksit anyonu
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>HOCl</b>	: Hipoklorik asit
<b>LOO</b>	: Lipid peroksil radikalleri
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa-B
<b>5-ASA</b>	: 5-aminosalisilik asit
<b>MP</b>	: 6-merkaptopürin
<b>AZA</b>	: Azatidyopürin
<b>TLRs</b>	: Toll-like reseptörler
<b>AP</b>	: Aktive protein
<b>TNBS</b>	: Trinitrobenzen sülfonik asit
<b>NOD 2</b>	: Nucleotide-binding oligomerization domain containing



<b>PBS</b>	: Phosphate buffered salin
<b>HAI</b>	: Hastalık Aktivite İndeksi
<b>HE</b>	: Hematoksilen eozin
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>HPLC</b>	: High performance liquid chromatograpy
<b>CCL<sub>4</sub></b>	: Karbon tetraklorür
<b>NO</b>	: Nitrik oksid
<b>Hgb</b>	: Hemoglobin
<b>Hct</b>	: Hematokrit
<b>WBC</b>	: White Blood Cell

## 1. GİRİŞ

Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK), gastrointestinal kanalın kronik inflamatuvar hastalıkları (İBH) olup, klinik, endoskopik ve histolojik bulguları ile tanımlanırlar. Hastalığın etiopatogenezi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte çevresel, genetik ve immün faktörlerin rolü olduğunda görüş birliği vardır.

Patogeneizde ve hastalığın ilerlemesinde immunogenetik mekanizmaların önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer taraftan, hastalığın oluşumunda ve progresyonunda enterik floranın önceden kabul edildiğinden daha fazla katkısının olduğu anlaşılmıştır (1).

Memelilerin intestinal kanalı içinde patojenik ve nonpatojenik mikroorganizmaların çeşitli etkileşimler içinde yaşadığı kompleks bir yapıdır. Geçmişte mikrobiyolojik araştırmalar çoğunlukla patojen mikroorganizmaların zararlı etkileri üzerine odaklanmıştı. Bununla birlikte son yıllarda araştırmalar özellikle konakta doğal olarak bulunan nonpatojenik mikroorganizmaların yararları üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır (2).

Probiyotikler “yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya sağlık kazandıran yaşayan mikroorganizmalardır” (3). Probiyotiklerin kalın barsakta kolonize olarak patojen mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe etmeleri, barsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabete girerek patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri, ince ve kalın barsakta immün hücreler ile etkileşime girerek konakçı immun sistemini ve mukozal bariyer sistemini düzenlemeleri, bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit gibi antimikrobiyal faktörler açığa çıkarak patojen mikroorganizmaların çoğalmasını baskı altında tutmaları, apoptozisin modülasyonu gibi işlevleri ile yararlı olabilirler (4).

Klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir ki, inflamatuvar barsak hastalığında barsak mikroflorasında patojen bakteri türleri lehine bir denge değişikliği vardır (5, 6). Mikroflora, patojen bakteri türlerine etkili antibiyotiklerle değiştirilebileceği gibi, probiyotiklerle de modifiye edilebilir. *Escherichia coli* ve bazı laktobasil suşlarının genetik olarak anti-inflamatuvar sitokin interlökin (IL)-10 eksikliği olan sıçanlarda spontan olarak gelişen intestinal inflamasyonu engellediği gösterilmiştir (7).

Kefir, Kafkasya kökenli fermente bir süttür. Kefiri, klasik fermente süttten (yoğurt) ayıran özellik sadece mayalar ve bakterilerden oluşan kefir tanelerinden elde ediliyor olmasıdır. Bu taneler polisakkarit bir matriks tarafından bir arada tutulan küçük bir mikroorganizma kümesidir. Kefir tanelerinin mikroflorası birçok bakteri ve mayanın kompleks bir şekilde birleşmesiyle oluşmuştur. Bu türler arasında laktobasiller, streptokoklar, asetobakterler ve mayalar bulunur. Literatürde kefirin deneysel kolit modellerinde koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bir makale bulunmamaktadır.

Kemirgenlerde DSS ile oluşturulan kolit modeli, insan ÜK'inde bulunan bazı klinik ve histopatolojik özellikleri yansıtabilmektedir. Bu yüzden çalışmada DSS ile uyarılan kolit modeli seçilmiştir.

Çalışmamızın amacı sıçanlarda DSS ile uyarılan kolitte, kefirin koruyucu etkisi olup olmadığını test etmektir. Klinik ve histopatolojik değerlendirme yanı sıra, lökosit infiltrasyonunun biyokimyasal bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO), lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondiladehid (MDA), bir proinflamatuvar sitokin olan tümör nekroz faktör (TNF)-alfa, anti-inflamatuvar sitokin interlökin-10 ve inflamatuvar süreçte yer alan uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) konsantrasyonlarının da belirlenmesi planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

ÜK ve CH, gastrointestinal kanalın kronik inflamatuvar hastalıklarıdır. Tanıda, klinik bulgular, endoskopik görünüm ve histopatolojik inceleme önemlidir (8).

ÜK kolonun mukoza tabakasıyla sınırlı, tekrarlayıcı özellikte bir inflamasyon ile karakterli, hemen daima rektumu tutan, proksimale doğru yayılabilen, kolonda atlama alanı olmaksızın sürekli, simetrik bir tutulumu neden olan bir hastalıktır.

CH'daki inflamasyon ise tipik olarak transmuraldır. Bu durum sıklıkla progresif darlıklar ve fibrozis oluşumundan perforasyonlara kadar gidebilen komplikasyonlara neden olur (9). ÜK'in aksine CH gastrointestinal kanalın herhangi bir bölümünü etkileyebilir. Tutulum devamlı değildir, arada normal segmentler vardır (9). Tüm hastaların yaklaşık yarısında terminal ileum ve çekum hastalığa tutulmuştur.

Hastaların %5-15'i her iki hastalığın karakteristik özelliklerine sahiptir ve kesin olarak birbirinden ayırt edilemez; bu duruma *indeterminate kolit* ismi verilir (8).

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Dünyada ÜK ve CH için en yüksek insidans ve prevalans oranları kuzey Avrupa, İngiltere ve kuzey Amerika'dan bildirilmektedir. Güney Avrupa, Asya ve gelişmekte olan ülkelerdeki hastalık insidansı da giderek artmaktadır. Coğrafik olarak değişmekle birlikte CH'nın insidansı ve prevalansı sırasıyla 1-6 ve 10 /100.000, ÜK'nin 2-10 ve 35-100 /100.000'dir. Bu rakamlar kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde daha yüksektir. (8).

Coğrafik bölgelerde ırksal farklılıklar da görülmektedir, yahudilerde yahudi olmayanlara göre sıklığı daha fazladır (8).

IBH tipik olarak genç erişkinlerde, sıklıkla adölesanlarda görülür. Ortalama teşhis yaşı CH için 3., ÜK için 4. dekattır. İkinci pik yaşı 6. ve 7. dekatlardadır. Erkek ve kadınlarda görülme sıklığı eşittir (9).

### 2.1.2. Etyopatogenez

İBH etyopatogenezi karmaşık bir yapı sergilemektedir; genetik yatkınlığın önemi açık olmakla birlikte, hastalığın ortaya çıkmasında çok sayıda çevresel faktörün etkisi olduğu saptanmıştır.

Genetik faktörlere ait delillerin çoğu, İBH'lı hastaların ailelerinde ve ikizlerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Aile bireylerinde hastalığa yatkınlık, ortak çevre faktörlerinden de kaynaklanabilir. Hasta kişilerin aynı çevreyi paylaşan ve paylaşmayan monozigot ikizlerinin incelenmesi genetik predispozisyon hakkında önemli bilgiler vermiştir. Yaşa bağlı ampirik risk CH'lı olguların 1. derece yakınlarında %5-8, ÜK'li hastaların 1. derece yakınlarında %2-5'dir (9).

Human lökosit antijen (HLA) CH ve ÜK'le ilişkili bulunmuştur. DR1/DQw5 ve DRB30301 haplotipleri CH ile, HLA-DR2 ülseratif kolitle ilişkilidir.

Genetik çalışmalarda İBH ile ilişkili iki şüpheli lokus tanımlanmıştır. Kromozom 16'da İBH1 ve kromozom 12'de İBH2. İBH1 asıl olarak CH ile İBH2 hem ÜK hem de CH ile ilişkilendirilmiştir. İBH1 ile ilişkili NOD2 geni tanımlanmıştır. NOD2 gen mutasyonları CH'da normal popülasyondan daha sıktır. NOD2 mutasyonu olan bireylerde, endojen barsak bakterilerine yetersiz yanıt oluştuğu ve bu şekilde kronik intestinal inflamasyon geliştiği öne sürülmektedir (10, 11).

İBH patogenezinde çevresel faktörlerin rolünü destekleyen en önemli kanıt hastalık insidansının düşük olduğu yerlerden gelişmiş ülkelere göç edenlerde hastalık insidansın artmasıdır. İBH özellikle CH sosyoekonomik şartları iyi olanlarda daha fazla görülme eğilimindedir. Çevresel faktörlerden sigaranın İBH'deki yeri ilginçtir. ÜK'li hastalar arasında sigara kullanma insidansı genel popülasyondan daha azdır. Sigara CH'da hastalık seyrini ağırlaştırır, fistül ve striktür oluşumunu, kortikosteroid gereksinimini, cerrahi müdahale riskini artırır (11). CH'daki granümatöz ileitin paramiksovirus aracılı vaskülit veya *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'e bağlı Johne hastalığı'na benzerliği, CH'nın bir enfeksiyona bağlı gelişebileceğini akla getirmiştir. Gastrointestinal infeksiyonlardan sonra İBH gelişebilmesi infeksiyöz etkenlerin patogeneizde rolünü destekleyen bir olgudur. İBH'lı kişilerin barsak mukozası bakteri konsantrasyonları normal

kişilerdekinden yüksektir. Bununla beraber, İBH'ya neden olduğu gösterilebilmiş spesifik bir mikroorganizma yoktur (11).

İBH'da immün cevabın bozulduğu ve bunun iki temel mekanizma üzerinden işleyebileceği speküle edilmiştir: İntestinal lümende bulunan bakterilere ve bu bakteri ürünlerine karşı normal immün sistem cevabının bozulması; normalde herhangi bir immün cevap çıkarmayan intestinal mikroorganizmalara karşı immün cevabın ortaya çıkması.

Tek katlı epitel, bunu örten mukus ve enterositler arasındaki sıkı bağlaçlar fiziksel bir bariyer oluşturup, potansiyel patojen ve lüminal antijenlerin lamina propriaya ulaşmasına engel olur. Ayrıca lümeden salgılanan sekretuar IgA bunların epitele yapışmasını engeller. İBH'da sıkı bağlaçların bütünlüğü bozulmuştur, ayrıca yüzey epitelinin kayıp ve yıkımı sonucunda lümendeki antijenler lamina propriaya geçip inflamatuvar sürecin başlamasına neden olabilir *Transforming growth factor* (TGF)-alfa ve TGF-beta, *epidermal growth factor* (EGF), *keratinocyte growth factor* (KGF) ve IL-11 epitelyal bariyerin restorasyonu için lümene salınır (12).

Normal koşullarda intestinal mukoza fizyolojik inflamasyon durumundadır. TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerle denge halindedir. Antijen presente edici hücrenin (APC) olayı tetikleyici antijeni sunmasıyla mukozal lenfositler interferon (IFN)-gama ve IL-2'yi sekrete etmek üzere aktive olurlar. IL-2 T hücrelerinin kolonal genişlemesini ve T ile B hücre fonksiyonlarını uyarır. IFN-gama ise APC ve makrofajları IL-12'yi üretmek üzere uyarır. Böylece T hepler 1 (Th1) hücre differansiyasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir, IFN-gama, IL-2 ve TNF üretilir. IFN-gama ayrıca endotel hücrelerini endotelyal hücre adezyon molekülleri oluşturmak ve makrofajları da proinflamatuvar sitokinleri (TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-18), reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri üretmek üzere aktive eder. Normal kişilerde bu inflamatuvar yanıt, baskılayıcı sitokinler (IL-10, Th3 kökenli TGF-beta) ile kontrol altında tutulur. Bu mekanizma işlemeyecek olursa şiddetli doku hasarı oluşur (13).

### 2.1.3. İBH'ı Patogenezinde Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Oksijen ( $O_2$ ) canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Moleküler oksijen, paralel durumda iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest oksijen radikalleri olarak tanımlanırlar. Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, yüksek derecede serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşturma eğilimindedir. SOR normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan reaktif ve potansiyel olarak zararlı olabilen maddelerdir (14, 15).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. SOR'un oluşumu inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, bazı kimyasal maddelere maruz kalma gibi durumlarda artar. Bu radikaller hücrelerin lipid, DNA, protein gibi önemli bileşenlerine etki eder ve hücre hasarı oluşur (14-16).

İnflamasyon sürecinde polimorfonükleer lökositlerin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, SOD (süperoksit dizmutaz), nitrik oksit sentaz (NOS) ve MPO (myeloperoksidaz) gibi enzimler süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrik oksit (NO) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (17-19).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı hassas biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı ile lipid peroksidasyonu gerçekleşir (20, 21). Bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında bulunan metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile lipid peroksidasyonu başlar ve lipid peroksidasyonu sonrasında hücrede, zincirleme reaksiyonlar oluşur (20). Peroksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri ( $LOO\cdot$ ), bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonların oluşmasına sebep olur. Lipid peroksil radikalleri, daha ileri parçalanma ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler aldehitlere dönüşürler.

Aldehitlerin zararlı etkileri daha fazladır. MDA, bu aldehitler içinde en çok bilinen aldehittir. Ortamdaki MDA düzeyleri lipid peroksidasyonun derecesiyle korelasyon gösterir (22). Oluşan MDA diffüzyon ile hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına giderek hasar oluşturabilir. Bu hasar ile membranın yapısında ve fonksiyonlarında büyük ölçüde bozulma gerçekleşir.

İBH'da barsaktaki inflamasyon aktive myeloperoksidaz içeren fagositler, serbest oksijen ve nitrojen radikalleri içeren toksik ve hasar verebilen ajanlara uzun süre ve yoğun bir şekilde karşılaşma sonrası oluşmaktadır. Bununla birlikte İBH'da intestinal mukozada direkt olarak SOR'ni sayısal olarak göstermek zordur. Bu, kısa yarı ömürlerinden ötürü hücre ve dokularda SOR ve nitrojen ölçümündeki teknik zorluktan kaynaklanmaktadır (23). "Elektron spin resonance spectroscopy" ve "chemiluminescence" gibi daha güvenilir teknikler özel ve pahalı laboratuvar donanımlı alt yapı ister (16). Ayrıca çeşitli laboratuvarlarda ÜK ve CH'lı hastaların barsak mukozasından alınan biyopsi örneklerinde "chemiluminescence" teknikleri ile SOR seviyeleri belirlenmiştir (24,25). Normal kolon mukozası ile karşılaştırıldığında İBH'da süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi SOR ürünlerinin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Benzer olarak bu hastalarda NO'in düzeyleri artmıştır (26, 27). İBH'da gözlenen bu değişikliklerin hastalığın endoskopik ve klinik aktivitesiyle ilişkisi olabileceği gösterilmiştir (16). İBH'lı hastalarda barsakta aşırı SOR üretiminin, diyare ile sonuçlanan artmış elektrolit ve su sekresyonundan sorumlu olabileceği belirtilmektedir (28).

#### **2.1.4. İBH Patogenezinde iNOS (Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentetaz)**

Nitrik oksid (NO) trombosit ve lökosit aktivasyonu, damarsal reaktivitenin düzenlenmesi, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve nonspesifik immun reaksiyonlar gibi geniş bir fizyolojik fonksiyon spektrumu gösteren, kısa etkili biyolojik bir mediatördür (29). NO, vasküler endotel hücreleri, trombositler, makrofajlar ve nöronal hücrelerin dahil olduğu çeşitli dokularda nitrik oksit sentetaz ailesine ait bazı enzimlerin katalize ettiği bir reaksiyonla L-arginin aminoasidinden sentezlenir. Sentezi  $Ca^{2+}$  tarafından düzenlenen endotelial (eNOS) ve nöronal (nNOS) dışında hücreler  $Ca^{2+}$  düzeylerinden bağımsız birçok inflamatuvar mediatör tarafından sentezi uyarılan inducible NOS (iNOS) NO salgılanmasını arttırarak inflamatuvar sürece katkı



sağlar (29, 30). NO'nun İBH'daki rolü hala tam olarak bilinmemektedir. CH'da, iNOS'un artmış düzeyleri hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (31, 32).

Kolon mukozasında aşırı NO yapımının, oksidatif stresi ve doku haraplanmasını artırarak kolon mukoza bütünlüğünü bozabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (33, 34, 35). İnflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF ve IFN-gama); makrofaj, intestinal epitelyum ve diğer hücreler NO yapımının önemli uyarıcılarıdır (36). Ayrıca in vitro yapılan bir çalışmada, lipid peroksidasyonun son ürünü olan 4-hidroksihekzanal'ın endotel hücrelerinde iNOS gen ekspresyonunu nükleer faktör (NF)-kB aktivasyonu yoluyla uyardığı bildirilmiştir (37).

### 2.1.5. İBH'nın Klinik Özellikleri

CH, ağızdan perianal bölgeye kadar tüm gastrointestinal kanalı tutabilen, çoğunlukla ileum ve kolon yerleşimli, bağırsağın tüm katlarının hastalığa katıldığı kronik inflamatuvar bir hastalıktır. ÜK ise, ekstra intestinal inflamasyon potansiyeli taşıyan, kolon mukozasının idiopatik kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Hastalık anal bölgeden başlayıp kesintisiz bir şekilde proksimale doğru yayılarak kalın bağırsağın bir kısmını veya tamamını tutabilir (8).

CH'da semptomlar hastalığın anatomik yerleşimine bağlı olarak ortaya çıkar. İleoçekal hastalıkta karın ağrısı, ishal ve ateş tipiktir. Kolonik tutulumda, kanlı ishal, kilo kaybı ve ateş daha sıktır. Gastroduodenal tutulum olan hastalarda genelde yanıcı tarzda karın ağrısı ve erken doyma mevcuttur. Oral veya özofageal tutulumda disfaji, odinofaji görülebilir. Perianal hastalıkta ise perirektal abse, ağrılı ve ödematöz eksternal hemoroidler ve perianal fistüller olabilir. Enterovezikal fistüller pnömatri ve tekrarlayan üriner sistem infeksiyonlarına yol açabilir.

ÜK'de hastalığın başlangıcında barsak hareketlerinde hızlanma ve kanlı diyare, ani dışkılama isteği, kramp tarzı karın ağrısı ve ateş görülebilir. Süreç değişkendir alevlenme ve remisyonlarla seyredebilir. Hastaların yaklaşık yarısında proktit veya proktosigmoidit vardır. Rektal kanama görülebilir. Dışkılama sayısı 1-10 arasında değişebilir. Orta veya şiddetli semptomları olanlarda gece dışkılaması, kramp şeklinde karın ağrısı, bulantı, kanlı dışkılama görülebilir (8).

Şiddetli karın ağrısı ve hassasiyet, abdominal distansiyon, azalmış barsak hareketleri, rebound hassasiyet, ateş ve taşikardi gibi semptom ve bulgular, toksik megakolon'un belirtisi olabilir. Toksik megakolon, sıklıkla ÜK ile birliktelik gösterirken, CH'da da gözlenmektedir (38).

### **2.1.6. İBH'da Endoskopik Bulgular**

Kolonoskopide ÜK'de karakteristik mukozal değişiklikler; normal vasküler görünümün kaybolması, mukozal granülarite, frajilite, mukus eksüdasyonu ve fokal ülserasyonlar görülebilir. Hastalık anorektal bölgeden başlar diffüz / kesintisiz ve simetrik olarak proksimale doğru yayılır. Hasta inflamasyonlu bölge keskin bir şekilde sonlanarak normal mukozaya geçiş olur (8).

CH'da ağızdan anüse kadar herhangi bir bölgede lezyon görülebilir. Lezyonlar atlamalı olup arada sağlam bölgeler bırakır. Endoskopik bulgular ÜK'ten farklı olarak heterojen ve asimetriktir. Hastalığın klinik davranışına bağlı olarak fistül ağızları ve darlıklar izlenebilir. CH gastrointestinal segmenti tam kat olarak etkiler, bu nedenle derin ülserler izlenir, tutulum alanları arasında normal görünümlü mukoza vardır (8).

### **2.1.7. İBH'da Histolojik Bulgular**

Gastrointestinal kanaldan alınan mukozal biyopsiler infeksiyöz ve infeksiyon dışı (iskemik, ilaca bağlı ve radyasyon koliti gibi) kolitlerin ayırımı için faydalıdır. Non-kazeifiye granülomların görülmesi CH'nı düşündürebilir. Bu ÜK'de görülmez, ancak non-kazeifiye granülomlar vakaların çok az bir kısmında mevcuttur (8).

CH'da histolojik olarak fokal aktif kolit, fokal kriptit, lamina propriada fokal hafif şiddette nötrofil lökosit infiltrasyonu, kriptlerde paralellik yani distorsiyonun olmaması, intakt yüzey epiteli gibi bulgular dikkat çeker (8). ÜK'de diffüz aktif kolit, kript absesi, kriptit, lamina propriada diffüz mikst tip inflamatuvar hücre (nötrofil, mononükleer) infiltrasyonu, kript distorsiyonu, bazal lenfoplazmositoz, epitelde müsin azalması, psödivillöz yüzey görülebilir (8).

### 2.1.8. İBH'da Tedavi

1990'lı yılların sonuna kadar İBH tedavisi 5-aminosalisilik asit (5-ASA), kortikosteroidler, antibiyotikler ve daha az oranda azatiyopirin/6-merkaptopürin veya methotreksatlı immünosüpresif tedavilerden oluşmaktaydı. Son yıllarda bu tedavilere ek olarak yeni katılan ajanlarla tedavide önemli değişiklikler olmuştur. Tedavi seçimi hastalığın yayılımı ve şiddeti, hastanın önceki ve varolan tedavilere yanıtı, komplikasyonların varlığı, klinik amaç (indüksiyon ve remisyonun idamesi), ilacın yan etkilerine göre belirlenir (39, 40). Medikal tedavilerden yanıt alınmadığında veya komplikasyon geliştiğinde cerrahi seçenek düşünülmelidir. .

Hem medikal hem de cerrahi tedavi İBH'da tam olarak hastalığı yok edemez. Amaç remisyonun indüksiyonu ve sürdürülmesidir (41).

**a) Aminosalisilat preparatları:** Sıklıkla 5-aminosalisilat (5-ASA) içeren ilaçlar hafif-orta İBH'da tercih edilir. Lokal lipooksijenaz yollarının inhibisyonu, serbest radikallerin temizlenmesi ve sitokin üretiminin düzenlenmesi gibi etkileri vardır. Bu grup ilaçlar özellikle ÜK'de remisyonun sağlanması ve devamında temel basamağı oluşturmaktadır. Sulfasalazin, sulfapiridin ve 5 aminosalisilat (5-ASA)'ın azo bağı ile bağlanması ile meydana gelmektedir. Kolonda bakteriyel flora tarafından bağın parçalanması ile 5-ASA salınmakta ve salınan 5-ASA lokal olarak inflamasyonu azaltmaktadır (8).

**b) Antibiyotikler:** Geniş spektrumlu antibiyotikler CH'da apse, perianal hastalık ve ince barsakta darlığın proksimalinde staza bağlı bakteriyel aşırı çoğalma gibi süpüratif komplikasyonların tedavisinde önemlidir. Metronidazol perianal CH'da etkilidir ve Crohn kolitinde hastalık aktivitesini azaltabilir (8).

**c) Kortikosteroidler:** ÜK ve CH'da remisyonun indüksiyonunda etkilidir. Bu ajanlar inflamatuvar sürecin erken (vasküler permeabilite, vazodilatasyon ve nötrofil infiltrasyonu) ve geç (vasküler proliferasyon, fibroblast aktivasyonu ve kollojen birikimi) evrelerini bloke eder. Orta-ağır ÜK ve CH'da remisyonun sağlanmasında etkilidirler. Yan etkilerden dolayı remisyon idamesinde tercih edilmezler (8).

#### d) İmmünsüpresif tedaviler

**AZA/6-MP:** 6-merkaptopürin (MP) ve azatiyopürin (AZA), immünosüpresif ajanlar olarak fonksiyon gören purin analoglarıdır. Aktif metabolitleri nükleik asit sentezini engeller. IBH'da etki mekanizmaları açık değildir, fakat T hücrelerinin gelişimini inhibe ettikleri üzerinde durulmaktadır. CH'da remisyona sürdürülmesinde etkilidir. ÜK'de steroid tedavisine refrakter hastalıkta, uzun süre tedavi ihtiyacında steroid yan etkilerinden kaçınmak için tercih edilir. Lökopeni, pankreatit, hepatit ve bulantı gibi yan etkileri olabilir (9).

**Metotreksat:** Metotreksat bir folat antimetabolitidir. 25 mg/hafta subkutan veya intramusküler verildiğinde özellikle CH'da remisyona induksiyonunda etkilidir. Remisyona idamesinde düşük dozlarda (15 mg/hafta) kullanılabilir. Oral kullanımının etkili olmadığı gösterilmiştir. Bulantı, pansitopeni, pnömoni, hepatit ve hepatik fibroz gibi yan etkileri vardır (9).

**Siklosporin:** İntravenöz siklosporin steroid tedavisine refrakter şiddetli ÜK'de etkilidir (8). Bu kişilerde daha sonra remisyona sağlandığında, oral siklosporin ve 6-MP ile devam edilir. Fistülizan CH'da etkili olabilir. Ciddi nörolojik ve renal yan etkileri vardır (9).

**Diğer ajanlar:** Kalsinörin inhibitörü takrolimusun fistülizan CH'da etkinliği gösterilmiştir. Fakat uzun dönemde renal toksisite ve fırsatçı enfeksiyonlar gibi yan etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlanmıştır. Talidomid anti-TNF etkilerinden dolayı faydalı gibi gözükmemektedir, ancak yan etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlıdır. Natalizumab alfa-4 integrine karşı doğrudan etkili bir antikordur. Lökosit fonksiyonlarını inhibe eder. CH'da etkili olmasına rağmen progresif multifokal lökoensefalopati yapma riskinden dolayı kısıtlı kullanılmaktadır (9).

#### e) TNF-alfa inhibitörleri

**İnfliksımab:** TNF-alfa'ya karşı oluşan bir fare-insan şimerik monoklonal antikordur. Özellikle orta-ciddi CH'nın medikal tedavisinde kullanılmaktadır. İnfliksımab, 6-MP gibi standart medikal tedavilere cevap vermeyen veya steroid bağımlı fistülizan CH'nın tedavisinde endikedir. CH'da remisyonu devam ettirmek için 8 haftalık dozlarda kullanılır. Tedavinin başında %80'lerde olan cevap oranı 1 yılda %25'lere düşmektedir. İnfliksımab tedavisine cevap kaybı olan hastalarda doz

artırmak veya 8 haftalık intervalleri 6 haftaya düşürmek gibi alternatifler denenebilir (9).

**Adalimumab:** İnsan TNF-alfa'sına karşı yüksek affinite ile bağlanan, insan kaynaklı ağır ve hafif zincir değişken IgG1 sabit bölgesi içeren, rekombinan insan IgG1 monoklonal antikordur. Yanıt oranları infliksimaba benzer. Son çalışmalarda infliksimaba yanıtı olmayan hastalarda verildiğinden 1 yıllık cevap oranları %35'lerde olmaktadır. Fistülizan CH'da %40 oranında fistüllerde iyileşme ve 2 yılın üzerinde remisyonun devam ettiği bildirilmiştir (9).

**Sertulizumab pegol:** CDP870 Fab fragmanı polietilen glikol ile kimyasal olarak bağlı monoklonal insan anti-TNF-alfa antikordur. Yanıt oranları adalimumaba benzerdir.

Anti-TNF biyolojik ajanlarının en sık yan etkisi enfeksiyondur. Latent tüberküloz ve hepatit B enfeksiyonu olanlarda tedavi ile bu hastalıklarda aktiflenme olabilmektedir. Yine piyonejik enfeksiyonların oluşmasına yardımcı olabilirler. Lenfoma riskinde hafif bir artıştan korkulmasına rağmen bu açık değildir. Serum hastalığı, lupus-benzeri hastalık ve infüzyon reaksiyonları görülebilmektedir (9).

## 2.2. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarının Tedavisinde Probiyotikler

### 2.2.1. Probiyotik Bakterilerin Etki Mekanizması

Birçok çalışmada probiyotik bakterilerin, İBH'da faydalı etkileri, barsak mukozasında kolonizasyonu, patojen mikroorganizmaların çoğalması ve mukozaya invazyonunu engellemesi ile sağladığı belirtilmiştir. Barsak mukozasında mevcut olan mikrobiyolojik denge, barsak epitel hücrelerinde spesifik bağlanma bölgeleri için komensal ve patojen bakteriler arasındaki yarışma sonucu patojen bakterilerin barsak mukozasına tutunmalarının engellenmesi ile sağlanır (42). Son zamanlarda araştırmalar, probiyotik bakterilerin ve onların sekrete ettikleri ürünlerin konakta hangi mekanizmalarla doğal ve kazanılmış immün yanıtı etkilediklerini anlamaya yöneliktir. İmmün ve epitel hücreleri toll-like reseptörler (TLRs) aracılığıyla farklı mikrobiyolojik türlere özgü yapıları tanıyabilir. Farklı TLRs vardır ve bunlar farklı hücre içi sinyal yollarını aktive eder. İnflamasyonun sınırlandırılması da yine hücre içi TLRs sinyal yolunun kontrolü ile sağlanmaktadır (42). TLRs'nin çeşitli

uyaranlarla aktivasyonu hücre içi MAP kinazlar, NF-κB gibi çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Bunun sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlayan genlerin transkripsiyonunun başlaması sağlanır (43).

### 2.2.2. Epitel Bariyer Fonksiyonlarına Probiyotiklerin Etkisi

Gastrointestinal sistemin epitel yüzeyi hem komensal hem de patojen mikroorganizmaların içeriye girişini azaltmak için bariyerdir. Bu bariyer fonksiyonlarındaki değişiklikler İBH'nın patogeneğinde etkili olmaktadır. Probiyotikler epitel bariyer fonksiyonunun sağlanmasında önemli yer tutar. Ancak bu etkileri, spesifik bazı probiyotik mikroorganizmalarla sınırlı olabilir. Bariyer fonksiyonunun korunması bir probiyotik organizmanın sekrete ettiği ürünlere veya onun yüzeyel moleküler yapısıyla ilişkili olabilir (44). Probiyotiklerin etkilerinin araştırıldığı iki çalışmada, bazı probiyotik bakteri suşlarının farklı mekanizmalarla bariyer fonksiyonlarını arttırabileceği gösterilmiştir. Resta-Lenert ve arkadaşları, canlı *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus acidophilus*'un insan barsak epitel hücre dizileri içine enteroinvazif *Escherichia coli* invazyon ve adezyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu probiyotik bakterilerin epitel hücrelerinin sıkı bağlaçlarındaki okludin ve aktinin'in fosforilasyonunu arttırdığı saptanmıştır (45). İkinci çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin, intestinal epitel hücre kültürü modelinde, TNF'in inhibisyonu yoluyla proapoptotik p38/mitogenin aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuş ve bu yolla sitokinle uyarılan apoptozun önlenileceği bildirilmiştir (44, 46).

Probiyotikler özellikle TLR2 ve TLR4 gibi TLR'ler ile etkileşime girerek mukozal bariyer fonksiyonlarını etkileyebilirler. Probiyotikler bu reseptörlerle etkileşime girerek IL-6 ve KC-1 gibi koruyucu sitokinlerin üretimini artırma ve epitel hücre rejenerasyonu olumlu etkileyerek apoptozisi inhibe edebilirler. Yine de tüm mikroorganizmaların TLR'deki etkisi benzer değildir. Son yıllarda HT29 epitel hücre kültürlerinde patojenik organizmaların DNA'sının TLR9 ekspresyonunu arttırdığı, probiyotiklerin bu etkiyi yapmadıkları tespit edilmiştir (44, 47).

Epitel bariyer fonksiyonlarının sürdürülmesinde probiyotiklerin diğer etkisi, epitel bütünlüğünün bozulmasına etki edebilecek inflamatuvar sitokinlerin fonksiyonlarını bloke edebilmesidir. Madsen ve arkadaşları, kronik kolit

oluşturulmuş IL-10 defektli farelerde probiyotiklerin salmonella invazyonuna karşı insan mukozal epitel hücrelerinde rezistansı artırarak mukozal bariyer fonksiyonlarını olumlu etkilediğini göstermişlerdir (48). Ayrıca aynı çalışmada probiyotiklerle epitel hücre tabakası inkübasyonunun TNF-alfa, IFN-gama gibi proinflatuar sitokinler tarafından uyarılan epitel permeabilite değişikliklerini önlediği gösterilmiştir. Probiyotiklerin bu etkileri NF-κB'nin inhibisyonu yoluyla olmaktadır (49-51).

### **2.2.3. Probiyotiklerin Antimikrobiyal Etkileri**

Probiyotikler çeşitli mekanizmalarla patojen mikroorganizmaların lümen içi çoğalmasını inhibe edebilir. Bu etkilerini, barsak lümeninin pH'ını düşürme, bakteriosin gibi bakteriyel sitoproteinlerin sekresyonunu yapmaları, epitel hücrelerine bakterilerin adhezyonunu inhibe etmeleri gibi mekanizmalarla sağlarlar. Son yıllarda probiyotiklerin intestinal kriptlerden defansin üretimini de stimüle ettikleri gösterilmiştir (44, 51).

### **2.2.4. Probiyotikler ve Epitel Hücrelerinin İnflamatuar Cevabı**

Probiyotik bakterilerin Th-2 yanıtını güçlendirdiğini destekleyen bir klinik çalışma atopik çocuklarda yapılmış ve oral *Lactobacillus rhamnosus* GG tedavininin serum IL-10 konsantrasyonunu anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır (52). Ülseratif kolitli hastalarda yapılan klinik bir çalışmada üç bifidobakter suşu içeren probiyotik preparatının TNF-alfa ve IL-1beta ekspresyonunu azalttığı, IL-10 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (53). Barsak mukozasındaki epitel hücreleri farklı bakterilere ve bunların ürünlerine farklı bir şekilde yanıt verir, örneğin *E.coli* gibi patojenik bakterilere cevap olarak IL-8 üretirken, bu sitokini probiyotik bakterilere karşı üretmez (54). Bakteri DNA'sı epitel hücreleri tarafından farklı bir şekilde tanınır, patolojik suşlar ekstraselüler sinyalin regüle ettiği kinaz yolunun fosforilasyonunu uyarır ve aktive protein-1 (AP) oluşumunu sağlarken, probiyotik zincirleri NF-κB yolunu modüle ederek TNF-alfa cevabını düzenler (55).

### 2.2.5. Sistemik ve Mukozal İmmünyetede Probiyotiklerin Etkileri

Probiyotiklerin oral olarak verilmesiyle cilt, solunum yolları ve kadınlarda genital yollar gibi farklı bölgelerde sistemik ve mukozal immünyetede değişiklikler oluşabilir (44). Bifidobakter ve laktobasillerin spesifik suşları çocuklarda ve infantlarda ekzemanın tedavisi ve önlenmesinde kullanılmıştır, ilginç olarak bu çalışmada kolondaki total bakteri sayısında bir değişiklik görülmemiştir (56). Bu bulgular ile probiyotik verilmesiyle kazanılan sonuçlar kolonizasyondan ziyade immün sistemdeki değişiklikler neticesinde oluşmaktadır (44).

### 2.3. DSS Deneysel Kolit Modeli

İBH'nın patogenezi araştırmak veya tedavi ajanlarını değerlendirmek için kullanılabilecek bir deneysel modelin, klinik İBH'na patolojik, patofizyolojik ve klinik olarak benzemesi beklenir. Deneysel intestinal inflamasyon hayvan modelleri başlıca spontan ve indüklenebilir olarak sınıflandırılır; gerek spontan kolit, gerekse indüklenen kolit modellerinin akut ve kronik formları geliştirilmiştir (57). Yaygın olarak kullanılan intestinal inflamasyon modelleri asetik asit, formalin, indomethazin, trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS/ethanol) ve DSS ile uyarılan kolit modelleridir (57). Bu modellerin çoğunda temel sorun kronikleşmesinin zayıf olmasından dolayı hızlı iyileşme süreci görülmesidir ve bundan dolayı insan İBH'nın özelliklerinden biraz uzaklaşılır (57).

DSS ilk defa Okayasu ve arkadaşları tarafından deneysel kolit modelinde kullanılmıştır ve BALB/c sıçanlara oral verilen %5 DSS'nin yalnız akut koliti değil, aynı zamanda kronik koliti de uyardığı gösterilmiştir (58). Bu modellerle oluşturulan kolitin histopatolojik olarak ÜK benzediği ve ÜK'in patofizyolojisinin araştırılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (58). Takiben Cooper ve arkadaşları Swiss-Webster sıçanlarda DSS koliti oluşturmuşlar ve kolonda akut ve kronik inflamasyonu takiben oluşan fokal kript kaybını düşündüren mukozal değişiklikleri göstermişlerdir (58, 59).

DSS verildikten sonra kolondaki iyileşme süreci yavaş olmaktadır, birkaç haftayı alabilmektedir ve bu mukozanın kronik inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonu ile benzerlik gösterebilir (58). Bu yüzden DSS koliti ÜK benzerliği ile ideal bir



deneysel kolit modeline yakın görünmektedir. Ayrıca DSS ile uyarılan kolitte, insan ülseratif kolit örneğinde olduğu gibi lezyonlar başlıca sol kolonda ortaya çıkmaktadır (57). Yine insan İBH örneğine benzer olarak, DSS ile uyarılan kolitte, kolondaki çok sayıda Enterobakter ve Clostridium suşunun etkilendiği bildirilmiş (58), bir çalışmada, normal intestinal anaerob flora antijenlerinin ağızdan tekrarlayan dozlarda verilmesinin farelerde DSS ile uyarılan koliti önlediği gösterilmiştir (60).

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi ve Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı ve çalışmamız Etik Kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 18 haftalık, 198-264 gr ağırlığında 24 adet erkek Wistar-albino rat kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23<sup>0</sup>C) bulunduruldu. Her bir rat ayrı kafeslere konuldu ve standard rat yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Kullanılan malzeme ve aletler Tablo-3.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1:** Kullanılan malzeme ve aletler

1	Soğutmalı santrifüj	(Eppendorf MR 5415, Almanya)
2	Derin dondurucu	(Facis, Fransa)
3	Hassas terazi	(Scaltec, İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	(Nüve NM 100, Türkiye)
5	Otomatik pipetler	(Gilson, Fransa), (Eppendorf MR 5415, Almanya)
6	UV spektrofotometre	(Shimadzu UV 1601, Japonya)
7	Homojenizatör	(Ultra Turrax T25, Almanya)
8	Sonifikatör	(Bandelin Sonoplus, Almanya)
9	Otoklav	(Nüve EN 500, Türkiye)
10	Otoanalizör	Aeroset Automated Analyzer, Abbot Lab., Illinois, USA
11	HPLC	ThermoFinnigan Spectra HPLC with Diode Array Detector San Jose, California, USA
12	DSS	(Fluka-RA10585, Fransa)
13	MPO	(Immundiagnostik AG - K6631-061109, Almanya)
14	TNF- $\alpha$	(BioSource – KRC3011, Amerika Birleşik Devletleri)
15	IL-10	(BioSource – R121212A, Amerika Birleşik Devletleri)
16	MDA	(BioSource - KRC0101, Amerika Birleşik Devletleri)

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Projede Kullanılan Kefir

Ticari kefir kültürü (*Danisco*<sup>®</sup>, *Poland*): Toz halindeki kefir kültürünün (içeriği; *Lactobasillus lactis subs.*, *Leuconostoc subs.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobasillus subs.*, kefir mayası) steril şartlarda süt ile karıştırılması, sonrası 26 °C'de 16 saat etüvde bekletilerek hazırlandı.

### 3.2.2. Kolit İndüksiyonu

Kolit, sıçanlara 7 gün süre ile normal içme suyu yerine, su içinde çözülmüş DSS (%3 [w/v], Molekül Ağırlığı 40.000) solüsyonu verilmesi ile uyarıldı. DSS solüsyonu her gün yeniden hazırlandı ve tüketilen miktar kaydedildi.

### 3.2.3. İlaç Uygulamaları

Orogastrik plasebo ve kefir uygulamaları 4F beslenme tüpü ile gerçekleştirildi, tüpün solunum yolunda olup olmadığı, dışta kalan ucu suya batırılarak kontrol edildi. Plasebo veya kefir uygulamaları anestezisi kullanılmadan yapıldı.

### 3.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışmaya 24 adet erkek Wistar albino sıçan alınarak 4 gruba randomize edildi ve her grup 6 hayvandan oluştu.

#### Grup I (Normal Kontrol):

- 1-14. günler, günde bir kez orogastrik skimmilk (5 ml) verildi.
- Sürekli normal içme suyu aldılar.

#### Grup II (Kefir-kontrol)

- 1-14. günler, günde bir kez orogastrik kefir (5 ml) verildi.
- Sürekli normal içme suyu aldılar.

### **Grup III (DSS Kolit):**

- 1-14. günler, günde bir kez orogastrik skimmilk (5 ml) verildi.
- 8-14. günler DSS'li içme suyu aldılar.

### **Grup IV (Kefir-DSS kolit)**

- 1-14. günler, günde bir kez orogastrik kefir (5 ml) verildi.
- 8-14. günler DSS'li içme suyu aldılar.

### **3.2.5. Deneyin Sonlandırılması**

Onbeşinci gün sabah, ip ketamin 80 mg/kg + 10 mg/kg xylazine uygulanarak anestezide edilen sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra, steril teknikler kullanılarak midline insizyon yapıldı. Kardiak ventrikülden kan alınarak serumu ayrılarak -80 °C'lik derin dondurucuda depolandı.

Sıçanların kolonları tümüyle (kolo-çekal bileşmeden, anüse kadar) hızlıca çıkarıldıktan sonra mezenter bağlanma hattından longitudinal olarak açılarak buzlu su kabındaki *phosphate buffered saline* (PBS) ile yıkandı. Kolon yağ ve mezenter artıklarından temizlenerek filtre kağıdında hafifçe kurulandı. Tüm kolonun uzunluğu ölçüldü ve ağırlığı tartıldı.

### **3.2.6. İncelemelerde Kullanılacak Kolon Dokusunun Ayrılması**

Distal kolonda anüsün proksimalindeki 10 cm'lik segment proksimal ve distal olarak 2'ye ayrıldı. Distal segment histopatolojik incelemeler için formollü solusyona konuldu. Proksimal segment longitudinal olarak 2'ye ayrıldı, kolonun sağ laterali Western Blot analizi, sol laterali biyokimyasal incelemeler ve sitokin tayini için kullanıldı.

### **3.2.7. Hastalık Aktivite İndeksi'nin (HAI) Belirlenmesi**

Deneyler sırasında sıçanların günlük olarak ağırlıkları tartıldı; günlük tükettikleri yem ve içecek (su / DSS'li su) miktarı kaydedildi; dışkı kıvamı (normal/şekilsiz/diare), dışkıda kan görülüp görülmediği kaydedildi. HAI şu şekilde belirlendi (59).

**Tablo 3.2.** Hastalık aktivite indeksi

Skor	Kilo kaybı (%)	Dışkı kıvamı	Rektal kanama
0	Yok	Normal	Yok
1	1-5		
2	5-10	Şekilsiz dışkı	
3	10-20		
4	>20	Diare	Makroskopik kanama

HAI; kilo kaybı, dışkı kıvamı ve kanama skorlarının toplanmasının 3'e bölünmesi ile bulundu.

### 3.2.8. Histopatolojik Değerlendirme

İncelemeler deney gruplarından habersiz bir patolog tarafından yapıldı. Anüsün proksimalindeki 10 cm'lik segmentin distal bölümü %10'luk formol solüsyonuna konuldu. Bu materyalden tam kat kolon duvarı örnekleri alındı. Doku takibinden sonra parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler hematoksilin eozin (HE) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirme aşağıdaki kriterlere göre yapılarak skorlandı ve 0-30 arası bir skor elde edildi (61).

### Tablo 3.3: Mikroskopik kolit skoru

#### *Mukoza epiteli:*

Ülserasyon: yok (0); hafif yüzeyle (1); orta (2); yaygın tam kat (3)

#### *Kriptler:*

Mitotik aktivite: alt 1/3'de (0); hafif, orta 1/3'te (1); orta, orta1/3'te (2); üst 1/3'te (3)

Nötrofilik infiltrasyon

Mukus kaybı

#### *Lamina propria:*

Plazmasitoid infiltrasyon

Nötrofilik infiltrasyon

Vaskülarite

*Fibrin birikimi:* yok (0); mukozal (1); submukozal (2); transmural (3)

#### *Submukozal:*

Nötrofil infiltrasyonu

Ödem

*Skorlama tablosu: 0, yok; 1, hafif; 2 orta; 3, şiddetli. Maksimum skor: 30*

### **3.2.9. Biyokimyasal Analizler İçin Dokuların Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması**

Kolon dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7.4 olan 0.05M PBS kullanıldı.

Homojenizasyon işlemi başlangıcında kolon dokularının yaş ağırlıkları tartıldı ve ve buz banyosu içinde %0,05 sodyum azid içeren 100 mmol/L fosfat tamponu ile (pH:7,4) homojenize edildi (1:10, wt/vol; Ultra Turrax T25; IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). Homojenizatlar 30 saniye sonifike edilip (Bandelin, Berlin, and Germany) 5000 G 10 dakika santrifüje edildi ve süpernatantları eppendorf tüplerine kondu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi.

### **3.2.10. Dokularda Biyokimyasal Analizler**

Homojenize edilen süpernatantlarda üretici firmanın verdiği bilgilere dayanarak MPO konsantrasyonları enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kiti (İmmundiagnostik AG-K6631-061109, Almanya); IL-10 ve TNF-alfa konsantrasyonları enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri ile belirlendi (ASSAYPRO LLC St. Charles, MO; BIOSOURCE, Invitrogen Immunoassay kit, California, USA). IL-10 ve TNF-alfa düzeyleri pikogram/mg protein, MPO ng/mg protein olarak ifade edildi. Total protein düzeyleri Lowry metodu ile belirlendi (62).

### **3.2.11. iNOS Değerlendirmesi**

#### *Örneklerin hazırlanması*

Kolon dokuları tartıldı ve soğuk bir tampon içerisinde (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 0.01 mg/ml leupeptin, 0.01 mg/ml aprotinin 250 mM NaCl) homojenize edildi (1/4 w/v). Homojenatlar 12.000 g'de 15 dakika süreyle 4 °C de santrifüj edildi ve süpernatantlar hazırlanıp -80 °C'de saklandı. Homogenatın protein konsantrasyonu Lowry ve arkadaşlarının metoduyla saptandı.

### *SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemi*

Her örnek için eşit miktardaki protein (her kuyucuğa 80 µg protein) % 7.5'lik jellerde SDS-PAGE ile ayrıldı, elektroforetik olarak nitrosellüloz membrana aktarıldı ve %3 BSA içeren TTBS içerisinde 30 dk inkübe edildi. Membran %1 BSA içindeki anti-iNOS (1:1000) ile gecelik inkübasyona bırakıldı. TTBS ile 10 dk'lık 3 yıkamadan sonra oda ısısında 1 saat HRP (Horse radish peroksidaz) konjuge anti-rabbit IgG (1:5000) ile inkübe edildi. 3 defa TTBS ile yıkandıktan sonra, ECL plus (elektro kemilüminesans saptama kiti) solusyonuyla ile bantların görüntüleri elde edildi. Bantlar Kodak Image 2000MM Station cihazında taranarak yoğunlukları ölçüldü.

### **3.2.12. MDA Ölçümü**

MDA değerlendirmesi HPLC ile yapıldı (ThermoFinnigan Spectra High Performance Liquid Chromatograph with Diode Array Detector San Jose, California, USA). Tartılan dokular pH 7.16 olan fosfat tamponuna kondu ve alındıktan hemen sonra - 20 °C'ye kaldırıldı. Numuneler çalışılacağı zaman eritildi ve 500 ppm BHT ilavesinden sonra bu tamponda Ultra Turrax T 25 Homogenizer ile 2500 rpm'de +4 °C sıcaklıkta homojenize edildi. Homojenatlar 10.000x g 'da 30 dakika boyunca +4 °C 'de santrifüj edildi. Süpernatantlardan 250 µL Eppendorf tüplere alındıktan sonra üzerine 6 M 50 µL NaOH solüsyonu eklenerek final hacim 300 µL'ye çıkarıldı. Alkali süpernatantlar daha sonra 60 °C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi (proteine bağlı MDA'nın hidrolizi). Numuneler soğutulduktan sonra %35'lik (v/v) perklorik asit ilavesiyle proteinlerin presipitasyonu sağlandı. Karışım 2800 x g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlardan 250 µL eppendorf tüplere aktarıldı ve üzerine 25 µL dinitro fenil hidrazin (DNPH, 5mM) eklenerek vortekslendi, 30 dakika karanlıkta türevlenmeye bırakılan numunelerden 50 µL HPLC sistemine enjekte edildi. Sonuçlar mmol/gr protein olarak sunuldu.

### **3.2.13. İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın analizi SPSS for Windows (15.0 for Windows) paket programı kullanılarak yapıldı. Ölçüm verileri ortalama ± standart hata şeklinde sunuldu. Gruplar arasındaki kantitatif verilerin farklılaşmasının önemi tek yönlü varyans

analizi (ANOVA) ile belirlendi ve varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa parametrelerin ikili karşılaştırması *post hoc* Tukey testi ile yapıldı. Deney grupları arasındaki mikroskopik kolit skorlarının farklılaşmasının önemini değerlendirmek için Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney *u* testi ile araştırıldı. Kolit indüksiyonu öncesi ve sonrası sıçan ağırlıkları paired *t* test ile karşılaştırıldı. Önemlilik düzeyi  $P < 0,05$  kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Sürecinde Sıçanlarda Ağırlık Değişimi

Sıçanların tedavi öncesi ve tedavi sonu ağırlık ölçümleri incelendiğinde, kolit yapılan gruplarda tedavi sonunda, tedavi öncesine göre anlamlı kilo kaybı gözlemlendi. Bu kayıp kolit grubunda, kefir-kolit grubuna göre daha fazlaydı.

**Tablo 4.1:** Gruplara göre tedavi öncesi ve sonu sıçan ağırlıkları

Gruplar	Tedavi öncesi sıçan ağırlık (gr)	Tedavi sonu sıçan ağırlık (gr)	Ağırlık değişimi (gr)
1. Grup (Normal kontrol)	225.17 ± 7.21	223.33 ± 6.82	-1.83 ± 0.95
2. Grup (kefir-kontrol)	222.50 ± 8.04	226.67 ± 5.94	4.17 ± 5.19
3. Grup (DSS kolit)	246.20 ± 8.33	222.00 ± 11.11*	-24.20 ± 3.97
4. Grup (kefir- DSS kolit)	228.33 ± 9.52	218.83 ± 9.83 <sup>¶</sup>	-9.50 ± 3.42

\*Paired Samples t test. Tedavi öncesine göre \*p=0.004; <sup>¶</sup>p=0.039

### 4.2. Sıçanların Kolon Boy, Kilo ve Kilo/Boy Ölçümleri

Sıçanların kolon boy (cm) ve ağırlıklarında (gr) oluşan değişiklikler Tablo 4.2'de gösterildi. Kolon boyu açısından kefir-kontrol grubuyla kolit grubu arasındaki fark anlamlıydı. Kolit yapılan sıçanların kolonunda kısılma görülmekle beraber, kefir bu kısılmayı hafifletmişti.

**Tablo 4.2:** Gruplara göre kolon boy, kilo ve kilo/boy ölçümleri

Gruplar	Kolon Ağırlığı (gr)	Kolon Boyu (cm)	Kilo/Boy Oranı (%)
1. Grup (Normal kontrol)	1.48 ± 0.02	17.38 ± 0.17	0.09 ± 0.002
2. Grup (kefir-kontrol)	1.51 ± 0.02	17.44 ± 0.18	0.09 ± 0.001
3. Grup (DSS kolit)	1.58 ± 0.04	16.70 ± 0.21	0.09 ± 0.002
4. Grup (kefir-DSS kolit)	1.65 ± 0.09	16.83 ± 0.16	0.10 ± 0.001
<i>P(ANOVA)</i>	<i>Ns</i>	<i>P= 0.018</i>	<i>ns</i>
<i>(Post hoc Tukey test)</i>		<i>2-3, p=0.049</i>	

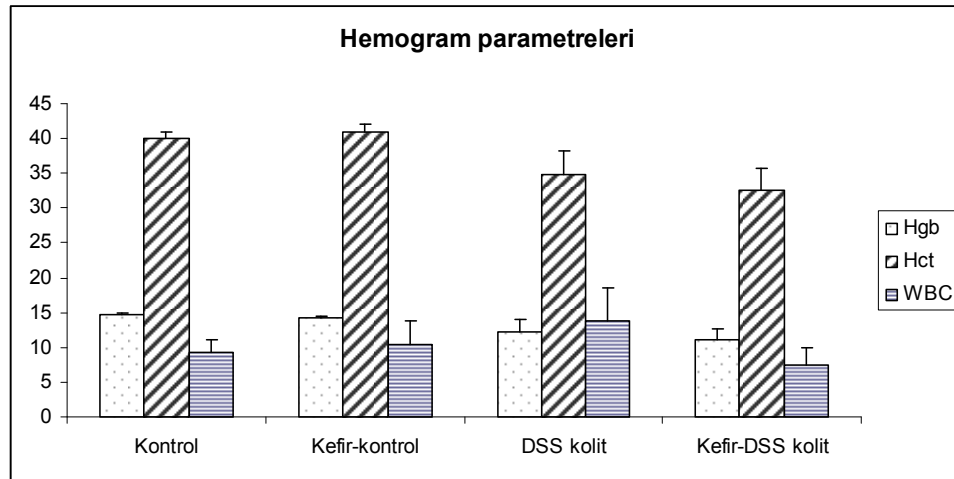
### 4.3. Hemogram Parametrelerinde Değişiklikler

Kolit gruplarında kontrol gruplarına göre hemoglobin, hemotokrit değerleri istatistiksel anlamda olmasa da daha düşük seviyelerdeydi. Lökosit düzeyleri kolit grubunda diğer gruplardan daha yüksekti, kefir-kolit grubundaki lökosit düzeyi, kontrol gruplarındakinin altında bulundu, farklılaşmalar anlamlı değildi.

**Tablo 4.3:** Gruplara göre hemogram parametreleri

Gruplar	Kontrol	Kefir-kontrol	Kolit	Kefir-kolit
Hgb (g/dl)	14.67 ± 0.28	14.30 ± 0.15	12.30 ± 1.65	11.10 ± 1.50
Hct (vol%)	40.60 ± 0.78	41.00 ± 1.15	34.83 ± 3.39	32.48 ± 3.28
WBC(x10 <sup>3</sup> /ul)	9.37 ± 1.63	10.37 ± 3.49	13.90 ± 4.54	7.54 ± 2.45

Gruplar arasında fark, *P(ANOVA)*,  $p > 0.05$



**Şekil 4.1:** Gruplara göre hemogram parametreleri



**Resim 4.1.** Kontrol grubundaki sıçan kolonu



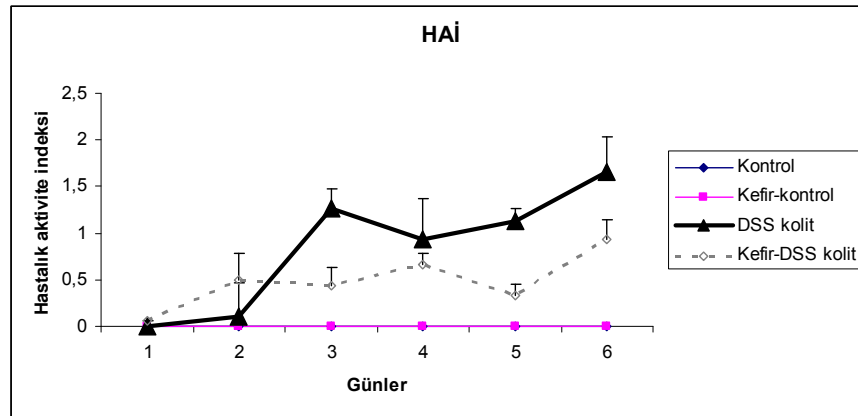
**Resim 4.2.** Kolit indüksiyonu yapılmış sıçan kolonu

#### 4.4. Hastalık Aktivite İndeksinin Değerlendirilmesi

Sıçanların çalışma boyunca HAI günlük olarak hesaplandı. Hastalık aktivite indeksleri kolit indüksiyonu ile birlikte yükseldi. Kolit grubunda HAI, kolit indüksiyonunun 3. ve 5. günlerinde kefir-kolit grubundan istatistiksel olarak yüksekti. Kolit indüksiyonunun 2., 3., 4., 5. ve 6. gününde HAI, kolit grubunda kontrol gruplarına göre istatistik olarak yüksek, bununla birlikte HAI, kefir-kolit grubunda kontrol gruplarına göre sadece 6. günde istatistik anlamda yüksekti. Bu sonuca göre HAI, kefir-kolit grubunda kolit indüksiyonunun yapıldığı günlerin büyük bölümünde (5/6) kontrol gruplarından anlamlı düzeyde farklı değildi. Kefir HAI'ini yatıştırmaktaydı.

**Tablo 4.4:** Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri

Gruplar	1.gün sonu	2.gün sonu	3.gün sonu	4.gün sonu	5.gün sonu	6.gün sonu
1. Grup (Normal kontrol)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2. Grup (kefir-kontrol)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3. Grup (DSS kolit)	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.37	1.26 ± 0.22	0.93 ± 0.44	1.13 ± 0.13	1.66 ± 0.37
4. Grup (kefir-DSS kolit)	0.06 ± 0.06	0.50 ± 0.28	0.44 ± 0.19	0.66 ± 0.12	0.33 ± 0.12	0.94 ± 0.20
<i>P(ANOVA)</i>	<i>P&gt;0.005</i>	<i>P&lt;0.005</i>	<i>P&lt;0.005</i>	<i>P&lt;0.005</i>	<i>P&lt;0.005</i>	<i>P&lt;0.005</i>
<i>(Post hoc Tukey test)</i>	<i>p&gt;0.005</i>	<i>1-3, p=0.022</i> <i>2-3, p=0.022</i>	<i>1-3, p=0.000</i> <i>2-3, p=0.000</i> <i>3-4, p=0.003</i>	<i>1-3, p=0.022</i> <i>2-3, p=0.022</i>	<i>1-3, p=0.000</i> <i>2-3, p=0.000</i> <i>3-4, p=0.000</i>	<i>1-3, p=0.00</i> <i>1-4, p=0.009</i> <i>2-3, p=0.00</i> <i>2-4, p=0.009</i>



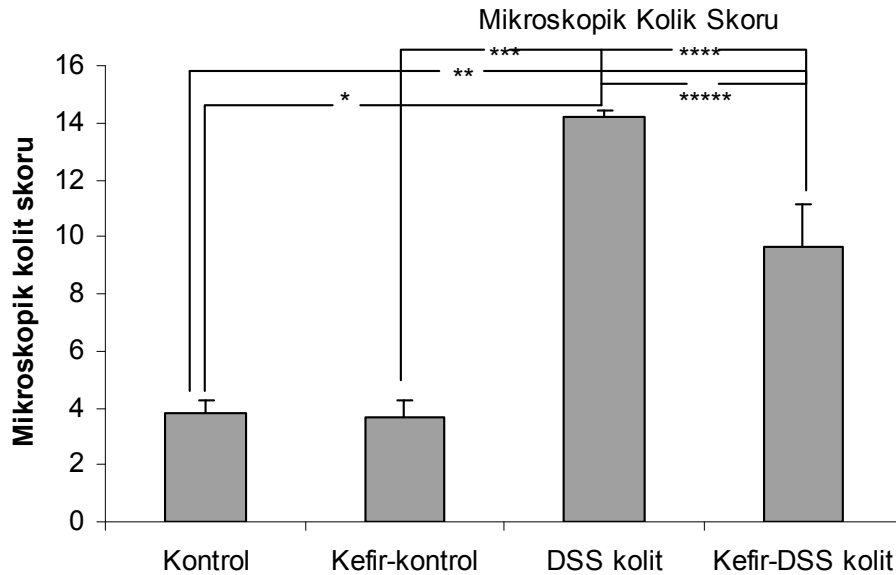
**Şekil 4.2:** Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri

#### 4.5. Mikroskopik Kolit Skorlaması

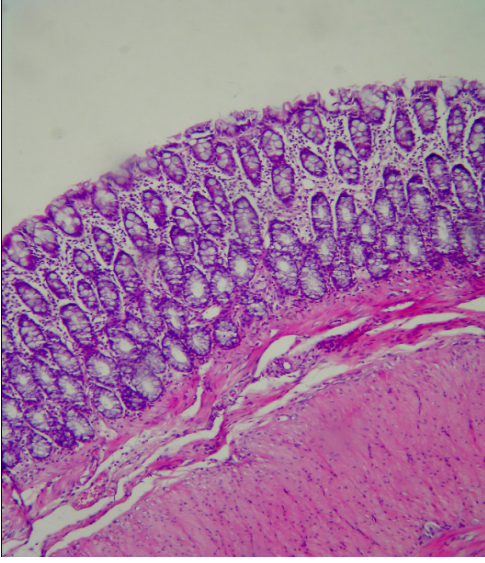
Kolit grubunda mikroskopik kolit skoru kefir-kolit grubundan istatistiksel olarak yüksekti. Kefir DSS'nin uyardığı mikroskopik kolit skorlarını anlamlı olarak azalttı ( $p < 0.049$ ).

**Tablo 4.5:** Gruplara göre mikroskopik kolit skoru

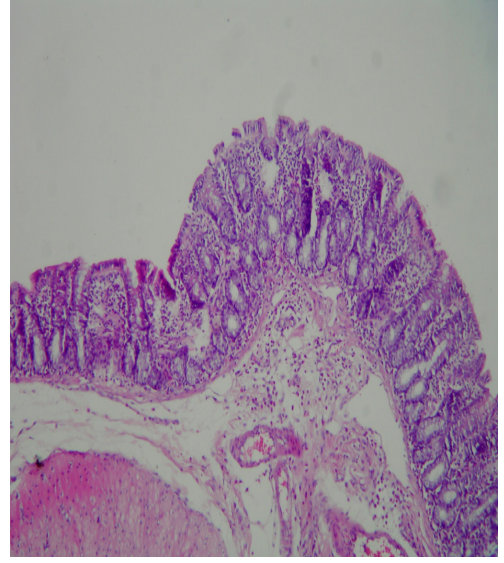
Gruplar	Mikroskopik kolit skoru
1. Grup (normal kontrol)	3.83 ± 0.40
2. Grup (kefir-kontrol)	3.67 ± 0.56
3. Grup (DSS kolit)	14.20 ± 0.20
4. Grup (kefir-DSS kolit)	9.67 ± 1.50
<i>Kruskal- Wallis</i>	p=0.001
<i>Mann-Whitney u</i>	1-3, p=0.005 2-3, p=0.005 1-4, 2-4, p=0.006 3-4, p=0.049



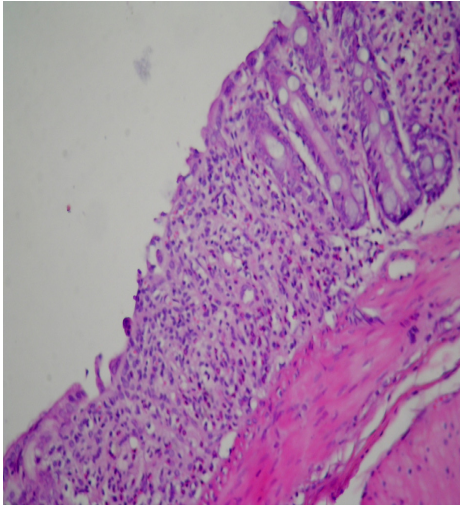
**Şekil 4.3:** Gruplara göre mikroskopik kolit skoru



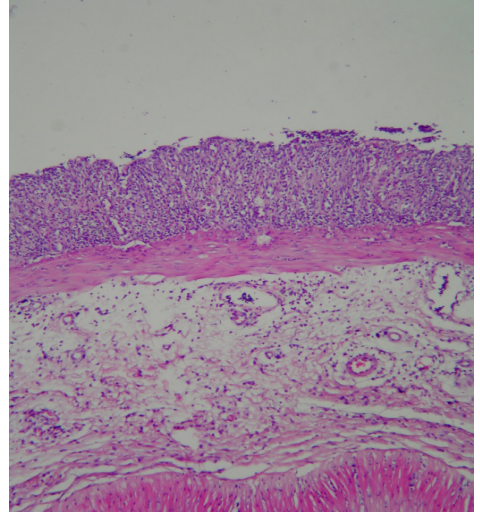
Resim 4.3. Normal sıçan kolon dokusu (H&E, X100) (kontrol grubu)



Resim 4.4. L.propriada hafif derecede akut inflamasyon (H&E, X100) (kefir-kontrol grubu)



Resim 4.5. Yüzey epiteli ve kript kaybı ile yaygın ülserasyon (H&E, X100) (kolit grubu)



Resim 4.6. Yüzey epiteli ve kript kaybı ile ülserasyon, submukozal hafif inflamasyon ve orta derecede ödem (H&E, X100) (kefir-kolit grubu)

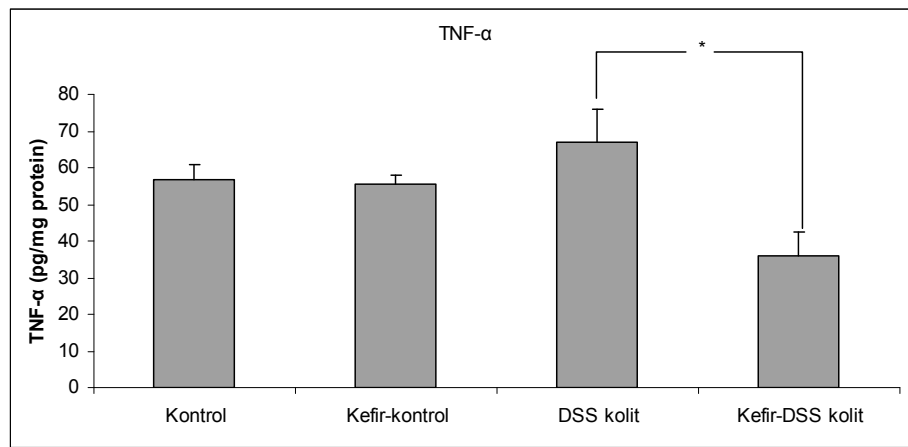
## 4.6. Biyokimyasal Analizler

### 4.6.1. Kolon Dokusunda TNF-alfa Düzeyi

Proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa düzeyleri kolit grubunda yüksekti. Kefir-kolit grubunda kolit grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0.009$ ).

**Tablo 4.6:** Gruplara göre kolon TNF-alfa aktivitesi

Gruplar	TNF- $\alpha$ (pg/mg protein)
1. Grup (kontrol)	56.72 $\pm$ 4.08
2. Grup (kefir-kontrol)	55.63 $\pm$ 2.48
3. Grup (DSS kolit)	66.87 $\pm$ 8.92
4. Grup (kefir-DSS kolit)	36.11 $\pm$ 6.43
<i>P(ANOVA)</i>	$p=0.013$
<i>P (Post hoc Tukey test)</i>	<i>Grup 3-4, p=0.009</i>



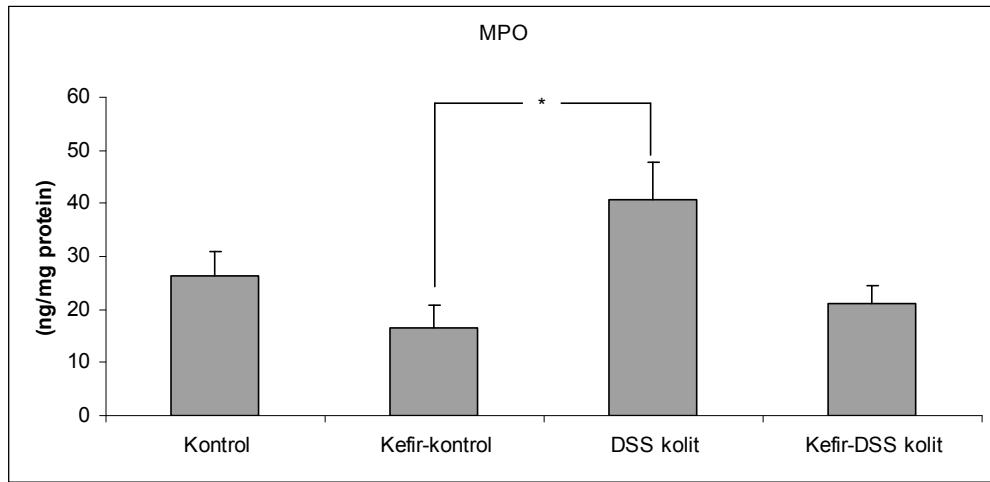
**Şekil 4.4:** Gruplara göre kolon TNF-alfa aktivitesi

### 4.6.2. Kolon Dokusunda MPO Düzeyi

Kolon dokusunda MPO düzeyi kolit grubunda kefir- kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.036$ ). Kefir-kolit grubunda MPO düzeyleri kontrol grubu seviyelerindeydi.

**Tablo 4.7:** Gruplara göre kolon MPO aktivitesi

Gruplar	MPO (ng/mg protein)
1. Grup (kontrol)	26.21 ± 4.86
2. Grup (kefir-kontrol)	16.50 ± 4.42
3. Grup (DSS kolit)	40.86 ± 6.93
4. Grup (kefir-DSS kolit)	21.06 ± 3.41
<i>P(ANOVA)</i>	<i>p=0.036</i>
<i>P (Post hoc Tukey test)</i>	<i>Grup 2-3, p=0.039</i>

**Şekil 4.5:** Gruplara göre kolon MPO aktivitesi

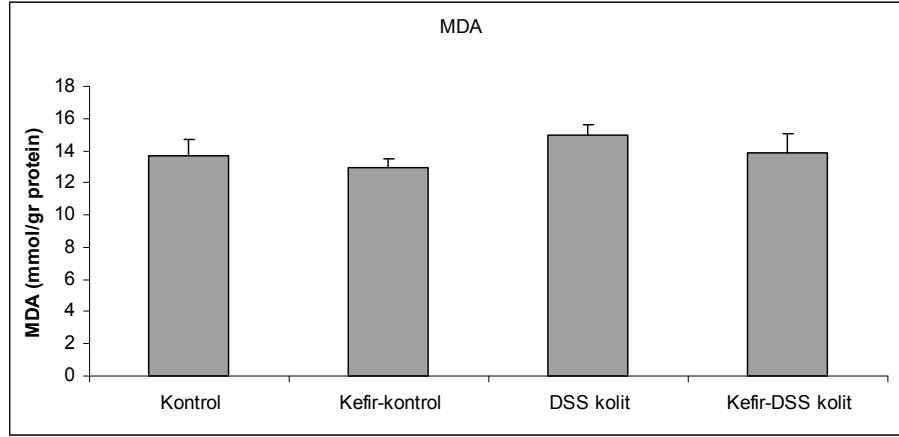
#### 4.6.3. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi

Kolon dokusunda MDA seviyesi kolit grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olmakla beraber farklılaşmalar istatistik önemde değildi.

**Tablo 4.8:** Gruplara göre kolon MDA aktivitesi

Gruplar	MDA (mmol/gr protein)
1. Grup (kontrol)	13.69 ± 0.96
2. Grup (kefir-kontrol)	12.98 ± 0.48
3. Grup (DSS kolit)	14.96 ± 0.68
4. Grup (kefir-DSS kolit)	13.87 ± 1.23
<i>P(ANOVA)</i>	<i>Ns</i>
<i>P (Post hoc Tukey test)</i>	<i>Ns</i>





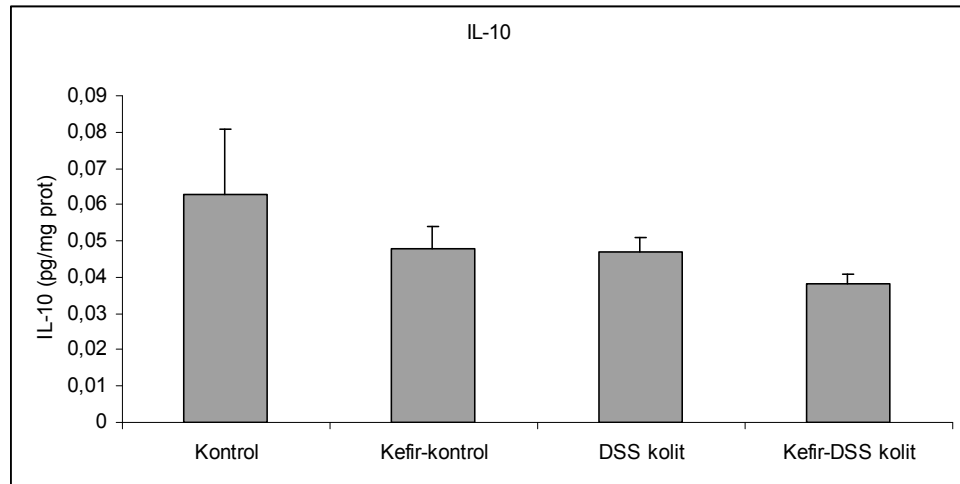
Şekil 4.6: Gruplara göre kolon MDA aktivitesi

#### 4.6.4. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyi

IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistik önemde fark yoktu.

Tablo 4.9: Gruplara göre kolon IL-10 aktivitesi

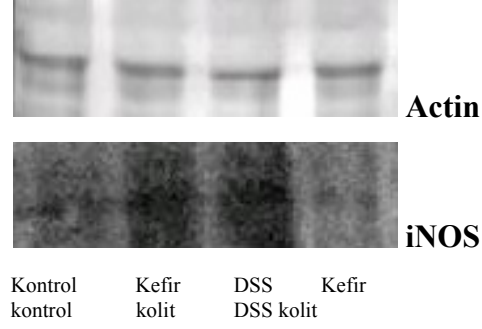
Gruplar	IL-10 (pg/mg protein)
1. Grup (kontrol)	0.063 ± 0.018
2. Grup (kefir-kontrol)	0.048 ± 0.006
3. Grup (DSS kolit)	0.047 ± 0.004
4. Grup (kefir-DSS kolit)	0.038 ± 0.003
<i>P(ANOVA)</i>	<i>Ns</i>
<i>P (Post hoc Tukey test)</i>	<i>Ns</i>



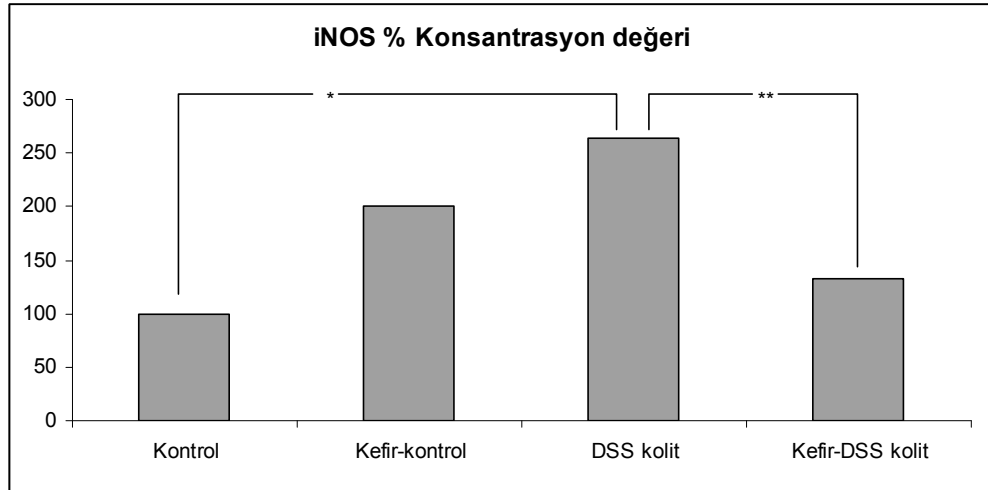
Şekil 4.7: Gruplara göre kolon IL-10 aktivitesi

#### 4.6.5. Kolon Dokusundaki iNOS Düzeyleri

Kolon dokusunda iNOS ekspresyonu kolit grubunda, hem kontrol grubundan hem de kefir-kolit grubundan anlamlı olarak yüksekti.



**Resim 4.7:** Western blot yöntemi ile gruplara göre iNOS ekspresyonu



**Şekil 4.8:** Gruplara göre iNOS konsantrasyonları

## 5. TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalığı, genetik olarak hassas kişilerde mukozal immün sistemin, çoğunluğunu kommensal bakterilerin oluşturduğu lüminal antijenlere karşı anormal bir cevap oluşturması sonucu kendini gösteren kronik bir hastalıktır (63). İBH'da bozulmuş bakteriyel ekosistem ve mukozal immün sistem arasındaki ilişki klinik ve deneysel olarak birçok araştırmada gösterilmiştir (63-67).

E. Merchnikoff 100 yıl önce intestinal flora bakterilerinin protein hidrolizi sonucu oluşturduğu amonyak, aminler ve indol gibi maddelerin konakta otointoksikasyona neden olduğunu, bunun için yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde bulunan enerjisini protein hidrolizi yerine karbonhidrat fermantasyonundan sağlayan laktik asit bakterilerinin kullanımının faydalı sonuçlar verdiğini bildirdi. Ancak, bilimsel olarak bu organizmaların tanımlanması zaman almıştır. Lilly ve Stillwell 1965'de ve Parker'in de 1974 yılında kullandıkları probiyotik kavramını, 1989 yılında Fuller canlı mikrobiyal besin olarak, konağın mikrobiyal florasını düzenleyen, konak için faydalı mikroorganizmalar olarak tekrar tanımlamıştır (68).

Probiyotikler, tüketildiklerinde faydalı ve değerli bir besin olmasının ötesinde çeşitli mekanizmalarla terapötik etkileri olan yaşayan mikroorganizmalardır. Tercihen, probiyotikler sağlıklı insan orjinli, nonpatojenik, gastrik asit ve intestinal enzimler tarafından sindirime dirençli, intestinal epitele bağlanabilen ve immün cevabı modüle edebilen organizmalardan seçilmelidirler. İnsan İBH'da olduğu kadar deneysel kolit modellerinde de faydalı etkileri gösterilmiştir (63).

İBH patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat hastalığın patogenezinde genetik olarak tayin edilen konak duyarlılığı, barsak mukozasının immun yanıtı ve barsak bakterilerinin karşılıklı etkileşiminin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda hastalığın oluşmasında ve ilerlemesinde enterik floranın önemli katkısının olduğu, genetik olarak yatkın bireylerde gastrointestinal mikrobiyotiklerin hastalık patogenezinde önemli rolü olduğu ortaya çıkmıştır (69-71). Bu görüşten yola çıkarak barsak florası, probiyotik tedavi ile düzenlenerek, İBH'da bozulmuş floranın olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılacağı düşüncesi oluşmuştur.

Sekiz probiyotik bakteri suşunu içeren VSL#3 karışımının, hafif ve orta aktiviteye sahip ÜK'li hastalarda balsalazine ile kombinasyonun etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, kombinasyon tedavisinin, tek başına balsalazin ve mesalamin verilen grublara göre anlamlı olarak remisyona girme süresini kısalttığı, yüksek oranda remiyon indüksiyonuna, endoskopik ve histolojik skor düzeylerinde iyileşmeye sebep olduğu gösterilmiştir (71, 72). Yine konvansiyonel tedavilere yanıtızsız 34 ÜK'li hastada tedaviye VSL#3 karışımı 6 hafta süreyle eklenmiş ve %77 remiyon/cevap oranı elde edilmiştir (73). Zocco ve arkadaşları, remiyondaki ÜK hastalarında *Lactobacillus* GG'nin etkinliğini değerlendirdiği çalışmada, 187 hastayı *Lactobasillus* GG, meselazınle kombine ve mesalazin olarak 3 tedavi grubuna ayırmış ve hastaları tedavinin 6 ve 12. aylarında değerlendirilmişlerdir. Relaps oranları, *Lactobasillus* GG verilen grupta %8-15, kombinasyon grubunda %13-20 ve meselazın grubunda %6-16 olmak üzere tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Sonuç olarak çalışmada *Lactobasillus* GG'nin ÜK'de remiyonun sürdürülmesinde mesalazine benzer etkinliğinin olduğu gösterilmiştir (74, 75). Probiyotik suşu *E.coli Nissle* 1917'in ÜK'de remiyonun sürdürülmesinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 120 ÜK'li hastaya tedavi olarak 1500 mg/gün mesalazin veya *E.coli Nissle* 1917 suşu (100 mg= $25 \times 10^9$ ) verilmiş, 3 ay sonunda kolonoskopik aktivite indeksi  $4 \leq$  üzerinde artan hastalar relaps olarak değerlendirilmiş, çalışma sonunda relaps oranı *E.coli Nissle* 1917 grubunda %16, mesalazin grubunda %11.3 olarak bulunmuş ve gruplar arasında relaps oranı açısından istatistiksel fark görülmemiştir (75, 76). IL-10 knock-out farelerin doğal ortamda spontan olarak kolit geliştirdikleri bilinmektedir. Bu şekilde kolit yapılan farelerde probiyotik bakteri *Lactobacillus salivarius* suşunun kolonda inflamatuvar skorları anlamlı olarak azalttığı ve splenositlerde proinflamatuvar sitokin yapımını yine anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir (77). ÜK'de total abdominal kolektomi ve ileal poşta-poşit anastomoz uygulanan hastalarda %15-53 oranında ileal poşta-poşit görülebilmektedir ve hastalarda önemli bir sorun oluşturmaktadır (78). Çeşitli probiyotik suşlarıyla yapılan çalışmalarda aktif poşit tedavisinde etkinliği sınırlı olmasına rağmen, poşit tedavisi sonrasında remiyonunun sürdürülmesinde probiyotikler etkili bulunmuştur (75, 79, 80).

Probiyotik bakterilerin inflamatuvar barsak hastalıklarında faydalı etkileri, kalın barsaktaki patojen bakterilerin çoğalmasını inhibe etmeleri, kalın ve ince barsaktaki immün hücreler ve epitel ile etkileşime girerek çeşitli mekanizmalarla bariyer fonksiyonu oluşturmaları, ayrıca konak immün cevabını olumlu yönde etkilemeleri sonucudur (2). Mukozadaki farklı bakteri suşları, immün reseptörler ile farklı hücre içi sinyaller oluşturarak immün cevabın modülasyonunda rol oynarlar.

Geniş spektrumlu antibiyotikler barsak florasını etkileyerek ÜK ve CH'nin seyrini olumlu yönde etkilemektedir. Antibakteriyel tedavinin etkinliğinde, hastalıktan sorumlu kilit patojenin elimine edilmesi, bakterilerin sekretuar ürünlerinin azaltılması veya sekonder bakteri invazyonunun azaltılmasının rol oynayabileceği öne sürülmektedir (81).

Çeşitli deneysel hayvan modelleri ile intestinal inflamasyon oluşturularak İBH'nın patogenezi anlaşılmaya çalışılmış ve yeni tedavi ajanlarının etkisi araştırılmıştır (82). DSS uygulanmasıyla oluşturulan kolit özellikle klinik ve histolojik olarak ÜK'e benzer ve insan İBH'nın hayvan modeli olarak kullanılmaktadır. DSS barsaklarda epitel hücre bariyer fonksiyonlarını bozar (83). Bu durumda doğal immünitinin aktivasyonuna neden olan lüminal bakteriyel antijenler lamina propriaya daha kolay ulaşır ve inflamasyonun oluşmasına neden olabilir (58). DSS kemiricilerde içme suyuna karıştırıldığında kilo kaybı, kanlı diyare ve histopatolojik olarak kripterlerde erozyon gibi inflamatuvar değişikliklere neden olur (59). Bozulmuş antioksidan mekanizma DSS ile uyarılan kolitin patogenetik mekanizmalarından birisidir (84). Hem inflamasyon hem de oksidasyon süreci karşılıklı olarak doku hasarını etkiler.

Literatürde DSS'nin %1.5-5 gibi çeşitli dozlarıyla oluşturulmuş kolit modelleri olmakla birlikte %5 DSS dozunda daha şiddetli kolit oluşmaktadır (82, 85-87). Çalışmamızda UK modeline yakın bir model oluşturan, DSS kolit modelini tercih ettik. Bunun için 1 hafta süreyle %3 DSS'i içme suyu ile birlikte vererek akut kolit modeli oluşturduk. Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızda hafif-orta şiddette bir kolit oluştuğu görüldü.

İBH'da hastalık şiddetine göre hemogram parametrelerinde bozukluklar görülür. Şiddetli hastalıkta Hgb ve Hct düşmesi, WBC'de yükselme olabilmektedir.

Deneysel modellerde de hastalığın şiddeti ile hemogram parametrelerinde değişiklikler görülmüştür. *Lactobacillus casei*'nin Shirota suşunun farelerde DSS ile uyarılan kolitte probiyotik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Hgb, Hct ve WBC değerlerinin kolit grubunda probiyotik ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Bu çalışmada %5 DSS kullanılmış ve şiddetli bir kolit oluşmuştur (88). Çalışmamızda hemogram parametrelerinde gruplar arasında istatistik olarak anlamlı değişiklik olmadı. Bu durum DSS'nin %3'lük kullanılması sonucu hafif-orta şiddette kolitle ilişkilidir.

Probiyotiklerin birçok deneysel kolit modelinde klinik ve histolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Farelerde DSS ile uyarılan kolit modelinde 4 farklı probiyotik suşunun etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada probiyotikler, HAI ve histolojik skorunu anlamlı olarak düşürmüştür (85). Yine bizim deneysel modelimize benzeyen bir modelde, sıçanlarda 14 gün *Lactobacillus fermentum* BR11 veya su ile beslenip, 7.günden 14. güne kadar %2'lik DSS ile kolit uyarılmıştır. Çalışmada probiyotik grubunda kilo kaybının hafiflediği, kolit indüksiyonunun son 4 günü HAI'nin azaldığı, kolon uzunluğundaki kısılmanın kolit grubuna göre daha az olduğu ve kolon ağırlığındaki inflamasyondan kaynaklanan artmanın hafiflediği, histolojik skorda da olumlu etkilerin olduğu gösterilmiştir (89). Çalışmamızda, kefir tedavisinin DSS kolitinde HAI'ni düşürdüğü, bu düşüşün kolit indüksiyonunun 3 ve 5. günlerinde istatistik önemde olduğu gözlemlendi. Normal kontrol ve kefir kontrol gruplarında, bekleneneği gibi hastalık aktivitesi saptanmadı. DSS ile kolit indüksiyonunun 2. gününden itibaren, HAI kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek seyretti. Oysa kefir tedavisi yapılarak DSS koliti uyarılan sıçanların HAI'lerinde sadece indüksiyonun 6. gününde kontrol gruplarına göre istatistik önemde bir yükselme saptadık. Bu sonuç kefirin HAI'ni yatıştırdığını göstermektedir. Bulgularımıza göre mikroskopik skor kefir ile anlamlı olarak düzeldi. Kefir-kolit grubunda mikroskopik skorda düzelme olmasına rağmen kolon ağırlıkları en fazla bu grupta artmıştı. Histopatolojik inceleme kefir-kolit grubunda *L.propiria*'da ödem daha belirgindi, bu durum ağırlık artışının nedenini açıklayabilir. Bu nedenle klinik uygulamalarda probiyotikler inflamatuvar sürece aynı zamanda olumsuz katkı sağlayabilirler, ileri araştırmalarla bu konuya açıklık getirilmelidir.

Sıçanlarda DSS ile kolit indüksiyonunun, diğer çalışmalarda da gösterildiği gibi kilo kaybına sebep olduğunu gözledik. Sağlıklı sıçanlarda kefirin kilo artışı desteklediği ve DSS kolitindeki kilo kaybını azalttığı dikkati çekti. Son yıllarda probiotiklerin antilipolitik etkileri konusu dikkat çekmeye başlamıştır. Yağ dokusundan sekrete edilen sitokinler, leptin ve adiponektin, enerji homeostazisinin regülasyonunda etkilidir (90, 91). Serum leptin seviyeleri vücutta yağ dokunun ağırlığı ve boyutlarıyla pozitif, adiponektin seviyeleriyle negatif ilişkilidir. Sato ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ratları 2 gruba ayırmışlar, birinci gruba 4 hafta süt tozu, diğer gruba yine 4 hafta *Lactobacillus gasseri* SBT2055 vermişlerdir. Çalışma sonunda yağ dokusu ağırlığı, yağ dokusu dağılım profili, serum leptin ve adiponektin düzeyleri gibi bazı parametrelere bakmışlardır. Çalışmada *Lactobacillus gasseri* SBT2055 ile beslenen grupta kontrol grubuna göre vücut yağ dokusu boyutları ve dağılımının arttığı, fakat kilo alma açısından önemli bir fark yaratmadığı, probiyotik verilen grupta leptin seviyelerinin düştüğü, adiponektin düzeylerinde önemli bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir (92). Sousa ve arkadaşlarında, *Lactobacillus acidophilus*'un süpernatantlarını ratlara 5 gün serebral ventrikül içine direkt olarak vermişler, kontrol grubuna göre beyin ve retroperitoneal yağ dokusunda leptin ekspresyonunda artma, kiloda hafif azalma görmüşlerdir (93). Çeşitli çalışmalarda tek bir probiyotik suşunun leptin seviyesinde düşmeye ve kilo kaybına neden olduğunun gösterilmesine karşın karışım probiyotikler ve kefirin bu konudaki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda kefir kolitte oluşan kilo kaybını hafifletmiştir.

Oksidanlarla ilişkili hasar İBH'nın patofizyolojisinde önemlidir (94). İBH'da inflamasyonlu barsak mukozası aktive olmuş nötrofiller ve makrofajlarca zengindir. Bu hücrelerce fazla miktarda reaktif oksijen ürünleri oluşturulur ve bununla ilişkili olarak mukoza üzerinde oksidatif stres artar (95). Fazla miktarda oluşan toksik reaktif oksijen ürünleri, barsağın belli kapasitedeki antioksidan defans sistemlerinin üzerine çıkar ve böylece intestinal oksidatif hasar İBH'lı hastaların mukozal hasarının artmasına sebep olur (96). Kefirin karbon tetraklorür (CCL<sub>4</sub>) ile oksidatif hasar oluşturulması sonrası antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, kefirin CCL<sub>4</sub> ile oksidatif hasar görmüş karaciğer ve böbrek dokusunda, CCL<sub>4</sub>'ün düşürdüğü redükte glutasyon ve glutasyon peroksidaz düzeylerini istatistik önemde

yükselttiği, lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeylerinde CCL<sub>4</sub>'ün sebep olduğu yükselmeyi anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (97).

MDA lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesidir, dolayısıyla oksidan stresi değerlendirmek için kullanılır. Çalışmamızda kullandığımız %3 DSS kolit modelinde ratlarda kolon dokusu MDA düzeyi yükselmekle birlikte, MDA konsantrasyonundaki artış kontrol grubundan anlamlı olarak farklı değildi. MDA konsantrasyonu tam kat kolon dokusunda ölçüldü. Oysa bu modeldeki inflamasyon mukozayı ilgilendirmektedir ve tam kat kolon dokusunda ölçülen MDA rölatif olarak düşük bulunabilir.

Genel olarak probiyotiklerin antioksidan etkileri bilinmektedir. %5 DSS ile kolit uyarılan bir çalışmada *Bifidobacterium infantis* DSM 15139 suşunun kolon dokusunda MDA ve MPO düzeylerini kolit grubuna göre anlamlı olarak düşürmüştür (98). Bu çalışmada *Bifidobacterium infantis* suşu kolit uyarılmasından 7 gün önce başlanmış ve 7 gün süren kolit uyarılmasıyla birlikte devam etmiştir. Bu model çalışmamızla paraleldir. Çalışmamızda kolit grubuna göre kefir-kolit grubunda anlamlı olmasa da MDA düzeyleri daha düşüktü. Bu kefirin antioksidan etkisinin olduğunu fakat yeterli olmadığını göstermekle beraber kefir dozunun artmasıyla nasıl bir etkisi olacağını başka çalışmalarla değerlendirmeliyiz.

Nötrofillerin granüllerinde bulunan MPO, klor iyonu varlığında hidrojen peroksiti hipoklorik aside dönüştürür. Hipoklorik asit, güçlü bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır. MPO'nun inflamatuvar durumlarda düzeyleri artar ve bu durum doku hasarına katkıda bulunur. İnflamasyon varlığında barsak mukozasına olan lökosit infiltrasyonunun ve aktive olmuş lökositlerden serbest oksijen radikallerinin salınımı mukozal hasarı ve proinflamatuvar sitokin salınımını uyarır, bu durumda doku hasarının ilerlemesi gerçekleşir (99). Bazı araştırmacılar, serbest oksijen radikallerinin artışının NF-κB'yi uyardığı, NF-κB uyarılmasının da TNF-alfa üretimini artırarak, inflamasyon sürecine katkıda bulunduğunu belirtmektedir (100).

Çalışmamızda kolit grubunda MPO düzeyleri kontrol ve kefir-kontrol grubundaki değerlerden yaklaşık 2 kat yüksekti, ve kefir-kontrol grubundan istatistik anlamda farklıydı. Kefir-kolit grubunda MPO düzeyleri kontrol grubu seviyelerindeydi. Bu bulgular inflamasyon varlığında kefirin yükselmiş MPO



seviyelerini düşürerek doku hasarına karşı koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Sitokinler, immün sistemin modülasyonunda önemli rol oynarlar. İBH'da intestinal inflamasyon ve bunun sonucunda oluşan lezyonlarda mukozal immün sistemin ve oluşan inflamasyonun modülasyonunda sitokinler önemlidir. İBH'da kronik inflamasyonun mekanizmasında pro- ve anti-inflamatuar sitokin dengenin bozulduğu bildirilmiştir (101). İBH'da kolon biyopsilerinde IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-gamma ve TNF gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerinin arttığı, IL-4 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir (83, 101). Yine bir çalışmada DSS ile oluşturulan kronik kolit modelinde, kolitin kronikleşmesinde proinflamatuvar sitokinler TNF ve IFN-gama'nın rol aldığı gösterilmiştir (101). Proinflamatuvar yanıtın baskılanması ve sitokin paterninin düzeltilmesi sonucunda İBH'da düzelmeye sağlanabileceği düşüncesiyle, hastalıkta TNF-alfa antikoru gündeme girilmiş ve tedavide başarılı olmuştur. NF-κB'nin barsaklardaki inflamatuvar ve immün cevapta birçok genin ekspresyonunu düzenleyerek anahtar bir rol oynadığını, oksidatif stres, sitokinler (IL-1, IL-6, TNF-alfa), bakteriler ve virusların NF-κB aktivasyonunu uyararak inflamatuvar süreci arttırabilecekleri bilinmektedir. ÜK'li hastalarda relapsın engellenmesinde probiyotiklerin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada kolonda, üç bifidobakter suşu içeren probiyotik preperatının NF-κB aktivasyonunu baskılayarak TNF-alfa ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhiye ettiği gösterilmiştir (102).

IL-10, T-hücreleri, B hücreleri veya lipopolisakkaritlerle aktive olmuş monositler tarafından sentezlenirler (103). İnflamasyonda aktive olmuş makrofajlar tarafından sentezlenen sitokinleri (lipopolisakkaritle ekspresyonu uyarılan IL-1beta, IL-6 ve TNF-alfa) inhibe eder. IL-10 sadece T-hücre aktivasyonunun regülasyonunda değil, aynı zamanda akut inflamatuvar cevabın down-regüle edilmesinde de rol oynar (104, 105). Son yıllarda İBH'da IL-10'nun antiinflamatuvar etkileri konusunda araştırmalar yapılmaktadır. IL-10'nun gastrointestinal sistemde immün regülasyondaki rolü, kronik enterokolit geliştirilen IL-10 defektli farelere, IL-10 verilerek enterokolitin yatıştırılmasıyla gösterilmiştir (106). %4 DSS ile oluşturulan kronik kolit modelinde, kolon dokusunda sitokin parametreleri değerlendirilmeye çalışılmış ve kolit yapılan grupta serum TNF-alfa seviyelerinin

önemli oranda yükseldiği, kontrol grubuna göre serum IL-10 düzeylerinde anlamlı değişikliğin görülmediği bildirilmiştir (94). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla uyumludur. Çalışmamızda IL-10 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişiklik görülmemiştir.

TNF-alfa akut ve kronik inflamasyonunun oluşumunda rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir. Akut faz yanıtının önemli uyarıcılarından birisidir, aktif makrofajlardan salgılanır. IL-10 defektli farelerde *Helicobacter hepaticus* ile oluşturulan kolitte, *Lactobacillus reuteri* ve *L. Casei*'nin iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Bu suşların etkilerinin proinflamatuvar sitokinler TNF-alfa ve IL-12'nin düzeylerinde düşmeye yol açarak olduğu belirtilmiştir (107). Farelerde %4 DSS ile uyarılan kolit modelinde, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarını içeren probiyotik karışımının etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, kolon mukozasındaki TNF-alfa düzeylerinin kolit grubunda, kontrol ve probiyotik kolit gruplarından anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür (108). Bizim bulgularımız da kolit uyarılan sıçanlarda doku TNF-alfa düzeyinin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yükseldiğini desteklemektedir. Ayrıca bulgularımıza göre kefir tedavisi DSS kolitinde ortaya çıkan doku TNF-alfa konsantrasyonu yükselmesini azaltmaktadır; kefirin DSS kolitindeki olumlu etkinliğinin önemli mekanizmalarından biri proinflamatuvar sitokin yapımını baskılaması gibi görünmektedir.

Nitrik oksid (NO) trombosit ve lökosit aktivasyonu, damarsal reaktivitenin düzenlenmesi, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve nonspesifik immün reaksiyonlar gibi geniş bir fizyolojik fonksiyon spektrumu gösteren, kısa etkili biyolojik bir mediatördür (29). Deneysel ve klinik çalışmalarda İBH'da iNOS üretiminin artmış olduğu gösterilmiştir, iNOS aktivasyonu NO sentezini arttırmaktadır (109, 100). IL-1, IFN-gama ve TNF-alfa gibi inflamatuvar sitokinler, intestinal epitelde, makrofajlarda ve diğer hücrelerde önemli oranda NO oluşumuna neden olurlar (101). İBH'nın farklı hayvan modellerinde ve ÜK'li hastalarda kolonik lavaj sıvısında NO seviyelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (101, 111, 112). Çeşitli çalışmalarla, kolon mukozasında aşırı NO yapımının, oksidatif stresi ve doku haraplanmasını artırarak kolon mukoza bütünlüğünü bozabileceği gösterilmiştir (33, 34, 113). Bu bilgiyle uyumlu olarak iNOS'un inhibisyonu, intestinal inflamasyon oluşturulmuş bazı hayvan modellerinde olumlu etkiler göstermiştir (114, 115). Farelerde % 5 DSS

ile uyarılarak kronik kolit geliştirilen bir çalışmada, TNF-alfa ve IFN-gama'nın anti-sitokin antikolar ile inhibisyonu sonrası NO konsantrasyonunun *down-regüle* olduğu ve kolitte yatışma sağlandığı gösterilmiştir (101). Çalışmamızda inflamasyonun yoğun olduğu kolit grubunda iNOS düzeyleri diğer gruplardan yüksekti. Kefirin kolit varlığında iNOS düzeylerini düşürdüğü tespit edildi, Bununla birlikte kefir-kontrol grubunda iNOS düzeyleri yüksekti. Literatürde bazı probiyotik suşlarının NO ve iNOS düzeylerini arttırabileceği ile ilgili makaleler vardır. *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin j774 makrofajlarda ve insan T84 intestinal epitel hücrelerinde NF-κB'nin aktivasyonu yoluyla iNOS indüksiyonuna ve düşük seviyelerde NO üretimine neden olmuştur. Araştırmacılar *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin gastroentestinal sistemdeki koruyucu etkisinden düşük seviyelerdeki NO yükselmesinin etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (116). Bizim bulgularımızda da normal kolonda probiyotikler iNOS düzeylerini arttırmıştır ve bu hafif artmış seviyeler gastrointestinal sistemi koruyucu etki gösterebilir. İnflamasyon varlığında ise daha da artacak olan iNOS düzeylerini düşürerek koruyucu etkisini devam ettirmiş olabilir.

## 6. SONUÇ

%3 DSS ile uyarılan deneysel kolit modelinde kefir, hastalık aktivite indeksi ve mikroskopik kolit skorunu azaltarak hastalığın şiddetini hafifletmekte, TNF-alfa ve MPO seviyelerini düşürerek inflamatuvar sürece olumlu katkı sağlamakta ve kolite bağlı oluşan kilo kaybını yavaşlatmaktadır. DSS ile uyarılan kolit modelinde literatürde ilk kez kefir kullanılması ve elde edilen veriler çalışmanın önemini göstermektedir.

## ÖZET

### **Kefirin Sıçanlarda Dekstran Sülfat Sodyum ile Uyarılan Kolit Modelinde Koruyucu Etkinliği**

Amacımız, ticari kefirin DSS ile uyarılan kolit modelinde koruyucu etkinliğinin olup olmadığını, varsa etkisini hangi yolla yaptığını araştırmaktır.

Çalışmamızda 24 adet erkek Wistar albino sıçan alınarak 4 gruba randomize edildi; Kontrol, kefir-kontrol, kolit ve kefir-kolit. Kontrol ve kolit grubuna 14 gün boyunca günde bir kez skimmilk, kefir-kontrol ve kefir-kolit gruplarına kefir verildi. Normal-kontrol ve kefir-kontrol gruplarına çalışma süresince normal içme suyu, kolit ve kefir-kolit gruplarına çalışmanın 1-7. günleri normal içme suyu, 8-14. günleri %3 DSS içeren içme suyu verildi ve deney sonlandırılarak, kolon doku örnekleri alındı.

Kolit yapılan gruplarda tedavi sonunda, tedavi öncesine göre anlamlı kilo kaybı vardı. Bu düşüş kolit grubunda, kefir-kolit grubuna göre daha fazlaydı.

Sıçanların çalışma boyunca HAI günlük olarak hesaplandı. Kolit grubunda HAI çalışmanın 3. ve 5. günlerinde kefir-kolit grubundan istatistik olarak yüksekti. Çalışmanın 2, 3, 4, 5 ve 6. gününde kolit grubu ile kontrol grupları arasında istatistik olarak fark olmakla beraber, kefir-kolit grubu ile kontrol grupları arasında sadece 6. günde istatistik olarak fark görüldü. Mikroskopik kolit skoru, kolit grubunda, kefir-kolit grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti ( $p=0.049$ ).

Proinflamatuar sitokin olan TNF-alfa düzeyleri kolit grubunda, kefir-kolit grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.009$ ). IL-10 düzeyleri gruplar arasında istatistiksel önemde farklı değildi ( $p>0.05$ ).

Kolon dokusunda MPO düzeyi kolit grubunda kefir- kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksekti ( $p=0.036$ ). Kefir-kolit grubunda kolon MPO düzeyleri kontrol grubu seviyelerindeydi. Kolon dokusunda MDA seviyesi kolit grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olmakla beraber farklılaşmalar istatistik olarak anlamlı değildi.

Kolon dokusunda iNOS ekspresyonu kolit grubunda diğer gruplara göre daha fazlaydı. Hemogram parametreleri gruplar arasında istatistiksel olarak farklı değildi.

Sonuç olarak, sıçanlarda %3 DSS ile uyarılan deneysel kolit modelinde kefir, hastalık aktivite indeksini, mikroskopik kolit skorunu ve kolitin uyardığı kilo kaybını azaltmaktadır; TNF-alfa ve MPO seviyelerini düşürerek inflamatuvar sürece olumlu katkı sağlamaktadır.

**Anahtar kelime:** Probiyotik, Deneysel kolit, İnflamatuar barsak hastalığı, Dekstran sülfat sodyum, kefir

## SUMMARY

### **Protective Effects of Kefir on Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis Model in Rats**

The aim of the present study was to investigate a protective effect of commercial kefir on DSS-induced colitis in rats and in which way the effect occurs.

In our study, 24 male Wistar albino rats were randomised into four groups; control, kefir-control, colitis and kefir-colitis groups. During 14 days skim milk was given to the control and colitis group and kefir was given to the kefir-control, kefir-colitis group once a day. In the normal-control and kefir-control groups tap water was given during the study and in the colitis and kefir-colitis groups tap water was given in the 1-7 days and water with 3% DSS was given in the 8-14 days. The study terminated and colon tissue specimens were taken.

In the colitis group at the end of the treatment, there was a significant weight loss than the pretreatment. The weight loss in the colitis group was more than the kefir-colitis group.

During the study, disease activity index (DAI) of the rats were calculated daily. In the colitis group the DAI was statistically higher than that of kefir-control group in the 3rd and 5th days of the study. Although in the 2-6th days of the study there was a statistically difference between the colitis and control groups, there was only a statistically difference between the kefir-colitis group and control groups in the 6th day of the study. In the colitis group the microscopic colitis score was statistically higher than that of the kefir-colitis group ( $p=0.049$ ).

The colon levels of the TNF-alpha, a proinflammatory cytokine, was significantly higher in the colitis group than the kefir-colitis group ( $p=0.009$ ). The levels of the IL-10 was not statistically different between the groups ( $p>0.05$ ). In the colon tissue the level of MPO was statistically higher in the colitis group than the kefir-control group ( $p=0.036$ ). In the kefir-colitis group the levels of MPO was almost the same with the control group. Although the levels of MDA in the colon tissue was higher in the colitis group than the other groups, however these differences were not statistically significant. The expression of iNOS in the colon tissue was higher in the colitis group than the other groups. The hemogram parameters were not significantly different between the groups.

In conclusion, in the DSS-induced colitis model in rats, kefir attenuates the DAI and microscopic colitis score, reduces body weight loss, elicits affirmative contribution to the inflammatory process by decreasing the colon TNF-alpha and MPO levels.

**Key words:** Probiotic, Experimental colitis, Inflammatory Bowel Disease, Dextrane Sulphate Sodium, Kefir

## KAYNAKLAR

1. Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med.* 2002; 252: 475-96.
2. Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and Management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:3:286-299.
3. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003;361:512-519.
4. Bengmark S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17: 833-48.
5. Linsken RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 234:29-40.
6. Seksik p, Sokol H, Lepage P et al. The role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24(suppl 3): 11-8.
7. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology.* 1999; 116:1107-14.
8. William F. Stenson, Stephen B. Hanauer, Russell D.Cohen. Inflammatory bowel disease. *Tadaka Yamada (Ed), 2009. s.1386-1472.*
9. Burakoff R., Hande S. Inflammatory Bowel Disease: Medical Considerations. *Greenberger NJ. (Ed), 2009. s.22-33.*
10. Feagan B, Rishmond Sy. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: *The clinician's guide to inflammatory bowel disease. Linchenstein GR(Ed). Slack, USA, 2003;s1-6.*
11. Loftus E, Sandborn W. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Edited by Gary R. Regueiro M. *Gastroenterology Clinics of North America. inflammatory bowel disease. 2002;1-20.*
12. Lim WC, Hanauer SB. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *2004;4:2:66-85.*
13. Strober W, Ludviksson BR, Fass IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn's disease. *Ann Intern Med.* 1998; 128:856-58.
14. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47: 412-426.
15. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 231-255.

16. Kruidenier L, Verspaget W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease- radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:1997-2015.
17. Thomas MJ: The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995; 35: 21-39.
18. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 479-481.
19. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995;35: 7-20.
20. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989; 82: 747-752.
21. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* 2007; 115: 81-103.
22. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry.* 1984; 222: 1-15.
23. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.* 1998;35:181-200.
24. Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J. Et al. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology.* 1992;103:177-85.
25. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1996;41:2078-86.
26. Rachmilewitz D, Stampler JS, Bancwich D, et al. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 1995;36:718-23.
27. Rachmilewitz D, Eliakim R, Ackerman Z, et al. Direct determination of colonic nitric oxide level-A sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:409-12.
28. Gaginella TS, Kachur JF, Tamai H, et al. Reactive oxygen and nitrogen metabolites as mediators of secretory diarrhea. *Gastroenterology* 1995;109:2019-28.
29. De Belder AJ, Radomski MW. Nitric oxide in the clinical arena. *J Hypertens.* 1994;12:6:617-624.
30. Knowles RG. Nitric oxide synthases. *Biochem Soc Trans* 1996;24:875-878.
31. Binion DG, Fu S, Ramanujam KS, Chai YC, Dweik RA, Drazba JA, Wade JG, Ziats NP, Erzurum SC, Witson KT. INOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion. *Am J Physiol.* 1998;275:G592-602.



32. Vento P, Kiviluoto T, Jarvinen HJ, Soinila S. Changes in distribution of three isoforms of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:180-189.
33. Kurozumi R, Kojima S. Increase of intracellular glutathione by low-level NO mediated by transcription factor NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;15;1744(1):58-67.
34. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 1996;1;98(1):136-41.
35. Rachmilewitz D, Stampler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite-induced rat colitis--a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology*. 1993;105(6):1681-8.
36. Chénais B, Tenu JP. Involvement of nitric oxide synthase in antiproliferative activity of macrophages: induction of the enzyme requires two different kinds of signal acting synergistically. *Int J Immunopharmacol*. 1994;16(5-6):401-6.
37. Lee JY, Je JH, Jung KJ, Yu BP, Chung HY. Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med*. 2004; 15;37(4):539-48.
38. Fazio VW. Toxic megacolon in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Clin Gastroenterol*. 1980;9(2):389-407.
39. Lim WC, Hanauer SB. Controversies with aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*. 2004;4:3:104-107.
40. Egan LJ, Sandborn WJ. Advances in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;126:1574-1581.
41. Sands B. Crohn's disease. Feldman M, Friedman L, Brandt LJ (Ed), 2006. s 2459-2498.
42. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863-869.
43. Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol*. 2009; 130: 7-15.
44. Fedorak RN. Understanding why probiotic therapies can be effective in treating IBD. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008;42:3:111-115.
45. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*. 2003;52:988-997.
46. Yan F, Polk DB. Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006;9:717-721.

47. Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, et al. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun*. 2007;75:2572–2579.
48. Madsen KL, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001;121:580–591.
49. Ko JS, Yang HR, Chang JY, et al. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *World J Gastroenterol*. 2007;13:1962–1965.
50. Luyer MD, Buuman WA, Hadfoune M, et al. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. *Infect Immun*. 2005;73:3686–3692.
51. Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*. 2007;75:2399–2407.
52. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002; 37: 1034-41.
53. Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, et al. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15: 61-8.
54. Lammers KM, Helwig U, Swennen E, et al. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1182–1186.
55. Madsen K, Jijon H, Yeung H, et al. DNA from probiotic bacteria exerts anti-inflammatory actions on intestinal epithelial cells by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Gastroenterology*. 2002;122:A546.
56. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:389–395.
57. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH: Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109:1344-1367.
58. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R: A novel method of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990; 98:694-702.
59. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993; 69(2):238-49.
60. Verdu EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E, Blum AL, Cortesy-Theulaz I, Tlaskalova-Hogenova H, Michetti P. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol*. 2000; 120: 46-50.

61. Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, Mcclung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am. J. Physiol.* 2000;279:G1298–G1306.
62. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
63. Iris D, Daniel R. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Current Opinion in Gastroenterology.* 2005;21:4:426-430.
64. Sartor RB. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11(Suppl 3):17-22.
65. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology.* 2004; 126:1620-1633.
66. Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002; 31:41-62.
67. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004; 53:1-4.
68. Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2003; 17: 711-724.
69. M. İşler İnflamatuvar barsak hastalığı ve probiyotikler. *Güncel Gastroenteroloji.* 2005;9:3:134-140.
70. Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252: 475-96.
71. Guslandi M. Probiotics for chronic intestinal disorders. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98: 520-1.
72. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G, et al. Low-dose balsalazine plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazine alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit.* 2004;10:1126-131.
73. Bibiloni R, Fedorak R, Tannock G, et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:1539-1546.
74. Zocco M, dal Verme L, Cremonini F, et al. Efficacy of *Lactobasillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1567-1574.
75. Isaacs K, Herfarth H. Role of probiotic therapy in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1597-1605.

76. Kruis W, Schütz E, Fric P, et al. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazin in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997;11:853-858.
77. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, et al. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut.* 2003; 52: 975-80.
78. Mahadevan U, Sandborn W. Diagnosis and management of pouchitis. *Gastroenterology.* 2003;124:1636-1650.
79. Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:509-515.
80. Gionchetti P, Rizzello P, Venturi A, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2000;119:305-309.
81. Ohkusa T, Sato N. Antibacterial and antimycobacterial treatment for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20: 340-51.
82. Dieleman LA, Palmen MJHJ, Akol H, Bloemena E, Pena S, Meuwissen SGM, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:383-391.
83. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg.* 1998;22:382-389.
84. Korenaga D., Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Surg. Res.* 2002; 102:144-149.
85. Chen LL, Wang XH, Cui Y, Lian GH, Zhang J, Ouyang CH, Lu FG. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol.* 2009;15:3:321-327.
86. Jungbeck M, Daller B, Federhofer J, Wege AK, Wimmer N, Mannel DN, Hehlhans T. Neutralization of LIGHT ameliorates acute dextran sodium sulphate-induced intestinal inflammation. *Immunology.* 2009;128;3:451-8.
87. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol.* 2004;143(7):908-18.
88. Herías MV, Koninkx JF, Vos JG, Huis in't Veld JH, van Dijk JE. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Food Microbiol.* 2005;103(2):143-55.
89. Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Food Microbiol.* 2007;20;114(3):267-74.

90. Karbowska J, Kochan Z. Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:Suppl.6: 103–113.
91. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006; 444:847–853.
92. Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, Matsuyama H, Abd El-Gawad IA, Imaizumi K. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr.* 2008;99(5):1013-7.
93. Sousa R, Halper J, Zhang J, Lewis SJ, Li WI. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supernatants on body weight and leptin expression in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2008;19;8:5.
94. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Williers WJS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005;16:5:297-304.
95. Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci* 1988;33:6–15.
96. Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic. Biol. Med.* 1992;13:169–181.
97. Guven A, Guven A, Gulmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:412-6.
98. Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterol.* 2006;28;6:31.
99. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;8:347(6):417-29.
100. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev.* 2003,8(3):247-83.
101. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, et al. Interferongamma(IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxiceffector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 1999; 116: 238-245.
102. Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2004;15;10(10):1521-5.
103. Mosmann, T.R.: Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res.* 1991;10:183.

104. De Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Ysel, H., de Vries, J.E.: Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174:915, 1991.
105. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991; 147:3815.
106. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75:263.
107. Pena JA, Rogers AB, Ge Z, et al. Probiotic *Lactobacillus* spp. Diminish *Helicobacter hepaticus*-Induced Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infect Immun.* 2005; 73:912-920.
108. Nanda Kumar NS, Balamurugan R, Jayakanthan K, Pulimood A, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(12):1834-9.
109. Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology.* 1995;109:1475-83.
110. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut.* 1995;37:247-55.
111. Lundberg JO, Hellstrom PM, Lundberg JM, Alving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet.* 1994;344:1673-4.
112. Ferretti M, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Intracolonic release of nitric oxide during trinitrobenzene sulfonic acid rat colitis. *Dig Dis Sci.* 1997;42:2606-11.
113. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite-induced rat colitis--a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology.* 1993;105(6):1681-8.
114. Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol.* 1995;268:G673-84.
115. Neilly PJ, Gardiner KR, Rowlands BJ. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut.* 1996;38:475-475.
116. Korhonen R, Korpela R, Saxelin M, Mäki M, Kankaanranta H, Moilanen E. Induction of nitric oxide synthesis by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells. *Inflammation.* 2001;25(4):223-32.