

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA TRİNİTROBENZENE SULPHONİC ACİD
(TNBS) İLE UYARILAN KOLİT MODELİNDE KEFİRİN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurhayat ÖZKAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. M. Cem KOÇKAR**

ISPARTA

2008

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SIÇANLARDA TRİNİTROBENZENE SULPHONİC ACİD
(TNBS) İLE UYARILAN KOLİT MODELİNDE KEFİRİN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurhayat ÖZKAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. M. Cem KOÇKAR

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1303-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2008

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLOLAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı	3
2.1.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığının Patogenezi.....	3
2.1.2. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Klinik Özellikler	6
2.1.4. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Tedavi	8
2.2. Probiyotikler, Barsak Florası ve Kolit	12
2.2.1. Probiyotiklerin İBH’da Etki Mekanizması	13
2.2.2. Kefir	15
2.2.3. Kefirin Kullanıldığı Çalışmalar	18
2.2.4. Trinitrobenzen Sulfonik Asit (TNBS) Kolit Modeli.....	19
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Deney Hayvanları	21
3.1.2. Kefirin Hazırlanması.....	21
3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler	22
3.2. Metod	22
3.2.1. Ratların Beslenme Modeli	22
3.2.2. Kolit İndüksiyonu	23
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	23
3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması	25
3.2.5. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi	25
3.2.6. Histolojik Değerlendirme	26
3.2.7. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması	27
3.2.8. Dokularda Biyokimyasal Analizler	27
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme	28

4. BULGULAR.....	29
4.1. Ratların Gruplara Göre Sulu ve Kanlı Dışkılama Oranları.....	29
4.2. Ratların Gruplara Göre Tükettikleri Günlük Sıvı Miktarları.....	29
4.3. Ratların Gruplara Göre Tükettikleri Günlük Yem Miktarları	31
4.4. Ratların Gruplara Göre Günlük Ağırlık Değişiklikleri.....	33
4.5. Lezyonların Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirmesi.....	34
4.6. Biyokimyasal Analiz Sonucu Elde Edilen Veriler	39
4.6.1. Kolon Dokusunda MPO Aktivitesi.....	39
4.6.2. Kolon Dokusunda MDA Düzeyleri	40
4.6.3. Kolon Dokusunda TNF- α Düzeyleri	41
4.6.4. Kolon Dokusunda IL-1 β Düzeyleri	42
4.6.5. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	57
8. KAYNAKLAR	61

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanlarım Prof. Dr. Mehmet İŞLER ve Doç. Dr. M. Cem KOÇKAR başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, laboratuvar çalışmamda emeği geçen Dr. Sema SEZGİN GÖKSU, Dr. Mine SAYILGAN KARAKAYA, Dr. Sefa KIZTANIR, Dr. Medine CÜRE'ye, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine ve çalışmalarım sırasında manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Nurhayat ÖZKAN

KISALTMALAR

İBH	: İnflamatuvar barsak hastalığı
ÜK	: Ülseratif kolit
CH	: Crohn hastalığı
MPO	: Myeloperoksidase
MDA	: Malondialdehide
TNF-α	: Tumor necrosis factor alfa
IL	: Interleucine
IL-1β	: Interleucine 1-beta
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
APC	: Antigen-presenting cell
Th	: T helper
IFN-γ	: Interferone gamma
HLA	: Human leukocyte antigen
5-ASA	: 5-amino salisilik asit
NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
Ig	: Immunoglobuline
Fab	: Antigen-binding fragments
DSS	: Dextran sulfat sodium
L	: Lactobacillus
Str	: Streptococcus
B	: Bifidobacterium
S	: Saccharomyces
C	: Candida
TNBS	: Trinitrobenzene sulphonik asit
ir	: İntrarektal
ip	: İntraperitoneal
PBS	: Phosphate-buffered saline
SF	: Serum fizyolojik
H&E	: Hematoksilen ve eozin
TGF-β	: Transforming growth factor-beta
LT	: Leucotriene

DMNV : Dorsal motor nucleus of the vagus
HO : Heme oxygenase
AM : Adrenomedulline
CGRP : Calcitonin gene-related peptide
MCP : Monocyte chemoattractant protein
VEGF : Vascular endothelial growth factor
DSG : Deoxyspergualin
TMMC : Tris(methoxymethoxy) chalcone
ICAM : Intercellular adhesion molecule
AN : Anabasein
CHD : Chlorisond-amine diiodide
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nın patogenezi	4
Şekil 2. Akut Hastalıkta Sıralı Tedavi	9
Şekil 3. Kefir tanesi	16
Şekil 4. Ratların günlük tükettikleri sıvı miktarları	30
Şekil 5. Ratların günlük tükettikleri yem miktarları	32
Şekil 6. Ratlardaki günlük ağırlık değişiklikleri	34
Şekil 7. Ratların gruplara göre kolon ağırlıkları	35
Şekil 8. Ratların gruplara göre kolon boyları	36
Şekil 9. Ratların gruplara göre kolon ağırlık/boy oranları	36
Şekil 10. Ratların gruplara göre kolon duvar kalınlıkları	36
Şekil 11. Ratlardaki makroskopik kolit skorlaması	37
Şekil 12. Ratlardaki mikroskopik kolit skorlaması	38
Şekil 13. Kolon dokusunda MPO aktivitesi	39
Şekil 14. Kolon dokusunda MDA düzeyleri	40
Şekil 15. Kolon dokusunda TNF- α düzeyleri	41
Şekil 16. Kolon dokusunda IL-1 β düzeyleri	42
Şekil 17. Kolon dokusunda IL-10 düzeyleri	43

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri	7
Tablo 2. İnflamatuvar barsak hastalıklarının ekstraintestinal bulguları	8
Tablo 3. Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar	17
Tablo 4. Kullanılan malzeme ve aletler	22
Tablo 5. Deney protokolü, günlere göre ilaç uygulamaları	24
Tablo 6. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi (Wallace Skalası).....	26
Tablo 7. Mikroskopik Kolit Değerlendirmesi.....	27
Tablo 8. Ratların gruplara göre sulu ve kanlı dışkılama oranları.....	29
Tablo 9. Ratların günlük tükettikleri sıvı miktarları	30
Tablo 10. Ratların tükettikleri günlük yem miktarları	32
Tablo 11. Çalışma boyunca ratların günlük ağırlıkları	33
Tablo 12. Kolonun ağırlık, boy ve duvar kalınlığı ölçümleri sonucu elde edilen veriler	35
Tablo 13. Ratların gruplara göre makroskopik skorlaması.....	37
Tablo 14. Ratların gruplara göre mikroskopik skorlaması	38
Tablo 15. Deney gruplarına göre MPO aktivitesi.....	39
Tablo 16. Deney gruplarına göre MDA düzeyleri.....	40
Tablo 17. Deney gruplarına göre TNF- α düzeyleri	41
Tablo 18. Deney gruplarına göre IL-1 β düzeyleri	42
Tablo 19. Deney gruplarına göre IL-10 düzeyleri	43

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBH); intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, bozulmuş immun cevapla ilerleyen, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır.

İBH'nın patogenezi multifaktöriyeldir ve halen tam olarak açıklanamamıştır (1). Doku hasarının mekanizması ve moleküler mediatörlerin daha iyi anlaşılması hastalığın patogenezinde genetik, enfeksiyöz, immunolojik ve inflamatuvar faktörlerin önemli olduğunu göstermiştir (2). Patogenezi açıklamaya yönelik çalışmalara paralel olarak tedavide de yeni ajanlar denenmektedir. Son dönemlerde İBH tedavisinde en ilgi çeken konulardan biri probiyotiklerin kullanımınıdır. Probiyotikler mikrobiyal florayı düzenleyerek insan sağlığına olumlu etkilerde bulunan canlı mikroorganizmalardır (1).

İBH'lı hastalarda barsak mikroflorasının normal kişilerdekinden farklı olduğu ve hastaların serumlarında bazı bakterilere karşı saptanmış antikorlar bulunduğu bilinmektedir. Hastaların antibiyotik tedavisinden yarar görmeleri, bozulmuş bakteri florasının hastalığın ortaya çıkmasında ve devam etmesinde rolü olduğuna işaret etmektedir. Probiyotikler, barsak bakteri florasının değiştirilmesinde antibiyotiklere alternatif bir yol olarak güvenli bir seçenektir (3). Probiyotiklerin mukozal ve sistemik sitokin paternini de değiştirdiği bilinmektedir. Probiyotikler barsak mukozası ve sistemik sitokin paternini module ederek İBH'nın iyileşmesine katkıda bulunabilirler (4). Öte yandan, bazı probiyotik ürünlerinin mukoza için koruyucu etkinliği olabileceğini gösteren bulgular vardır. Barsak florasına hakim olan probiyotiklerin mukozayı örttüğü ve patojenleri mukozadan uzak tuttuğu bilinmektedir; bir çalışmada probiyotiklerin deneysel kolitte bakteriyel translokasyonu azalttığı gösterilmiştir (5).

İBH'da probiyotiklerin preventif ve tedavi edici etkinliği uygun bakteri veya bakteri kombinasyonlarının bulunması ile artacaktır. Yüzyıllardan beri bilinen ve sütün fermentasyonu ile doğal yollardan elde edilen bir içecek olan kefir, zengin probiyotik içeriğe sahiptir. Probiyotikler şimdiye dek deneysel kolit tedavisinde denenmiş olmasına rağmen kefirle ilgili yapılmış bu tür bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı:

- Deneysel kolit oluşturulmuş ratlarda barsak dokusundaki patolojileri makroskopik ve histopatolojik olarak incelemek,

- Barsakdaki doku hasarında kesin bir tetikleyici mekanizma olarak kabul edilen ve dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan *myeloperoxidase* (MPO); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan *malondialdehyde* (MDA); proinflamatuvar sitokinler olan *Tumor necrosis factor* (TNF)- α , *interleukin* (IL)-1 β ; antiinflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-10 tayini yapılması ve kefirin tüm bu parametreler üzerine olası etkilerini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

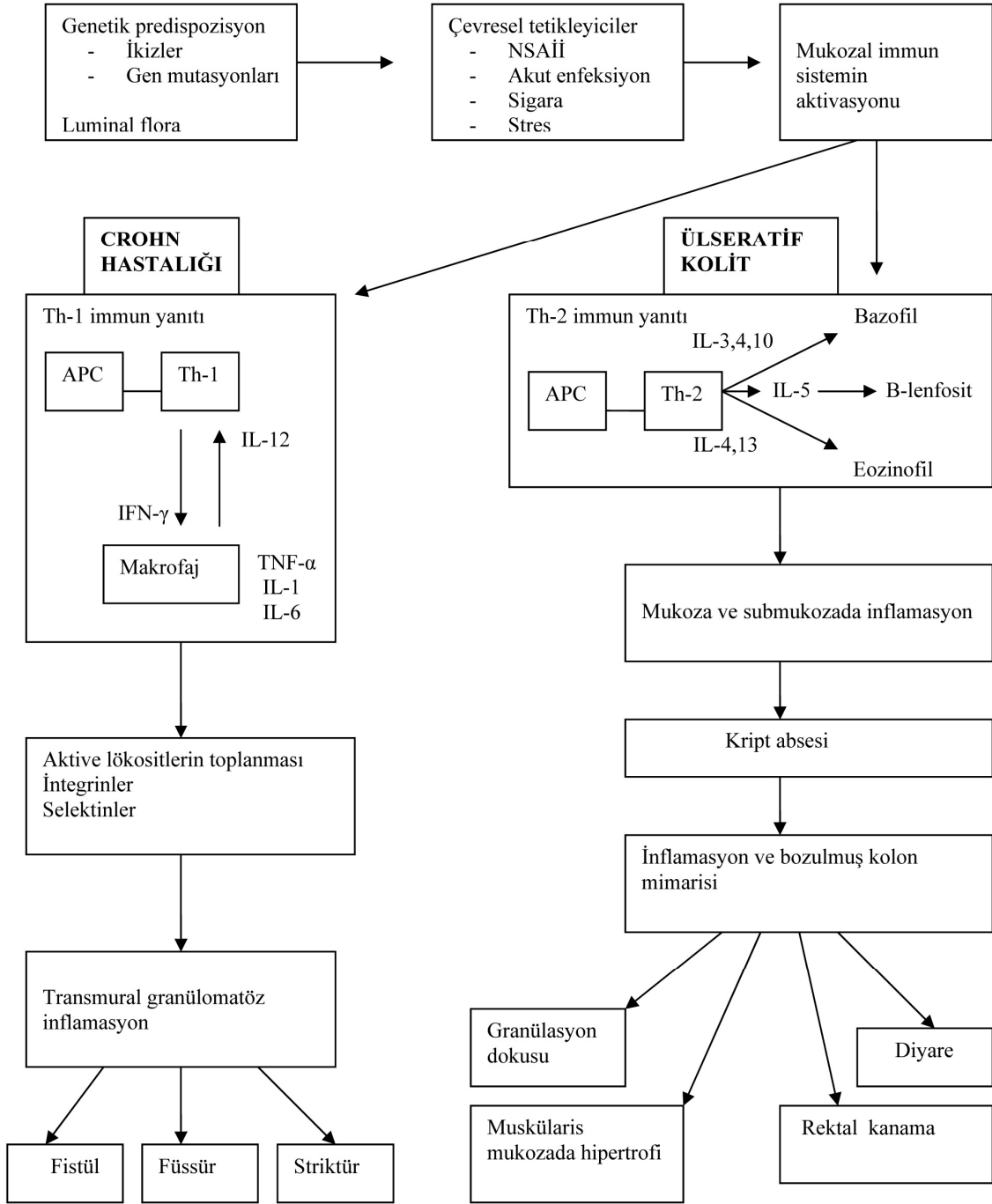
İBH; intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, bozulmuş immün cevapla ilerleyen, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır (1). İBH başlığı altında birbiriyle ilişkili ancak farklı hastalıklar olarak tanımlanan ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) yer almaktadır. Bu iki hastalık klinik, endoskopik ve histolojik özellikleri ile birbirinden ayrılır. Ancak bazı hastaların klinik tablosu bu iki hastalık arasında kalır ve indeterminate kolit olarak adlandırılır (6).

CH gastrointestinal kanalın tüm segmentlerini tutabilen, arada sağlam alanlar bırakan transmural inflamasyonla karakterizedir. ÜK ise kolon mukozasını ve submukozayı tutan, rektumdan proksimale doğru ilerleyen bir hastalıktır (7).

İBH; Birleşik Devletlerde yaklaşık iki milyon insanı etkilemektedir. CH için insidans 3.6-8.8/100.000 vaka iken, ÜK için 3-15/100.000 vakadır. ÜK'da hafif bir erkek predominansına karşılık, CH kadınlarda daha sıktır. İBH her yaşdaki insanı etkileyebilir. İlk zirvesini 15 ile 40 yaşları arasında, ikinci zirvesini 60 yaşından sonra yapar. Hastalık tüm ırkları ve etnik grupları etkilemekle birlikte en sık görüldüğü bölgeler Kuzey Amerika ve Avrupa'dır. ÜK sigara içmeyenlerde içenlere göre daha sık görülmesine karşın, CH olanlarda sigara içme sıklığı topluma göre daha yüksektir (8).

2.1.1. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarının Patogenezi

İBH'nın patogenezi multifaktöriyeldir. Etkilenmiş bireylerde genellikle genetik bir altyapı vardır. Gastrointestinal mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulmasından sonra luminal antijenler mukozal immün sistemi aktive eder. Böylece doku hasarı ve İBH'nın klinik bulguları ortaya çıkar. İBH'nın patogenezi Şekil 1'de gösterilmiştir (1).



Şekil 1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı'nın patogenezi

Genetik Yatkınlık: Çalışmalar İBH olan bireylerde güçlü genetik yatkınlık olduğunu göstermiştir. İBH olanların birinci derece akrabalarında İBH görülme riski 4-20 kat artmıştır (9, 10). İBH'lı hastalarda farklı kromozomlardaki çeşitli genler sorumlu tutulmuştur. Bunlardan en çok üzerinde durulan CARD-15 (NOD2 olarak da bilinir) genidir. Bu gen makrofajlarda ve panet hücrelerinde eksprese edilir. Bu genin varyant

formu bakterilerin peptidoglikan tabakasına karşı duyarlılığı azaltır. Böylece bakteriler konakta immun sistemin ilk basamağını by-pass eder ve mukozal immun sistemde artmış stimülasyona neden olur (1).

Luminal Antijenler: Hayvan deneyleri İBH gelişimi için luminal floranın gerekli olduğunu göstermiştir. Genetik olarak yatkın hayvanlar doğuştan itibaren mikropdan arındırılmış ortamda tutulduklarında immun sistem aktivasyonu ve kolit gelişmez. Aynı hayvanlar luminal flora edindiklerinde immun sistemleri aktive olur ve kolit gelişir (11).

Çevresel Tetikleyiciler: Genetik yatkınlığı olan konakta İBH gelişmesi için çevresel tetikleyiciler gerekir. Bunun sonucunda luminal flora değişir veya mukozal bariyerde hasarlanma görülür. Antibiyotik ve diyet luminal florada değişikliklere yol açabilir. NSAİİ ve akut enfeksiyonlar inflamasyona yol açarak mukozal geçirgenliği artırabilir (12). CH'da sigara içimi atakları presipite edebilir (13). Çevresel faktörlerin tümü luminal antijenlerin mukozal immun sistemi aktive etmesine neden olur (1).

Mukozal İmmun Sistemin Aktivasyonu: Çevresel faktörler mukozal immun sistemde kalıcı ve giderek artan bir aktivasyona neden olur. İBH'da ve deneysel kolitte inflamatuvar süreç; nötrofil, monosit ve lenfosit gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile ortaya çıkar. Lökositler serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır (14). Reaktif oksijen radikalleri, lipid membranların peroksidasyonu, protein denaturasyonu ve DNA hasarı yaparak hücre ve doku düzeyinde hasara yol açarlar. İnflamasyonlu dokuda nötrofil infiltrasyonu; MPO enzimi aracılığıyla, güçlü sitotoksik oksidanların ortaya çıkmasını kolaylaştırır (15). Hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinin bu serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir (16, 17). Oluşan lipid peroksil radikalleri; hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni MDA'dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin ve bunlara bağlı olarak da yıkımın arttığını gösterir (18).

İBH gelişimi süresince, inflamasyonlu barsak mukozasındaki makrofajlar ve lenfositler tarafından en başta TNF- α , IL-1 β ve IL-6 olmak üzere birçok

proinflamatuar sitokin üretilmekte ve bu proinflamatuar sitokinler inflamatuvar cevabın devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (9).

Barsak Florası: İBH'da barsak florasının sağlıklı bireylerdekinden farklı olduğu gözlenmiştir. Matsuda ve ark., ÜK hastalarının barsak florasında *Bacteroides vulgatus*'un en sık izole edilen ve konsantrasyonu en yüksek olan bakteri olduğunu ve bu hastaların serumlarında *Bacillus vulgatus*, *Bacteroides fragilis* ve *Clostridium ramosum* aglutinin titrelerinin de kontrollerdekinden daha yüksek bulunduğunu saptamışlardır (19). Yazarlar bu bulgularına dayanarak spesifik antikor cevabının, ÜK patogenezinde önemli rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bir başka çalışmada da, İBH olguları ve kontrol vakalarının terminal ileum ve/veya kolonundan cerrahi rezeksiyonla alınan doku örneklerinde yapılan incelemelerde, İBH olgularının mukoza yüzeylerinde kontrollerdekinden daha fazla bakteri saptanmıştır. Bu çalışmada, mukozanın bakteriyel invazyonu, ÜK'lı hastalardan alınan kolon örneklerinin %83.3'ünde, Crohn hastalarının ileumlarının %55.6'sında ve kolon örneklerinin %25'inde görülürken, kontrol grubundakilerin dokularında hiçbir bakteri gözlenmemiştir (20). Öte yandan, hem insandaki İBH hem de deneysel kolit modellerinde geniş spektrumlu antibiyotiklerin hastalık seyrini etkileyebileceği gösterilmiş; floranın anaerobik fraksiyonuna etkili dar spektrumlu antibiyotiklerin cerrahiden sonra remisyona giren CH'nin relapsını engellediği bildirilmiştir (21).

Borody ve ark.'nın ilginç çalışması ise İBH'da bozulmuş barsak florasının restore edilmesinin önemini ortaya koymuştur. Yazarlar, ÜK'lı 6 hastaya, parazit ve bakteriyel patojen taşımadığı kanıtlanmış sağlıklı kişilerin feçes süspansiyonlarını, retansiyon lavmanı şeklinde uyguladıklarında tedavinin birinci haftasında ÜK'nın bazı semptomlarının iyileştiğini, 4 ay sonra semptomların tam olarak düzeldiğini ve 1 ila 13 yıl izlenen bu hastalarda, herhangi bir geleneksel ilaç kullanmadan, ÜK'nın klinik, kolonoskopik veya histolojik bulgusunun saptanmadığını bildirmişlerdir (22).

2.1.2. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Klinik Özellikler

İBH'nın klinik ve diagnostik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir (1, 23).

Tablo 1. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri

	Crohn Hastalığı	Ülseratif Kolit
Semptom ve bulgular		
Karın ağrısı	+++	+
Diyare	+++	+++
Rektal kanama	+	+++
Urgensi ve tenesmus	+	+++
Kilo kaybı	+++	+
Ateş	+++	+
Malnütrisyon	++	+
Abdominal kitle	+++	+
Komplikasyonlar		
Sitrüktür	+++	+
Fistül	++++	0
Toksik megakolon	+	++
Perforasyon	++	+
Kanser	+	++
Tutulum paterni	Sıçrayıcı lezyonlar	Devamlı
Tutulan bölgeler	Gastrointestinal traktusun herhangi bir parçası tutulabilir. Oral ve perianal hastalık olabilir. Sıklıkla ileum ve kolon tutulumu.	Sadece rektum ve kolon Nadiren çekal yama vardır <i>Backwash ileitis</i>
Endoskopik bulgular	Segmental inflamasyon Aftöz ve lineer ülserler Kaldırım taşı manzarası Psödopolipler	Yaygın inflamasyon Eritem Frajilite ve granülarite varlığı Vasküler belirginliğin kaybolması Psödopolipler siktir
Histolojik bulgular	Transmural inflamasyon Granülom	Mukozal inflamasyon Kript abseleri
Radyolojik bulgular	İp işareti Barsak duvarı kalınlaşması Yağ birikimi Obstrüksiyon	Haustrasyon kaybı Toksik megakolon

2.1.3. Ekstraintestinal Bulgular

CH ve ÜK'nin en sık ekstraintestinal manifestasyonları; karaciğer, kemikler, eklemler, deri ve gözlerde görülür. Bunlar sıklıkla intestinal hastalıktan önce ortaya çıkarlar. Periferal artrit, eritema nodozum ve episklerit hastalık aktivitesi ile paralel iken sakroileit, ankilozan spondilit, piyoderma gangrenozum, anterior uveit ve primer sklerozan kolanjitte böyle bir ilişki yoktur (24). İBH'nin ekstraintestinal bulguları Tablo 2'de gösterilmiştir (1, 24).

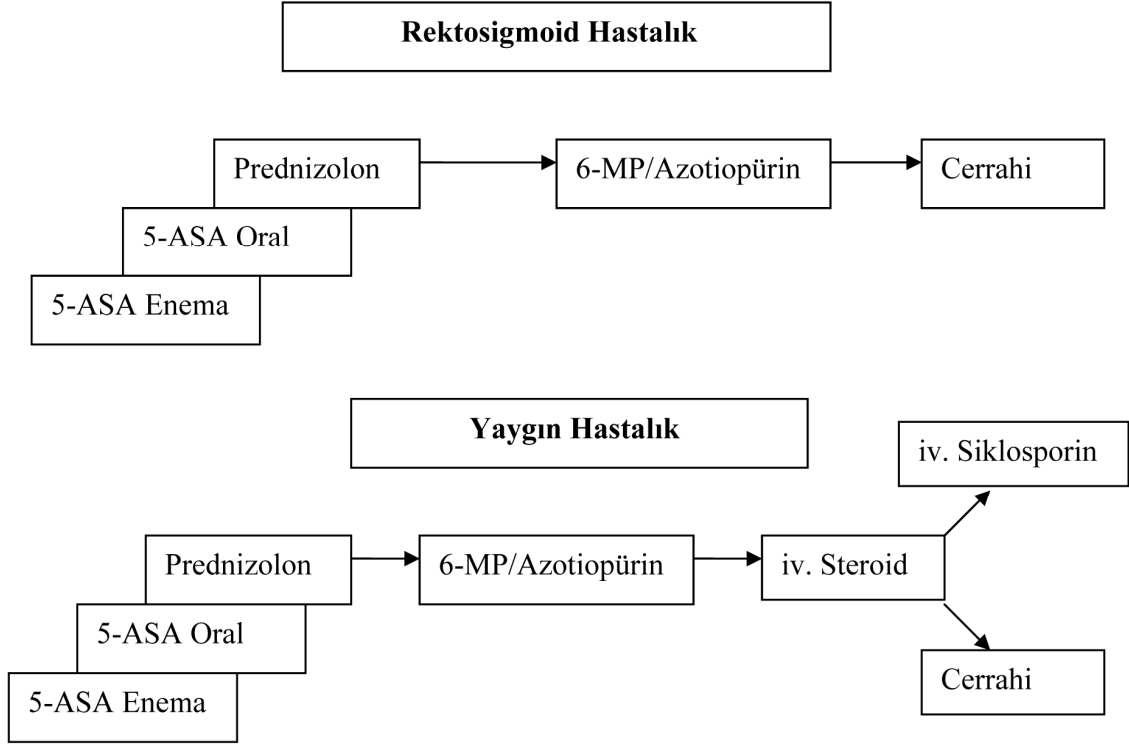
Tablo 2. İnflamatuvar barsak hastalıklarının ekstraintestinal bulguları

Belirtiler	Sıklık	Açıklama
Eritema nodozum	%10	Ekstremitelerde hiperemik subkutan nodüller
Piyoderma gangrenozum	<%5	Derin ülserasyon, steril pü
Episklerit	<%5	Silier damarların injeksiyonu, episkleral dokuların inflamasyonu
Anterior üveit	%3	Baş ağrısı, fotofobi, bulanık görme, ağrı, glokoma progresyon
Sklerozan kolanjit	%3	İntra ve ekstrahepatik safra kanallarında inflamasyon, fibrozis, striktürler
Safra taşı	%30	İleal tululumla seyreden CH'da kolesterol taşları ve pigment taşlarının görülme sıklığı artar
Böbrek taşı		Kalsiyum oksalat ve ürik asit taşlarının sıklığı artar
Periferal artrit	%20	Diz, dirsek ve bilek eklemleri tutulumu. Seronegatifdir. NSAİİD'ler dikkatli kullanılmalıdır
Ankilozan spondilit	%5	HLA B27 ile ilişkilidir
Sakroileit	%20	HLA B27 ile ilişkilidir
Osteoporoz		Kısmen kortikosteroid kullanımı, kalsiyum ve D vitamini malabsorbsiyonu ile ilişkilidir
Hiperkoagülabilité	%5	Faktör-5, Faktör-8, fibrinojen, trombosit artışı ve antitrombin-3 düzeyinde azalma ile ilişkilidir
Otoimmün hastalıklar	>%6	Birçoğu İBH ile ilişkilidir

2.1.4. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Tedavi

Son yıllarda İBH'nin tedavisinde birçok gelişme kaydedilmiştir. En önemli gelişmeler anti TNF- α , anti- α 4 integrin ve probiyotik tedavisinde olmuştur (9, 25). Nitekim İBH tedavisi bir piramit sisteminden oluşmaktadır. Hafif ya da orta şiddette koliti olan hastalarda aminosalisilatlar ve hastalık alevlenmelerinde de sıklıkla kortikosteroidler kullanılmaktadır. İBH hastalarının büyük bir kısmının çok boyutlu bakıma ihtiyacı vardır, çünkü hastalık hayatın birçok yönünü etkilemektedir. Tedavi

yaklaşımı; beslenme, psikososyal destek, barsak hastalığının kontrolü ve ekstraintestinal tutulumları içermelidir (9). İBH’da akut hastalığıdaki genel tedavi yaklaşımı Şekil 2’de verilmiştir (26).



Şekil 2. Akut Hastalıkta Sıralı Tedavi

Aminosalisilatlar:

İBH’da yıllardır remisyona induksiyonu ve idamesinde ilk seçenek aminosalisilatlar (ASA) olmuştur. Sülfasalazin, sülfapiridin ve 5-ASA’dan oluşur. Kolonda bakteriyel flora 5-ASA’yı açığa çıkarır. 5-ASA lokal olarak antiinflamatuvar etki gösterir (1). Prostaglandinlerin ve lökotrienlerin üretimini durdurur. Kemotaksisi inhibe eder. Oksijen radikallerinin açığa çıkmasını önler, *nuclear factor kappa-B* (NF-κB)’yi inhibe eder. Sülfapiridin molekülü ise kolondan emilir, ilacın yan etkilerinin büyük bir kısmından sülfapiridin sorumludur. Çoğu hastanın sülfasalazini tolere edememesi nedeniyle yeni 5-ASA preparatları geliştirilmiştir; mesalamin, olsalazin gibi...(27). Distal tip ÜK’da rektal mesalamin uygulaması remisyona sağlayabilir. Remisyona idamesinde ise topikal mesalamin plasebodan üstün ve en az oral mesalamin kadar etkilidir (28, 29).

İmmun süpresif ajanlar:

a- Kortikosteroidler: Kortikosteroidler remisyonun indüksiyonu için yaygın kullanılan antiinflamatuvar ajanlardır. Ancak remisyonun idamesinde kullanılmazlar (25, 30). Kortikosteroidler intrastoplazmik glukokortikoid reseptörüne bağlanarak immün sistem üzerinde pek çok etki meydana getirirler. Lenfosit proliferasyonunu inhibe eder, nötrofil kemotaksisini inhibe eder, sitokinler, lökotrienler ve prostoglandinler gibi solübl inflamatuvar mediatörlerin üretimini azaltırlar (31). Orta şiddetli veya şiddetli ÜK tedavisinde 20-60 mg/gün dozda kullanılır; dozun 60 mg/gün'ün üzerine çıkarılmasının ek katkısı gösterilememiştir. Ciddi koliti olan ve oral tedaviye cevap alınamayanlarda parenteral olarak uygulanabilirler (32). Aktif distal tip ÜK'da nonsistemik steroidlerin enema şeklinde kullanımları da yararlıdır (33).

b- Azotiopürin ve 6-merkaptopürin: İBH'nın idame tedavisinde en sık kullanılan ilaç azotiopürindir. Ancak etkisi geç ortaya çıkar (1). 6-merkaptopürin ve onun prodrug formu olan azotiopürin; pürin analoglarıdır, nükleik asit sentezine katılarak antiproliferatif etki gösterirler. Son zamanlarda apoptozisi de indükleyebildikleri gösterilmiştir (33). Bir çalışmada azotiopürinin aktif metaboliti olan 6-merkaptopürinin CH'da postoperatif rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (34).

c- Metotreksat: Metotreksat CH'da remisyonun indüksiyonu ve idamede etkili bulunmuştur (34, 35). Metotreksat bir folat analogudur. Dihidrofolat redüktaz enzimini kompetitif ve reversibl olarak inhibe eder. DNA sentezini durdurur, proinflamatuvar sitokin üretimini azaltır, lenfositlerde apoptozise yol açar (36).

d- Siklosporin: Siklosporin antiinflamatuvar etkileri olan lipofilik bir peptittir. IL-2 düzeyini azaltır. Böylece proliferasyonu inhibe eder. Th hücrelerinde aktivasyona neden olur (37). İntravenöz kortikosteroid tedavisine refrakter ÜK hastalarında intravenöz siklosporin hastaları kolektomiden kurtarabilir. Tacrolimus ve mikrofenolat mofetil de ikinci sıra immünsüpresif tedavide kullanılabilir (38).

Antibiyotikler:

Antibiyotikler luminal florayı değiştirerek ve mukozal immün sistemin aktive olmasını önleyerek etkili olurlar. Metronidazol, perianal ve kolonik CH'nın aktivasyonunun tedavisinde etkilidir (39). Crohn hastalarında cerrahi rezeksiyon ve

anastomoz sonrasında üç ay boyunca metranidazol verilmesinin rekürrensi geciktirdiği gösterilmiştir (40).

Siprofloksasin'in 1gr/gün dozunda verilmesinin Crohn hastalarında hastalık aktivite indeksini belirgin olarak azalttığı saptanmıştır (41). Siprofloksasinin konvansiyonel tedaviye refrakter ÜK hastalarında remisyona indüksiyonunda ve idamesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (42).

Biyolojik ajanlar:

a- İnfliximab: Şimerik (%75 fare, %25 insan) anti TNF- α monoklonal antikorudur. TNF- α proinflamatuvar etkileriyle İBH patogenezinde çok önemli rol oynar. Refrakter ve fistülizan CH'da infliximabın etkili olduğu gösterilmiştir (43). Bununla beraber ÜK'lı hastalarda infliximab ile farklı sonuçlar vardır. Yapılan randomize bir çalışmada steroid tedavisine dirençli ÜK'da infliximabın yararı gösterilememiştir (44). Başka bir çalışmada ise steroid ve/veya azotiopürin tedavisine refrakter veya intolerans gösteren hastalarda infliximabın etkili olduğu görülmüştür (45).

b- Adalimumab: Subkutan olarak kullanılan insan TNF- α 'sına yüksek spesifite ve afinite ile bağlanan immunglobülin (Ig) -G1 tipinde monoklonal antikorudur. CH'da plaseboya göre daha yüksek remisyon oranları bildirilmiştir (46).

c- Sertolizumab: Monoklonal humanize anti TNF- α antikorudur. *Fragment-antigen binding* (Fab) kısmı kimyasal olarak polietilen glikol ile bağlanmıştır. Sertolizumab, CH'nin remisyon indüksiyonu ve idame tedavisinde denenmiştir ve plaseboya göre klinik cevap ve remisyon oranları belirgin olarak daha iyi bulunmuştur (47).

c- Fontalizumab: *İnterferone* (IFN) - α 'ya karşı geliştirilmiş monoklonal antikorudur. IFN- α proinflamatuvar aktivitesi yüksek bir sitokindir. Deneysel kolit modellerinde ve CH'da mukozal düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Fontalizumab'ın Crohn hastalarında plasebo ile karşılaştırıldığında cevap oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür (48).

d- Diğerleri: İBH tedavisinde denenmekte olan pek çok ajan vardır. Bunlar; alfa-4 integrine karşı antikorlar (Natalizumab), aktive T hücrelerinde eksprese edilen T

cell reseptörlerinin CD3 zincirine karşı geliştirilen monoklonal antikor (Visilizumab), Anti IL-6 reseptör antikor, Anti IL-2 antikor ve Talidomid'dir (33).

Son dönemlerde İBH tedavisinde en ilgi çeken konulardan biri de probiyotiklerin kullanımınıdır.

2.2. Probiyotikler, Barsak Florası ve Kolit

Probiyotik kelimesi Yunancada 'yaşam için' anlamına gelmektedir. Probiyotik kavramı ilk olarak Lilly ve Stilwel tarafından başka mikroorganizmaların üremesini engelleyen mikroorganizma metabolitleri olarak tanımlanmıştır (49). Probiyotiklere ilk temas eden, 1903 yılında "yaşlanmada uzun ömürlülük" teorisiyle Nobel ödülü kazanan Rus biyolog Ellie Mechnikof olmuştur. Mechnikof laktobasilleri içeren gıdaları tüketen insanların daha sağlıklı olduğunu ileri sürmüştür (50). Ülkemizde probiyotik üzerine çalışmalar 1991' den itibaren yoğunlaşmaya başlamıştır.

Probiyotiklerin barsak bakteri florasının değiştirilmesinde güvenli bir seçenek olduğuna ilişkin kanıtlar son yıllarda artmaktadır. Probiyotikler, "yeterli miktarlarda tüketildiğinde konakçıya sağlık kazandıran yaşayan mikroorganizmalardır" (51). Probiyotiklerin barsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabete girerek patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri, bakteriyosin olarak da bilinen antimikrobiyal maddeler üretmeleri ve sindirim için gerekli bazı enzimleri salgılayarak sindirime yardımcı olmaları en genel özellikleridir. Ayrıca, doğumsal ve adaptif immün savunma mekanizmalarının ve apoptozisin modülasyonu gibi işlevleri de vardır (52). İBH'nın probiyotiklerle tedavisi konusunda az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır, ancak umut verici sonuçlar bildirilmektedir. Örneğin, Rembacken ve ark., ÜK hastalarında remisyona ulaşma süresi, remisyonda kalma süresi ve relaps oranı açısından patojen olmayan *E. coli* suşu, Nissle 1917 tedavisinin, mesalazin tedavisi ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (53). Ishikawa ve ark. da, Bifidobacterium ile fermente edilmiş süt alan remisyondaki ÜK hastalarında relaps oranının kontrol grubundakinden anlamlı olarak daha az olduğunu saptamışlardır (54). Poşitisli hastalarda kombine probiyotik preparatı VSL#3'ün hastalık nüksünü engellemekte plasebodan üstün olduğu gösterilmiştir (55). Yeni bir çalışmada da üçlü bifidobakter preparatının ÜK'da hastalık alevlenmesini azalttığı bildirilmiştir (56).

2.2.1. Probiyotiklerin İBH'da Etki Mekanizması

Pek az kontrollü çalışma içeren klinik gözlemler, invitro çalışmalar ve hayvan deneyleri, probiyotik bakterilerin İBH'nın tedavisinde potansiyel bir yerinin olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu organizmaların klinik İBH'da ve deneysel modellerde etki mekanizması hala büyük ölçüde bilinmemektedir; değişik mekanizmalar birlikte çalışabilir. En genel anlamda probiyotiklerin barsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabete girerek patojen olma potansiyeli taşıyan mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri ve patojenlere karşı bakteriyosinlerinin etkisi speküle edilebilir. Probiyotiklerin İBH'daki etkinliğini açıklayabilen somut veriler de bulunmaktadır.

Son yıllarda İBH'lı olguların barsak lümeninde bulunan antijenlere, özellikle kommensal bakterilere ve onların ürünlerine karşı agresif bir immün cevabın geliştiğini gösteren birçok kanıt elde edilmiştir. İntestinal inflamasyon ve lezyonların oluşmasında mukozal immün sistemin ve inflamasyonun modülasyonunda sitokinlerin merkezi rolü vardır. Klinikte İBH hastalarından alınan biyopsilerde, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler artarken, IL-4, IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin baskılandığı saptanmıştır. Deneysel olarak *dextran sulfate sodium* (DSS) ile uyarılan kolitin kronikleşmesinde proinflamatuvar sitokinler TNF- α ve IFN- γ 'nın rol aldığı gösterilmiştir (57).

Sitokin paterninin düzeltilmesinin koliti tedavi edici rolü ortaya konmuş, TNF- α antikorları ve IL-10 verilmesinin intestinal inflamasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (58-60). Öte yandan, IL-4 ve IL-10 defektli fareler, steril ortamdan normal (bakteri içeren) ortamlara alındıkları zaman kolit geliştirirler (61, 62) ki bu, bizzat doğal flora bakterilerinin Th-2 yanıtının baskılandığı durumlarda barsak mukozasında inflamasyonu uyarabileceğini göstermektedir.

Probiyotikler barsak mukozası ve sistemik sitokin paternini module ederek İBH'nın iyileşmesine katkıda bulunabilirler. Ancak eldeki çalışmaların sonuçları çelişkiler içermektedir. Probiyotiklerin kolon mukozasında sitokin salınımına olan etkilerine ilişkin çalışma sayısı da azdır.

Steidler ve ark., DSS ile kolit uyarılan IL-10 (-/-) farelerde intragastrik verilen IL-10 sekrete eden *Lactococcus lactis*'in kolit gelişmesini önlediğini bildirmişlerdir (63).

Probiyotik bakterilerin Th-2 yanıtını güçlendirdiğini destekleyen bir klinik çalışma, atopik çocuklarda yapılmış ve oral *Lactobacillus rhamnosus* GG tedavisinin serum IL-10 konsantrasyonunu anlamlı olarak artırdığı saptanmıştır (64). ÜK'lılarda yapılan bir klinik çalışmada da üç bifidobakter suşu içeren probiyotik preparatının TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu azalttığı, IL-10 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (56).

Farklı probiyotiklerin, çeşitli organlarda değişik etkileri olabileceğinin kanıtları da vardır. Tejada-Simon ve ark., periton hücrelerinde *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'nin IL-6 ve IL-12 yapımını potansiyalize ettiğini; buna karşın, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* ve *Bifidobacterium*'un IL-6 ve IFN- γ yapımını azalttığını saptamışlardır (65). Matsuzaki ve ark. da, *Lactobacillus casei shirota* ile beslenen farelerde dalak hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 gibi Th-1 hücre ilişkili sitokinlerin yapımının kontrol grubundakinden daha yüksek olduğunu; buna karşın, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 gibi Th-2 hücre ilişkili sitokinlerin yapımının *Lactobacillus casei shirota* ile beslenenlerde kontrol grubundakinden daha düşük düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (4).

Diğer taraftan, kolitin engellenmesi veya iyileştirilmesinde probiyotiklerin salgıladıkları ürünlerin katkısı olabilir. Bir deneysel kolit modelinde; bakteriyel fermentasyon ürünü olan kısa zincirli yağ asidi butirat'ın lavman şeklinde verilmesi ile kolon inflamasyonunun azaldığı ve elektrolit absorpsiyonunun normalleştiği gösterilmiştir (66).

Probiyotiklerin İBH ve deneysel kolit modellerinde olumlu etkisinin bir başka mekanizması da bakteriyel translokasyonu engellemek veya azaltmak olabilir. Barsağın doğal florası ve mukoza bütünlüğünün korunmuş olması barsak lümenindeki patojen bakterilere karşı organizmanın savunmasında en önemli parametrelerdir. İBH'da bu savunma mekanizmalarının bozulması, bakteriyel translokasyona yol açar ve hastalık şiddetinin artmasına neden olur (67). Deneysel kolit modellerinde; mezenter lenf nodları, karaciğer ve dalakta bakteriyel translokasyonun arttığı gösterilmiştir. Kolon inflamasyonu ve bakteriyel translokasyonun yaygınlığı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (5, 67). Ayrıca sıçanlarda DSS ile uyarılan akut kolit modelinde, bazı laktobasil ve bifidobakter suşlarının hastalık aktivitesini anlamlı olarak iyileştirirken bakteriyel translokasyonu azalttığı gösterilmiştir (5).

Günümüz koruyucu hekimlik konuları arasında yer alan alternatif tıp ve onun konularından biri olan probiyotik gıdalar, bunların içinde ise probiyotik süt ürünleri giderek önemsenmektedir. Başlıca probiyotik niteliklere sahip olan fermente süt ürünü kefirdir. Yapılan çalışmalarda kefirin koruyucu ve tedavi edici özellikleri anlaşıldıkça tüketimi ve popülaritesi de gün geçtikçe artmaktadır.

2.2.2. Kefir

Fermentasyon, gıdaların lezzetini ve aromasını artırmak ve muhafaza edilebilme süresini uzatmak için kullanılan en eski metodlardan biridir. Sütün fermentasyonu, mikroorganizmaların metabolik ve enzimatik faaliyetleri sonucu sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde oluşan modifikasyon olarak tanımlanabilir (68, 69).

Robinson ve Tamime fermentasyon sonucu oluşan fermente süt ürünlerini üç grupta sınıflandırmıştır (70):

- Laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan ürünler (yoğurt)
- Maya-laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan ürünler (kefir ve kıymız)
- Küf-laktik asit fermentasyonu sonucu oluşan ürünler (viili)

Kefir orjinini Kafkasya'dan alan, Moğolistan'dan Doğu Avrupa'ya kadar olan coğrafyada geleneksel olarak tüketilen içeceklerin başında gelmektedir (71).

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özellikleri laktik asit ve alkol fermentasyonlarının birlikte yürümesi ve kefir taneleri şeklinde bulunmasıdır. Bu taneler spesifik bir yapıya sahiptir. Biyolojik olarak canlı organizmalar gibi davranırlar; büyürler, çoğalırlar ve özelliklerini yeni tanelere aktarırlar (72).

Görünüm olarak karnabahar çiçeğinin minyatür şekline benzeyen 5-20mm çapında, düzensiz şekilli, sarımsı-beyaz renkte, kıvrımlı ve pürüzlü yüzeyli, elastik ve yarı sert bir yapıya sahiptir (Şekil 3).



Şekil 3. Kefir tanesi

Kefir taneleri genel olarak; laktik asit oluşturan mezofilik streptokoklar, aroma oluşturan streptokoklar, mezofilik ve termofilik laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden ve edemeyen mayalarla asetik asit bakterilerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Mikroorganizmalar tane içerisinde simbiyoz olarak yaşarlar (72). Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar Tablo 3’de verilmiştir (73).

Tablo 3. Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar

Mikroorganizma Grupları	Mikroorganizma Türleri	Bulunuş Oranları
Laktobasiller	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	<i>L. helveticus</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. casei</i>	10 ⁶ - 10 ⁹ /gr
	<i>L. kefir</i>	
	<i>L. brevis</i>	
	<i>L. buchneri</i>	
Koklar	<i>Streptococcus Lactis</i>	
	<i>Str. lactis subsp. diacetylactis</i>	
	<i>Str. cremoris</i>	10 ⁶ /gr
	<i>Leuconostoc kefir</i>	
	<i>L. mesenteroides</i>	
Asetik asit bakterileri	<i>Acetobacter aceti</i>	10 ³ - 10 ⁴ /gr
Mayalar	<i>Candida kefir</i>	
	<i>C. pseudotropicalis</i>	
	<i>C. valida</i>	
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	
	<i>K. lactis</i>	10 ⁶ - 10 ⁸ /gr
	<i>K. bulgaricus</i>	
	<i>Saccharomyces unisporus</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>Candida tenuis</i>	

Kefirin yapısındaki mikroflora stabildir. Uygun kültür ve fizyolojik koşullarda inkübe edilirse mikrobiyolojik özelliklerini uzun süre koruyabilirler. Kurutulmuş taneler 12-18 aya kadar mikrobiyolojik aktivitelerini sürdürebilir. Dondurulmuş tanecikler -20

⁰C'de saklanırsa 7-8 ay aktivitelerini devam ettirebilir. Bununla birlikte +4 ⁰C'de ise 10 günden sonra aktivitelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (74).

Kefir probiyotik özelliğine ilave olarak birçok esansiyel aminoasit ve mineralleri de ihtiva eder. Sütün fermentasyonu yoluyla elde edilmesi sebebiyle sütün yapısında bulunan karbohidrat, protein ve yağ içeriği nedeniyle de besleyici özelliğe sahiptir. Kefirin yapısındaki tüm proteinler tamamen sindirilir, bu nedenle vücutta kolaylıkla kullanılabilme özelliğine sahiptir. Triptofan kefirde bol miktarda bulunan esansiyel aminoasitlerden biridir. Kalsiyum, magnezyum ve fosfor gibi vücut için gerekli olan mineralleri yüksek miktarlarda içermektedir. Ayrıca Biotin, B1, B12 ve K vitamini bakımından da zengindir (75).

2.2.3. Kefirin Kullanıldığı Çalışmalar

İnsan ve hayvan kaynaklı sütte bol miktarda bulunan laktoz; fermentasyon prosesinde ana substrattır. Fermentasyon sonucunda laktoz %75 oranında azalmaktadır. Bu nedenle laktoz intoleransı ve galatozemi olan kişiler kefirini rahatlıkla tüketebilmektedir (76).

Kefiran; kefir tanelerindeki matriksin ana komponentidir. Polisakkarit yapıdadır, glukoz ve galaktoz rezidülerinden oluşan heksasakkarit ünitelerinin tekrarlamasıyla meydana gelir. Kefiranın kolesterol düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Maeda ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 30 gün boyunca 100-300mg/kg/gün kefiran verilen ratlarda serum kolesterol, trigliserit ve serbest yağ asiti seviyelerinde azalma ve yüksek olan kan basıncında anlamlı düşme sağlandığı bildirilmiştir (77).

Yine Maeda ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada kefiran verilen ratlarda artmış kan basıncını anlamlı ölçüde azaltmasının yanı sıra, serum glukozu ve kolesterol seviyelerinde anlamlı düşüş sağlandığı ve gastrointestinal sistemdeki peristaltik hareketleri artırarak konstipasyonu tedavi edici özelliği olduğu bildirilmiştir (78).

Liu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada kefirin; serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde, antioksidatif enzim aktivitelerinin artırılmasında, lipid peroksidasyonunun ve demir iyonlarının şelasyonunun inhibe edilmesinde etkili olduğu,

bu sayede de kefirin anlamlı antitumör ve antioksidan etkisi olduğu bildirilmiştir (79).

Kefirin immunomodülasyon, antineoplastik etki, patojenik mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturma ve ayrıca pek çok bakteri ve mantara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir. Kefir tarafından oluşturulan patojen bariyerinin; *Enterohemorajik Escherichia coli* (80), *Helicobacter pylori* (81) ve *Staphylococcus aureus*'a (82) karşı koruyucu etki sağladığı belirlenmiştir.

Kefirin mürin modelinde Th-2 sitokinleriyle kontrol edilen Th-1 cevabını doza bağımlı şekilde indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada kefir mikroflorasıyla fermente edilen sütte elde edilen ürünün, fare ince barsak epitel hücrelerinde IL-6 sekresyonunu up-regüle ettiği, kalın ve ince barsak lamina propriasında IgA hücre sayısını ve IL-4, IL-10 ve IL-6 hücre sayılarını artırdığı tespit edilmiştir (83).

Son yıllarda gastrointestinal florada mantarların yoğunluğu ilginç bir şekilde artmıştır. Brzozowski ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; *2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid* (TNBS) ile indüklenen deneysel kolit modelinde kolondaki mikrobiyal kolonizasyonun inflamatuvar değişiklikler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TNBS'nin rektal yolla verilmesinden sonraki 3. günde inflame kolondan izole edilen segmentlerin ağırlığında artma, kolon dokusundaki kan akımında azalma, plazma MPO aktivitesinde normale göre 4-5 kat artış olduğu saptanmıştır. Aynı ratların kolonuna *Candida* solüsyonları inoküle edildiğinde ise, TNBS tarafından indüklenen kolonik ülserlerin iyileşmesinde gecikme olduğu görülmüştür. Bu durumun IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin artışı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ardından antifungal bir ajan olan Flukonazol ve probiyotik (*Lacidofil*) tedavisi verilmiş ve kolondaki inflamatuvar yanıt tekrar değerlendirilmiştir. Tedavi verilen grupta sadece *Candida* solüsyonları inoküle edilenlere göre ülserasyon bölgelerinde küçülme sağlandığı görülmüştür (3). Bizim çalışmamızda ise TNBS ile indüklenen deneysel kolit modelinde kefirin tüm bu inflamatuvar parametreler üzerine olası etkileri araştırılacaktır.

2.2.4. Trinitrobenzene Sulphonic Acid (TNBS) Kolit Modeli

İBH etiyopatogenezini ve yeni antiinflamatuvar stratejileri geliştirmek amacıyla en sık kullanılan kolit modeli, TNBS ile kolit oluşturulma yöntemidir. TNBS etanol çözeltisi içinde verilir, çünkü etanol epitel tabakasını yararak alttaki lamina

proprianın baktriyel komponentlere maruz kalmasını sağlar. Burada kolonik hasar, bariyer kırıcı (*barrier-breaker*) etanol ve haptin karışımının intrarektal (ir) verilmesi ile oluşturulur. Uygulamada kolit oluşturmak için TNBS'nin (%30 etanolün 0,25 ml'sinde 5-30 mg TNBS olacak şekilde) ir verilmesi gereklidir. TNBS ile oluşturulan kolit modeli genel olarak CH'yı yansıtır. Çünkü oluşan mukozal inflamasyon proinflamatuvar sitokinlerin üretimine cevap olarak ortaya çıkar. Doz bağımlı kronik ülserasyon ve inflamasyona neden olur. 30 mg TNBS'nin uygulanması ülserasyon indüksiyonuna ve en az 8 hafta sürecek barsak duvar kalınlaşmasına yol açar. Histolojik inflamatuvar yanıt mukozal ve submukozal PMNL'leri, makrofajları, lenfositleri, bağ doku mast hücrelerini ve fibroblastları içerir. Yapılan çalışmalarda inflamasyon indüksiyonundan 3 hafta sonra öldürülen ratların %57'sinde granülomlar, langhans tipi dev hücreler, segmental ülserasyon ve inflamasyon olduğu bildirilmiştir (84-87).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında 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, 200-250 gr ağırlığında 54 adet erkek Wistar-albino rat kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (22-24 °C) bulunduruldu ve standart rat yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

Her bir ratın yediği yem ve içtiği sıvı miktarının belirlenmesi için ratlar tekli kafeslere konuldu. Ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma boyunca her gün ratların ağırlıkları kaydedildi.

3.1.2. Kefirin Hazırlanması

Kefir için %3 yağ içeren pastörize süt kullanıldı. Sütün ısısı 25 °C olacak şekilde ısıtıldı ve içine hazır starter kefir kültüründen %3 oranında eklenerek kavanozların ağızları kapatıldı. Daha sonra otoklavda 37 °C'de 12 saat süreyle inkübe edildi. Elde edilen ürün plastik kaba konuldu ve +4 °C'de saklandı. Kefir çalışma süresince günlük olarak hazırlandı.

3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Tablo 4. 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	Kefir kültürü	(Danisca Biolacta - 05223B 10001, Polonya)
10	Otoklav	(Nüve EN 500, Türkiye)
11	TNBS	(Sigma - P2297, Amerika Birleşik Devletleri)
12	MPO	(İmmundiagnostik AG - K6631-070216, Almanya)
13	TNF- α	(BioSource - R121211A, Amerika Birleşik Devletleri)
14	IL-1 β	(Beckman Coulter - IM3582, Fransa)
15	IL-10	(BioSource - R121212C, Amerika Birleşik Devletleri)
16	MDA	(BioSource - KRC0101, Amerika Birleşik Devletleri)

3.2. Metod

3.2.1. Ratların Beslenme Modeli

Ratların beslenmesinde standart rat yemi kullanıldı. İçme suyu olarak çeşme suyu veya %10'luk ve %30'luk konsantrasyonlarda kefir içeren *phosphate-buffered saline* (PBS) verildi. Kefir dilüsyonları, PBS solüsyonunda yapıldı ve kefirin etkinliğinin bozulmaması açısından 12 saatte bir değiştirildi. Tüm grupların içtikleri çeşme suyu ve kefir miktarı 12 saat arayla kontrol edilerek kaydedildi. Ayrıca tükettikleri rat yemleri de günlük olarak kaydedildi. Çalışmanın 6. günü (kolit indüksiyonundan 24 saat önce) ratlara yem verilmedi fakat sıvı alımları açısından bir kısıtlama yapılmadı. Kolit indüksiyonu yapıldıktan sonra tekrar yem vermeye başlandı.

3.2.2. Kolit İndüksiyonu

Kolit, Morris ve ark.'nın tarif ettikleri şekilde uyarılmıştır. Kısaca prosedür şöyledir:

24 saattir aç olan ratlara, intraperitoneal (ip) ketamin (80 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında, eksternal çapı 2 mm olan poliüretan beslenme tüpü anüslerinden sokularak, ucu anal verge'den 8 cm proksimalde olacak şekilde ilerletildi. Akut koliti uyarmak için %50 etanol'de çözündürülen TNBS rat başına 0.25 ml volüm içinde 15 mg olacak şekilde kanülden kolon içine instile edildi. Daha sonra, 0.5 ml hava enjekte edilerek TNBS-etanol solüsyonunun kanülden tamamen temizlenmesi sağlandı. İnstilasyondan sonra, kolon içindeki instilatın dışarı kaçmasını engellemek için hayvanlar birkaç dakika başaşağı tutuldu (87).

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Ratlar, aşağıda ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi 3 grup 8'erli, 3 grupta 10'arlı olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. 7 gün boyunca çeşme suyu veya kefirle ön tedavi verildi

1. *Grup (Normal-Kontrol, n=8):*

- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar çeşme suyu ile beslendi;
- 7. gün ir serum fizyolojik (SF) enjekte edildi;
- 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.

2. *Grup (%10Kefir-Kontrol, n=8):*

- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar 1/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi;
- 7. gün ir SF enjekte edildi;
- 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.

3. *Grup (%30Kefir-Kontrol, n=8):*

- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar 3/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi;

- 7. gün ir SF enjekte edildi;
 - 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.
4. *Grup (Kolit-Kontrol, n=10):*
- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar çeşme suyu ile beslendi;
 - 7. gün ir TNBS verilerek kolit indüklendi.
 - 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.
5. *Grup (%10Kefir-Kolit, n=10):*
- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar 1/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi;
 - 7. gün ir TNBS verilerek kolit indüklendi.
 - 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.
6. *Grup (%30Kefir-Kolit, n=10):*
- 14 gün standart rat yemi ve gereksinim duydukları kadar 3/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi;
 - 7. gün ir TNBS verilerek kolit indüklendi.
 - 14. gün hayvanlar öldürülerek kolon doku örnekleri alındı.

Tablo 5. Deney protokolü, günlere göre ilaç uygulamaları

GRUPLAR	1–7. Günler	7. Gün	7–14. Günler	14. Gün
1. Grup (Normal-Kontrol)	Çeşme suyu	Çeşme suyu SF (ir)	Çeşme suyu	EX
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	%10 Kefir	%10 Kefir SF (ir)	%10 Kefir	EX
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	%30 Kefir	%30 Kefir SF (ir)	%30 Kefir	EX
4. Grup (Kolit-Kontrol)	Çeşme suyu	Çeşme suyu TNBS (ir)	Çeşme suyu	EX
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	%10 Kefir	%10 Kefir TNBS (ir)	%10 Kefir	EX
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	%30 Kefir	%30 Kefir TNBS (ir)	%30 Kefir	EX

3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması

Kolit indüksiyonu veya ir SF uygulamasının 8. günü (14. gün) ip ketamin (80 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ile anesteziye edilen ratların:

- Önce ağırlıkları tartıldı.
- Ratların mid-line insizyonla batınları açılarak kolonları çıkarıldı.
- Kolon longitudinal olarak açıldı. Kolon SF ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu.
- Tüm kolonun ağırlığı ölçüldü.
- Kolondaki lezyonların makroskopik değerlendirmesi yapıldı.
- Kolonun distal 10 cm'lik bölümü ayrıldı.
- Distal 10 cm'lik bölüm, longitudinal olarak tümüyle ikiye ayrıldı. Kolonun sol laterali histolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde, sağ laterali biyokimyasal incelemelerde kullanıldı.

3.2.5. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi

Kolit değerlendirme, hayvana uygulanan tedavilerden habersiz bağımsız bir gözlemci tarafından, kör olarak yapıldı. Makroskopik inflamasyon skorları, kolonun klinik görünümüne göre şöyle skorlandı (88-90):

Tablo 6. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi (Wallace Skalası)

Özellik	Skor
Ülserasyon	
Normal görünüm	0
Fokal hiperemi var, ülser yok	1
Ülserasyon var, hiperemi veya barsak duvarı kalınlaşması yok	2
Ülserasyon var, birlikte bir yerde inflamasyon var	3
2 veya daha fazla yerde ülserasyon/inflamasyon var	4
Kolon eksenı boyunca 1-2 cm arasında uzunlukta ülser var	5
Ülser uzunluğu, 2-3 cm arasında	6
Ülser uzunluğu, 3-4 cm arasında	7
Ülser uzunluğu, 4-5 cm arasında	8
Ülser uzunluğu, 5-6 cm arasında	9
Ülser uzunluğu, 6-7 cm arasında	10
Adezyon	
Adezyon yok	0
Minör adezyonlar (diğer dokulardan kolayca ayrılabilen)	1
Şiddetli adezyonlar	2
Diyare (lümendeki feçes gözlenerek)	
Yok	0
Var	1
Maksimal barsak duvarı kalınlığı (her 1 mm yukarıdaki skora eklenecek)	...mm

3.2.6. Histolojik Değerlendirme

Sakrifiye edilen ratlardan alınan kolon örnekleri %10'luk formaldehit kullanılarak fikse edildi. Parafin bloklar oluşturuldu. Oluşturulan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400 büyütmede) değerlendirme yapılarak lezyonlar skorlandı (57).

Tablo 7. Mikroskopik Kolit Değerlendirmesi

Özellik	Skor
<i>Epitel</i>	
Normal morfoloji	0
Goblet hücrelerinde kayıp	1
Geniş alanlarda goblet hücre kaybı	2
Kript kaybı	3
Geniş alanlarda kript kaybı	4
<i>İnfiltrasyon</i>	
İnfiltrasyon yok	0
Kriptler çevresinde infiltrasyon	1
Lamina muskularis mukozaya ulaşan infiltrasyon	2
Lamina muskularis mukozaya ulaşan ağır infiltrasyon ve mukozanın aşırı ödemle kalınlaşması	3
Lamina submukozanın infiltrasyonu	4

Total histolojik skor, epitel ve infiltrasyon skorlarının toplanmasıyla bulundu.

3.2.7. Örneklerin 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. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe konuldu. Dokuların üzerine ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Daha sonra buz dolu plastik kaplar içinde 30 saniye sonifikasyon yapıldı. Homojenatlar; ısısı artırılmadan, 5000 devir/dakika hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantları ependorf tüplerine konuldu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi (91).

3.2.8. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler Süleyman Demirel Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Kolon dokusunda;

- MPO
- TNF- α
- IL-1 β
- IL-10 düzeyleri ELİSA ile ölçüldü.
- MDA düzeyi HPLC yöntemi ile ölçüldü.
- Homojenat protein tayini Lowry metodu ile yapıldı (92).

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 11.0 istatistik programında yapıldı. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma, gruplar arası farklılaşmanın öneminin tespiti için Tek Yönlü ANOVA testi kullanıldı. Varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa Post Hoc Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Deney grupları arasındaki histopatolojik skorların farklılığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney u testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ratların Gruplara Göre Sulu ve Kanlı Dışkılama Oranları

Çalışmanın ilk 6 günü yapılan takiplerde ratlarda normal görünümde dışkılama olduğu izlendi. 7. gün kolit indüksiyonu yapıldı ve kolit gruplarında 7. günden itibaren sulu ve kanlı dışkılama görülmeye başlandı. En hafif kolit bulguları %10Kefir-Kolit grubunda izlenirken, en şiddetli kolit bulgularının Kolit-Kontrol ve %30Kefir-Kolit grubunda olduğu görüldü. Ratların gruplara göre sulu ve kanlı dışkılama oranları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Ratların gruplara göre sulu ve kanlı dışkılama oranları

Gün	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup	6. Grup
	Normal Kontrol n=8	%10Kefir Kontrol n=8	%30Kefir Kontrol n=8	Kolit Kontrol n=10	%10Kefir Kolit n=10	%30Kefir Kolit n=10
	sulu / kanlı	sulu / kanlı	sulu / kanlı	sulu / kanlı	sulu / kanlı	sulu / kanlı
1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
4	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
5	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
6	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
7	0 / 0	0 / 0	0 / 0	4 / 8	2 / 5	7 / 9
8	0 / 0	0 / 0	0 / 0	9 / 0	2 / 5	7 / 7
9	0 / 0	0 / 0	0 / 0	7 / 0	3 / 2	7 / 0
10	0 / 0	0 / 0	0 / 0	6 / 0	3 / 1	5 / 0
11	0 / 0	0 / 0	0 / 0	5 / 0	3 / 0	6 / 0
12	0 / 0	0 / 0	0 / 0	4 / 0	2 / 0	5 / 0
13	0 / 0	0 / 0	0 / 0	5 / 0	1 / 0	5 / 0

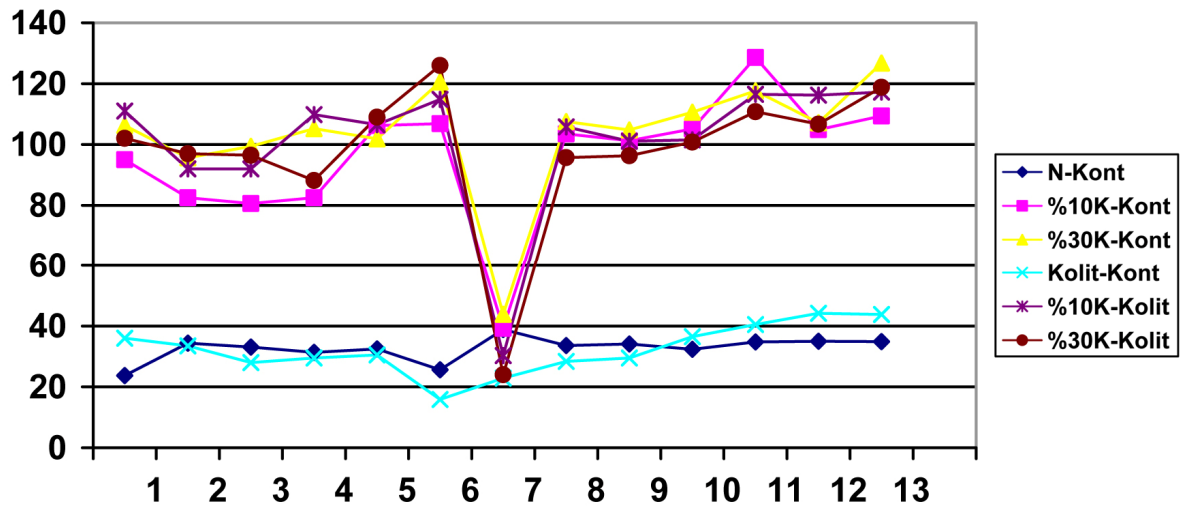
4.2. Ratların Gruplara Göre Günlük Tükettikleri Sıvı Miktarları

Genel itibarı ile çeşme suyu alan Normal-Kontrol ve Kolit-Kontrol grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında sıvı tüketimi açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. Kefir içeren PBS alan gruplar da kendi aralarında karşılaştırıldığında, çalışmanın ilk 4 gününde %10Kefir-Kontrol grubunda diğer kefir gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı decede düşük saptandı, diğer günlerde ise farklılık gözlenmedi. Kolit indüksiyonu yapıldığı gün (7. gün), diğer günlerle karşılaştırıldığında tüm gruplarda tüketilen sıvı miktarında anlamlı derecede düşme olduğu gözlemlendi. Çeşme suyu ve kefir içeren PBS alan gruplar karşılaştırıldığında ise kefir içeren PBS tüketiminin çeşme

suyuna göre 3-4 kat daha yüksek olduğu görüldü. Ratların gruplara göre tükettikleri günlük sıvı miktarları Tablo 9’da, grafik olarak Şekil 4’de gösterilmiştir.

Tablo 9. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri sıvı miktarları

Gün	1. Grup Normal Kontrol (ml)	2. Grup %10Kefir Kontrol (ml)	3. Grup %30Kefir Kontrol (ml)	4. Grup Kolit Kontrol (ml)	5. Grup %10Kefir Kolit (ml)	6. Grup %30Kefir Kolit (ml)
1	23,75±2,9	95,00±2,9	106,25±3,6	36,00±2,2	111,00±2,9	102,00±4,7
2	34,37±1,7	82,50±3,2	95,62±2,3	33,50±3,1	92,00±2,0	97,00±3,5
3	33,12±2,9	80,62±1,7	99,37±4,1	28,00±1,5	92,00±3,1	96,50±3,5
4	31,37±1,1	82,50±4,2	105,25±2,8	29,50±0,8	109,80±1,7	88,20±6,1
5	32,50±0,9	106,25±4,0	101,87±5,2	30,50±0,8	106,50±2,5	109,00±3,2
6	25,62±2,9	106,87±7,0	120,62±5,4	15,90±2,1	114,80±5,7	126,00±5,5
7	38,87±1,6	39,25±3,9	43,87±3,9	22,90±2,1	30,30±3,3	24,00±3,2
8	33,62±1,3	103,50±3,6	107,50±9,6	28,40±1,4	105,80±2,7	95,70±5,1
9	34,12±1,2	101,25±3,6	104,75±11,3	29,50±3,3	101,10±2,9	96,30±5,3
10	32,37±0,9	105,12±4,1	110,62±11,7	36,50±1,2	101,50±2,4	100,80±4,6
11	34,75±1,3	128,62±5,9	117,62±8,3	40,50±1,5	116,50±7,3	110,80±4,8
12	35,00±1,1	104,87±2,8	107,12±7,0	44,20±2,1	116,20±2,8	106,70±4,8
13	34,87±1,2	109,37±3,1	126,75±6,4	43,80±2,4	117,20±2,4	118,80±4,4



Şekil 4. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri sıvı miktarları

4.3. Ratların Gruplara Göre Günlük Tükettikleri Yem Miktarları

Çalışmanın ilk 5 gününde tüketilen günlük yem miktarı bakımından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Çalışmanın 6. gününde ratlara yem verilmedi (kolit indüksiyonu öncesi). Çalışmanın 7. gününden itibaren gruplar arasında günlük yem tüketimi bakımından anlamlı farklılık gözlenmeye başladı.

7. günde Kolit-Kontrol, %10Kefir-Kolit ve %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubu için $p<0,001$, %30Kefir-Kontrol grubu için sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$, $p<0,001$).

8. günde Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre $p<0,001$, %10Kefir-Kolit grubuna göre $p<0,01$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre $p<0,001$, %30Kefir-Kontrol grubuna göre $p<0,05$, %10Kefir-Kolit grubuna göre $p<0,01$).

9. günde Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol grubuna göre $p<0,001$, %10Kefir-Kontrol grubuna göre $p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol grubuna göre $p<0,001$, %10Kefir-Kontrol grubuna göre $p<0,01$, %10Kefir-Kolit grubuna göre $p<0,05$).

10. günde %30Kefir-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,01$).

11. günde %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,05$).

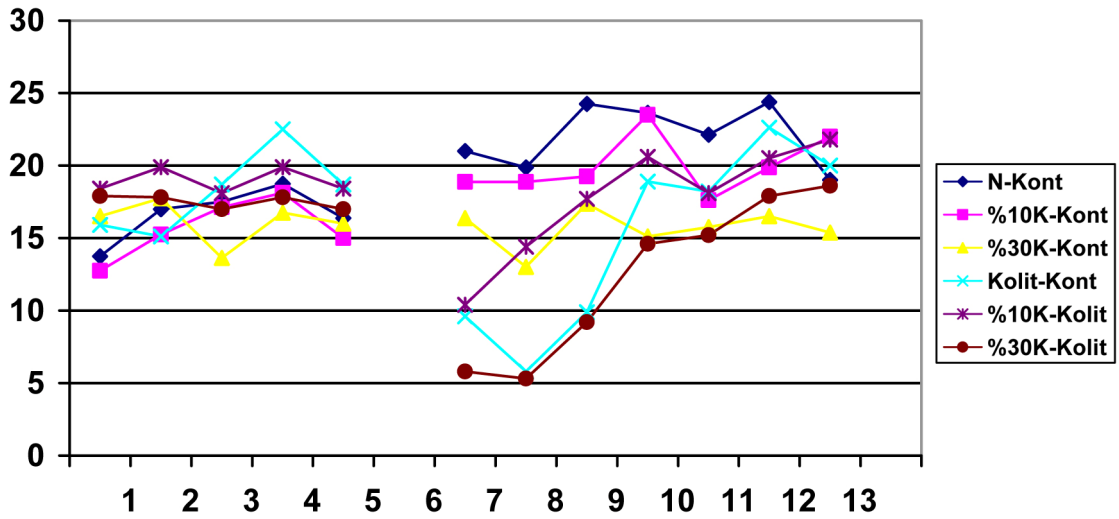
12. günde %30Kefir-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol ve Kolit-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol grubuna göre $p<0,001$,

Kolit-Kontrol grubuna göre $p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,01$).

13. günde %30Kefir-Kontrol grubunda, %10Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,01$). Ratların tükettikleri günlük yem miktarları Tablo 10'da, grafik olarak Şekil 5'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri yem miktarları

Gün	1. Grup Normal Kontrol (gr)	2. Grup %10Kefir Kontrol (gr)	3. Grup %30Kefir Kontrol (gr)	4. Grup Kolit Kontrol (gr)	5. Grup %10Kefir Kolit (gr)	6. Grup %30Kefir Kolit (gr)
1	13,75±1,3	12,75±1,0	16,50±1,8	15,9±0,9	18,40±0,7	17,90±1,0
2	17,00±0,9	15,25±1,3	17,75±2,7	15,10±1,2	19,90±0,6	17,80±1,1
3	17,50±0,9	17,12±1,1	13,62±1,8	18,70±0,6	18,10±1,3	17,00±1,0
4	18,75±1,2	18,12±1,2	16,75±1,7	22,50±0,9	19,90±0,6	17,80±1,1
5	16,37±1,2	15,00±1,3	16,00±2,1	18,70±0,6	18,40±0,7	17,00±1,0
6						
7	21,00±0,7	18,87±1,1	16,37±1,9	9,60±1,5	10,40±1,4	5,80±0,9
8	19,87±1,0	18,87±0,8	13,00±2,9	5,80±1,7	14,40±1,7	5,30±1,6
9	24,25±0,7	19,25±1,3	17,37±2,9	9,90±1,8	17,70±2,2	9,20±1,8
10	23,62±0,4	23,50±0,9	15,12±2,5	18,90±1,1	20,60±1,8	14,60±1,9
11	22,12±1,1	17,62±1,1	15,75±2,6	18,20±1,0	18,10±1,3	15,20±1,0
12	24,37±0,8	19,87±0,8	16,50±2,5	22,60±0,6	20,50±0,9	17,90±1,0
13	19,00±0,6	22,00±0,7	15,37±2,3	20,00±0,8	21,80±0,7	18,60±0,8



Şekil 5. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri yem miktarları

4.4. Ratların Gruplara Göre Günlük Ağırlık Değişiklikleri

Ratların çalışma boyunca günlük olarak ağırlıkları ölçüldü. Çalışmanın 7. gününe kadar ratların ağırlık değişimleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

7. günde Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (p:0,001).

8. ve 9. günlerde Kolit-Kontrol ve %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (Normal-Kontrol grubu için sırasıyla p<0,01, p<0,05).

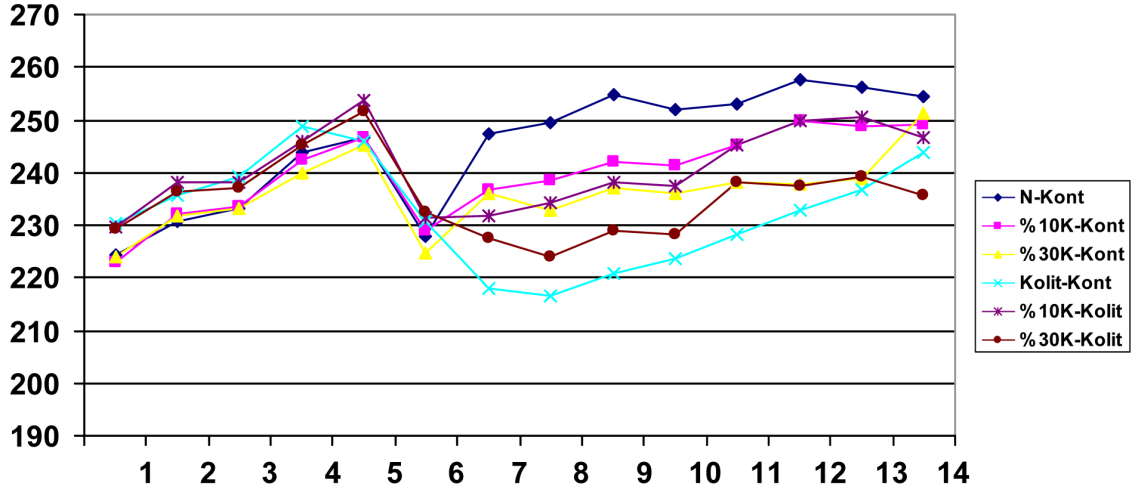
10. günde Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (p<0,05).

11-14. günlerde ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Ratların günlük ağırlıkları Tablo 11'de, grafik olarak Şekil 6'da gösterilmiştir.

Tablo 11. Ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri

Gün	1. Grup Normal Kontrol (gr)	2. Grup %10Kefir Kontrol (gr)	3. Grup %30Kefir Kontrol (gr)	4. Grup Kolit Kontrol (gr)	5. Grup %10Kefir Kolit (gr)	6. Grup %30Kefir Kolit (gr)
1	224,25±6,9	223,00±4,8	224,00±4,3	230,30±4,4	229,50±3,9	229,40±3,9
2	230,62±7,6	232,12±5,9	231,62±4,1	235,50±5,4	238,00±4,8	236,40±4,3
3	233,12±7,9	233,37±7,1	233,12±4,2	239,20±4,9	238,30±4,5	237,10±3,8
4	243,87±8,8	242,25±7,0	239,75±4,3	248,60±4,2	245,80±4,5	245,30±4,0
5	246,75±7,6	246,62±6,6	245,12±5,1	245,90±4,6	253,80±4,3	251,50±4,9
6	227,75±4,0	228,87±5,3	224,75±4,7	230,60±4,7	231,30±4,2	232,40±4,1
7	247,25±4,2 ¹	236,87±5,7	235,87±5,3	217,90±4,9	231,70±4,4	227,60±4,0
8	249,62±4,6	238,62±6,1	233,00±6,7	216,40±5,3	234,40±4,8	223,90±5,8
9	254,75±4,5	242,12±6,2	237,12±6,7	220,80±5,3	238,10±5,0	228,90±5,8
10	252,12±4,0 ⁴	241,37±5,3	236,12±7,9	223,80±4,5	237,60±5,7	228,30±6,1
11	252,87±5,0	245,25±6,2	238,00±8,4	228,40±4,6	245,30±5,3	238,10±6,5
12	257,50±4,9	249,87±6,2	237,75±9,7	232,70±4,7	250,00±5,7	237,60±6,8
13	256,25±4,9	248,75±6,5	239,00±11	236,90±4,8	250,60±5,3	239,20±6,1
14	254,37±5,1	249,25±6,0	251,25±7,5	234,80±4,6	246,70±6,2	235,70±6,1

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 6. Ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri

4.5. Lezyonların Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirmesi

Çıkarılan kolonların boy, ağırlık ve duvar kalınlığı ölçümleri, makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeleri rat gruplarından habersiz gözlemciler tarafından yapıldı.

Kolon Ağırlığı:

Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,01$).

Kolon Boyu:

%30Kefir-Kolit grubunda, %10Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,05$).

Kolonda Ağırlık/Boy Oranı:

Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$, %10Kefir-Kolit grubu için $p<0,05$).

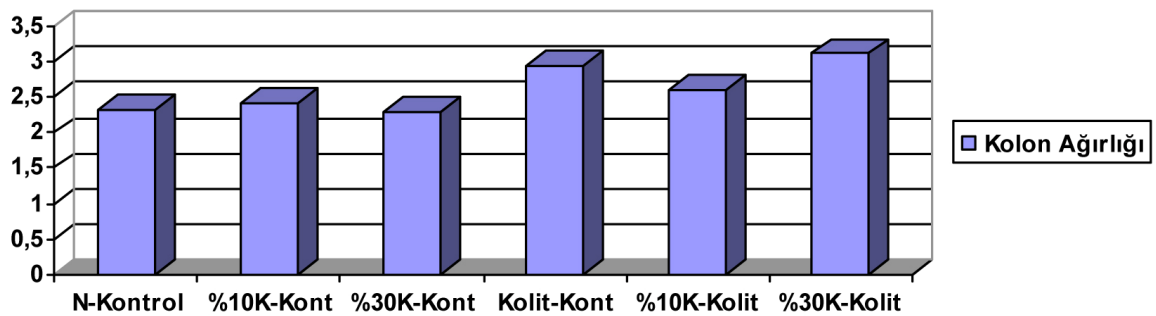
Kolon Duvar Kalınlığı:

%30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). Deney gruplarına göre kolonun ağırlık, boy ve duvar kalınlığı ölçümleri sonucu elde edilen veriler Tablo 12’de, grafik olarak Şekil 7, 8, 9, 10’da gösterilmiştir.

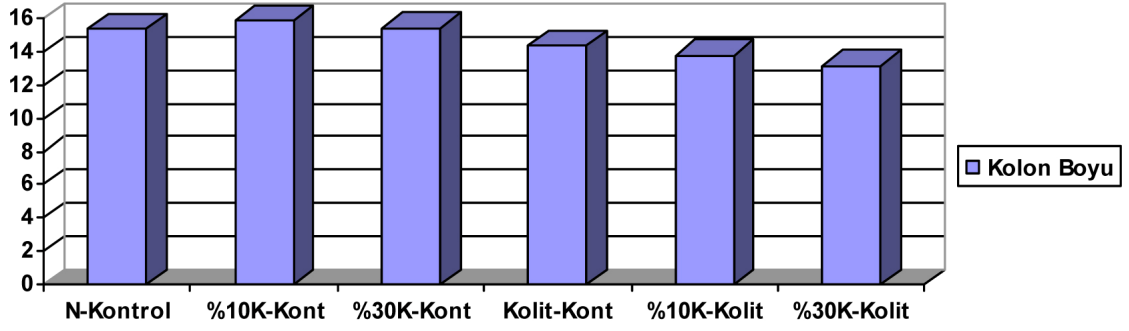
Tablo 12. Kolonun ağırlık, boy ve duvar kalınlığı ölçümleri sonucu elde edilen veriler

Gruplar	Kolon Ağırlığı (gr)	Kolon Boyu (cm)	Ağırlık / Boy Oranı	Duvar Kalınlığı (cm)
1. Grup (Normal-Kontrol)	2,32 ± 0,05	15,43 ± 0,61	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,00
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	2,42 ± 0,12	15,90 ± 0,55	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,00
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	2,29 ± 0,12	15,46 ± 0,91	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01
4. Grup (Kolit-Kontrol)	2,95 ± 0,18	14,42 ± 0,49	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,04
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	2,61 ± 0,08	13,80 ± 0,49	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02
6. Grup (%30Kefir- Kolit)	3,11 ± 0,20	13,19 ± 0,44	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,06
P (ANOVA)	<0,001	0,01	<0,001	<0,01
P (Post hoc Tukey test)	4-1,3: <0,05 6-1,3: <0,01 6-1: <0,01	6-2: <0,05	4-1,2,3: <0,05 6-1,2,3: <0,001 6-5: <0,05	6-1,2,3: <0,05

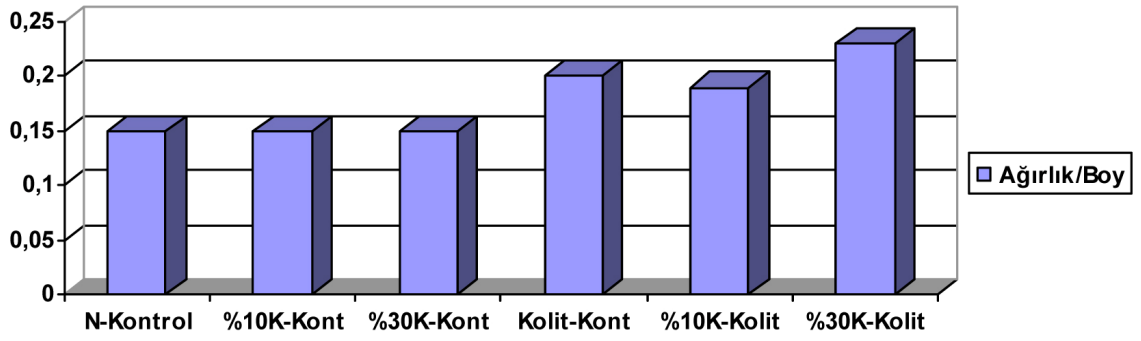
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



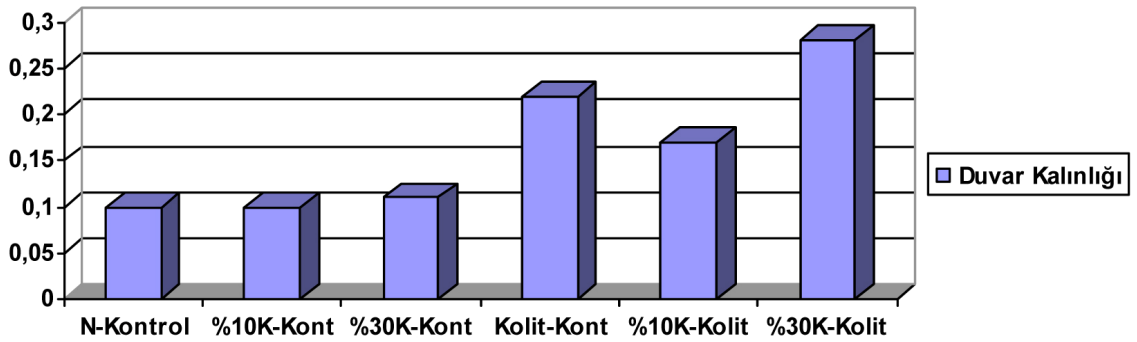
Şekil 7. Ratların gruplara göre kolon ağırlıkları



Şekil 8. Ratların gruplara göre kolon boyları



Şekil 9. Ratların gruplara göre kolon ağırlık/boy oranları



Şekil 10. Ratların gruplara göre kolon duvar kalınlıkları

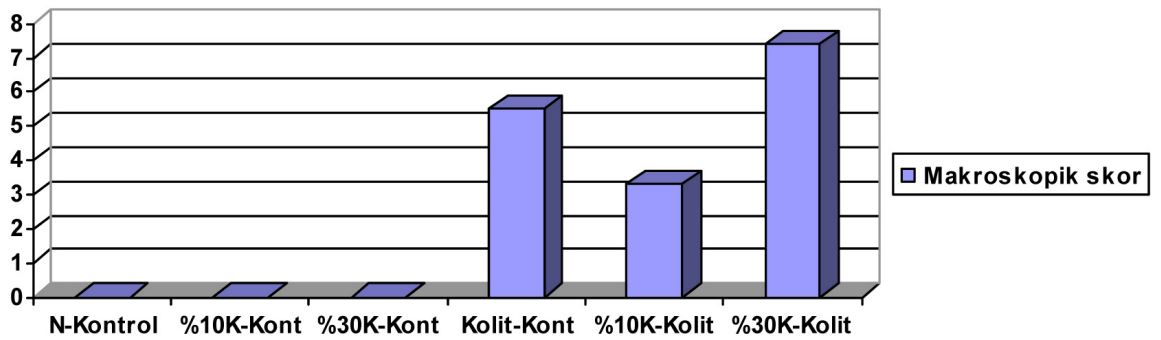
Makroskopik Kolit Skorlaması:

Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,01$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol, %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$, %10Kefir-Kolit grubuna göre $p<0,05$). Ratların gruplara göre makroskopik kolit skorlaması Tablo 13’de, grafik olarak Şekil 11’de gösterilmektedir.

Tablo 13. Ratların gruplara göre makroskopik kolit skorlaması

Gruplar	Makroskopik Skor Median (min-max)
1. Grup (Normal-Kontrol)	0,0 (0-0)
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	0,0 (0-0)
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	0,0 (0-0)
4. Grup (Kolit-Kontrol)	5,5 (2-11)
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	3,3 (1-7)
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	7,4 (2-14)
P (ANOVA)	<0,001
P (Post hoc Tukey test)	4-1,2,3: <0,01 6-1,2,3: <0,001 6-5: <0,05

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.



Şekil 11. Ratların gruplara göre makroskopik kolit skorlaması

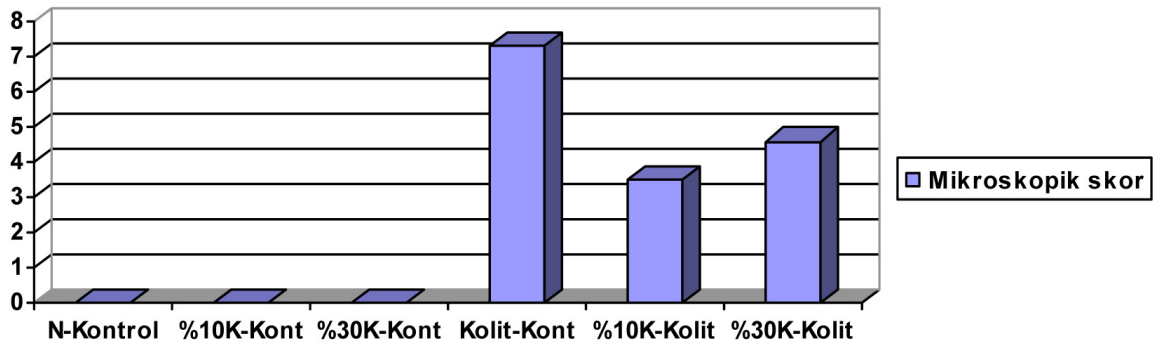
Mikroskopik Kolit Skorlaması:

Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol ve %10Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$, %10Kefir-Kolit grubuna göre $p<0,05$). %10Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,01$). Ratların gruplara göre mikroskopik kolit skorlaması Tablo 14’de, grafik olarak Şekil 12’de gösterilmiştir.

Tablo 14. Ratların gruplara göre mikroskopik kolit skorlaması

Gruplar	Mikroskopik Skor Median (min-max)
1. Grup (Normal-Kontrol)	0,0 (0-0)
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	0,0 (0-0)
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	0,0 (0-0)
4. Grup (Kolit-Kontrol)	7,3 (5-8)
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	3,5 (0-8)
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	4,6 (0-8)
P (ANOVA)	<0,001
P (Post hoc Tukey test)	4-1,2,3: <0,001 4-5: <0,05 5-1,2,3: <0,05 6-1,2,3: <0,01

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.



Şekil 12. Ratların gruplara göre mikroskopik kolit skorlaması

4.6. Biyokimyasal Analiz Sonucu Elde Edilen Veriler

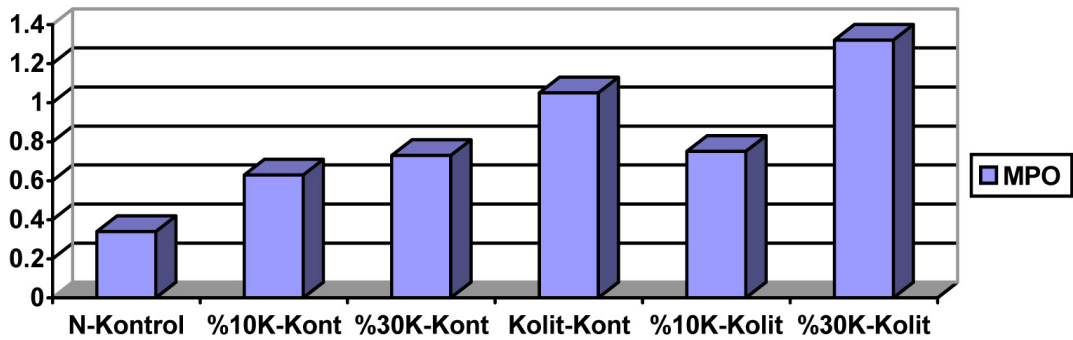
4.6.1. Kolon Dokusunda MPO Aktivitesi

Kolit-Kontrol grubunda, Normal Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol ve %10Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p:0,001$, $p<0,05$). Deney gruplarına göre MPO aktiviteleri Tablo 15’de, grafik olarak Şekil 13’de gösterilmiştir.

Tablo 15. Deney gruplarına göre MPO aktiviteleri

Gruplar	MPO (ng/mg protein)
1. Grup (Normal-Kontrol)	0,34 ± 0,04
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	0,63 ± 0,10
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	0,73 ± 0,15
4. Grup (Kolit-Kontrol)	1,05 ± 0,18
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	0,75 ± 0,16
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	1,32 ± 0,17
P (ANOVA)	0,001
P (Post hoc Tukey test)	4-1: <0,05 6-1: 0,001 6-2: <0,05

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 13. Kolon dokusunda MPO aktiviteleri

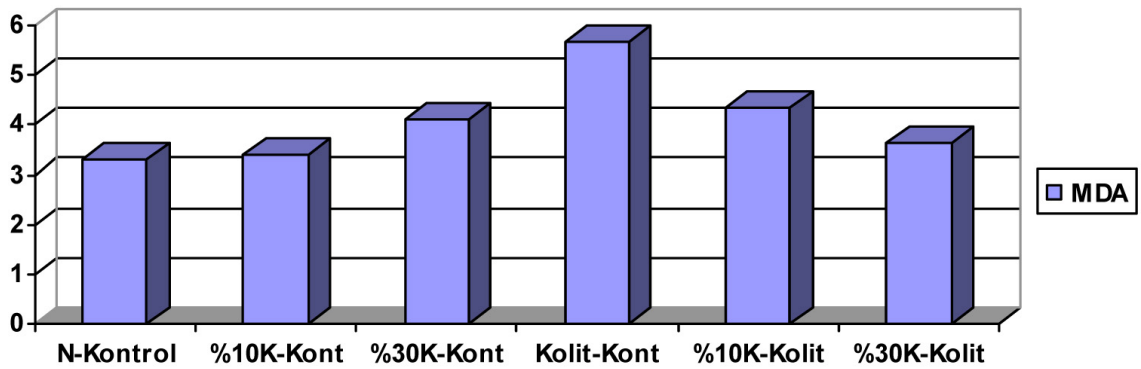
4.6.2. Kolon Dokusunda MDA Düzeyleri

Kolit-Kontrol grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kolit grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). Kolon dokusundaki MDA düzeyleri Tablo 16’da, grafik olarak Şekil 14’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Deney gruplarına göre MDA düzeyleri

Gruplar	MDA (mmol/gr protein)
1. Grup (Normal-Kontrol)	3,31±0,41
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	3,40±0,09
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	4,11±0,42
4. Grup (Kolit-Kontrol)	5,67±0,39
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	4,36±0,42
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	3,65±0,66
P (ANOVA)	<0,01
P (Post hoc Tukey test)	4-1,2,6: <0,05

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 14. Kolon dokusunda MDA düzeyleri

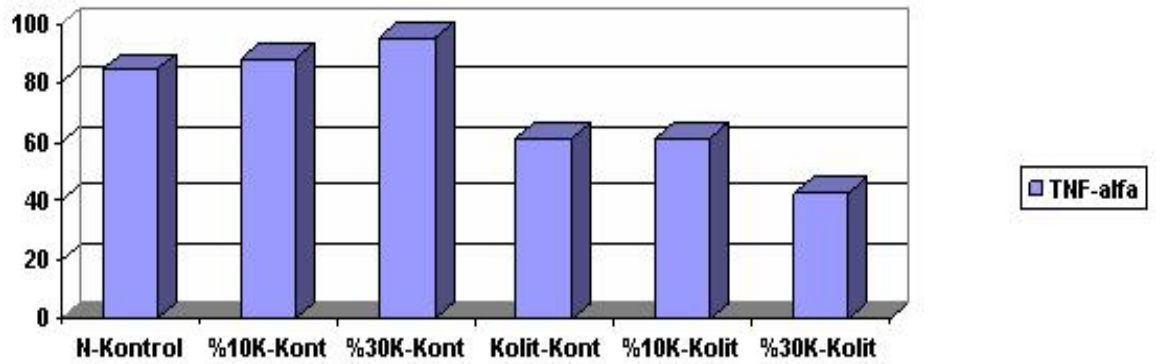
4.6.3. Kolon Dokusunda TNF- α Düzeyleri

%30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı. TNF- α düzeyleri Tablo 17’de, grafik olarak Şekil 15’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Deney gruplarına göre TNF- α düzeyleri

Gruplar	TNF- α (pg/mgprotein)
1. Grup (Normal-Kontrol)	84,57 \pm 11,23
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	88,41 \pm 11,76
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	95,08 \pm 13,03
4. Grup (Kolit-Kontrol)	61,53 \pm 6,31
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	61,16 \pm 8,77
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	42,33 \pm 8,39
P (ANOVA)	p<0,01
P (Post hoc Tukey test)	6-1,2,3: <0,05

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 15. Kolon dokusunda TNF- α düzeyleri

4.6.4. Kolon Dokusunda IL-1 β Düzeyleri

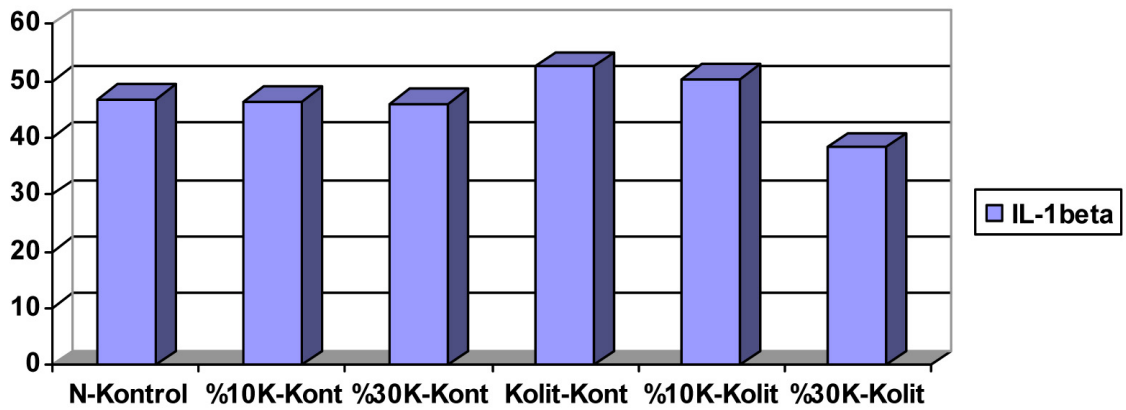
Kolon dokusunda IL-1 β düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

IL-1 β düzeyleri Tablo 18’de, grafik olarak Şekil 16’da gösterilmiştir.

Tablo 18. Deney gruplarına göre IL-1 β düzeyleri

Gruplar	IL-1 β (pg/mgprotein)
1. Grup (Normal-Kontrol)	46,84 \pm 6,51
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	46,43 \pm 4,83
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	45,86 \pm 4,60
4. Grup (Kolit-Kontrol)	52,47 \pm 6,06
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	50,40 \pm 6,63
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	38,23 \pm 5,27
P (ANOVA)	ns

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 16. Kolon dokusunda IL-1 β düzeyleri

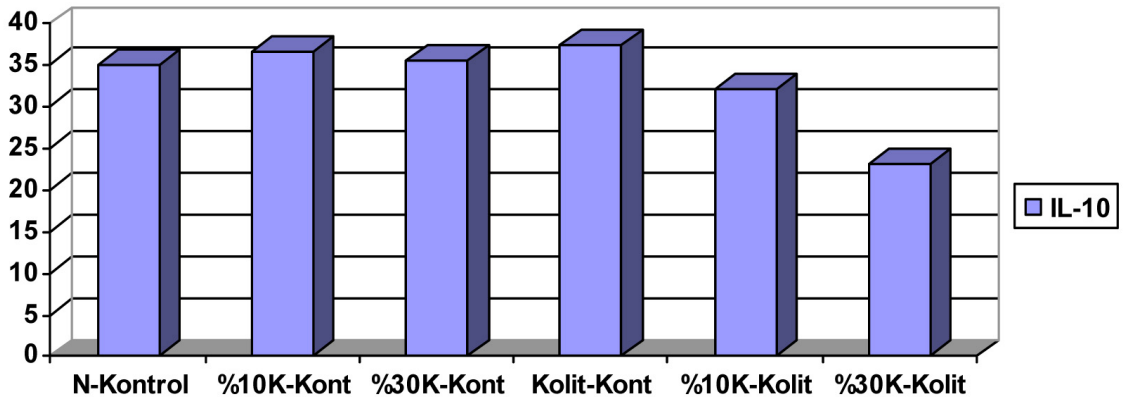
4.6.5. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri

%30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol ve Kolit-Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,01$). IL-10 düzeyleri Tablo 19’da, grafik olarak Şekil 17’de gösterilmiştir.

Tablo 19. Deney gruplarına göre IL-10 düzeyleri

Gruplar	IL-10 (pg/mgprotein)
1. Grup (Normal-Kontrol)	34,82 ± 3,26
2. Grup (%10Kefir-Kontrol)	36,45 ± 2,48
3. Grup (%30Kefir-Kontrol)	35,42 ± 2,05
4. Grup (Kolit-Kontrol)	37,29 ± 2,45
5. Grup (%10Kefir-Kolit)	32,03 ± 2,17
6. Grup (%30Kefir-Kolit)	23,05 ± 2,59
P (ANOVA)	<0,01
P (Post hoc Tukey test)	6-1,3: <0,05 6-2,4: <0,01

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 17. Kolon dokusunda IL-10 düzeyleri

5. TARTIŞMA

İBH genellikle gelişmiş ülkelerde ve özellikle genç erişkinlerde görülen, alevlenme ve iyileşme dönemleri ile seyreden, immünolojik bozuklukların rol aldığı, CH ve ÜK'yı içeren kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. Son yıllarda bu hastalıkların insidansında belirgin bir artış dikkati çekmektedir. Çeşitli toplumlarda farklı insidans oranları verilmektedir. Yaklaşık olarak oran 50/100.000 kabul edilmekte, buna göre ülkemizde 350.000, dünyada 3.000.000 kişiyi etkilemektedir. İlk olarak 1930'larda başlayan epidemiyolojik çalışmalar hastalığın 1970'lere doğru hızla arttığını göstermiştir (93).

Klinik anlamda kolit tablosuyla karşımıza çıkan bu hastalık grubunun bir çok farklı kolit yapan nedenlerden ayrımı pek de kolay değildir ve İBH tanısı alan hastalarda, tedavi aşaması da en az tanı aşaması kadar çok seçeneklidir. Tedavi hastaya göre değişmekle birlikte, günümüzde hemen her gün İBH tedavisi ile ilgili yeni yayınlar ortaya çıkmaktadır.

İBH araştırmalarında kullanılacak bir hayvan modelinde barsakta benzer morfolojik değişiklikler ortaya çıkmalı, patofizyoloji ile klinik semptom ve bulgular insandaki İBH'ya benzer olmalıdır. Ayrıca kullanılan hayvanların genetik geçmişleri ve immünolojik sistemleri ile kullanılacak kimyasal maddelerin etkileri iyi tanımlanmış olmalıdır. TNBS ile oluşturulan kolit modeli haptan ile indüklenmiş gecikmiş tip hipersensitivite sonrası oluşan kronik bir inflamasyon ve ülserasyon modelidir. Mukozal bariyer kırılarak doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon gelişir. Ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşma yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğinden bu model kronik kolit oluşması istendiğinde tercih edilmektedir. Histolojik olarak mukoza ve submukozada PMNL, makrofaj, lenfosit, bağ dokusu mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevap mevcuttur. Segmental ülserasyon ve inflamasyon sıktır. İnflamasyon ve ülserasyonun uzun süre devam etmesi nedeniyle kolonik İBH'nın patofizyolojisinin ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında uygun bir modeldir. Yapılan çalışmalarda etanolde çözülmüş TNBS ile oluşturulmuş kolitteki mukozal lezyonlar anüler ya da longitudinal ülserler, lenfosit infiltrasyonu, granülomlardan oluştuğundan bu modelin insandaki CH'nın makroskopik ve mikroskopik bulgularına benzer olduğu tespit edilmiştir (84-87).

Biz, çalışmamızda kronik inflamasyon oluşması, çalışma sonuna kadar spontan remisyon gelişmemesi, patogenezin benzer olması, histopatolojik ve klinik bulguların benzerlik göstermesi nedeni ile TNBS ile oluşturulmuş kolit modelini tercih ettik.

Günümüz koruyucu hekimlik konuları arasında yer alan alternatif tıp ve onun konularından biri olan probiyotik gıdalar, bunların içinde ise probiyotik süt ürünleri giderek önemsenmektedir. Probiyotikler şimdiye dek deneysel kolit tedavisinde denenmiş ve birçok başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen kefirle ilgili yapılmış bu tür bir çalışmaya rastlanmamıştır. Deneysel kolit tedavisinde probiyotik ürün olarak kefir seçmemizin nedeni, ülkemizde üretilmesi, yaygınlaştırılabilir ve hoş tadı olan bir içecek olmasıdır. Yapılan çalışmalarda kefirin koruyucu ve tedavi edici özellikleri anlaşıldıkça tüketimi ve popülaritesi de gün geçtikçe artacaktır.

Biz çalışmamızda ir yolla 15 mg TNBS (0.25ml %50 etanolde çözündürülerek) instilasyonu ile deneysel kolit oluşturulmuş ratlarda, %10 ve %30 konsantrasyonlarda verdiğimiz kefirin deneysel kolit modelinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık. TNBS verilen grupların hepsinde 1. günden itibaren sulu ve kanlı dışkılama olduğu görüldü. En şiddetli kolit bulguları Kolit-Kontrol ve %30Kefir-Kolit gruplarında gözlenirken, bu gruplardaki ratlarda sulu ve kanlı dışkılama oranının daha yüksek olduğu ve diyarenin daha uzun süre devam ettiği gözlemlendi. %10Kefir-Kolit grubunda diyare insidansının diğer kolit gruplarına göre daha düşük ve kolitin şiddetinin de daha hafif olduğu izlendi. Bu bulgulara dayanarak deneysel kolit modelinde düşük dozda kefirin koruyucu etkisi olmasına karşın yüksek dozda verildiğinde kolit tablosunu ağırlaştırdığını söyleyebiliriz.

Çalışma boyunca ratların günlük olarak tükettikleri sıvı ve yem miktarları kaydedildi. Çeyme suyu alan gruplarda tüketilen sıvı miktarı karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Kefir grupları karşılaştırıldığında ise %10Kefir-Kontrol grubunda sıvı alımının çalışmanın ilk 4 gününde diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Kolit indüksiyonu yapıldığı gün (çalışmanın 7. günü) kefir gruplarında günlük sıvı alımının diğer günlerle karşılaştırıldığında anlamlı decede azaldığı, çeşme suyu alan gruplarda ise herhangi bir değişiklik olmadığı izlendi. Tüm çalışma boyunca kefir gruplarındaki günlük sıvı alımının çeşme suyu tüketimine oranla 3-4 kat daha yüksek olduğu görüldü. Günlük yem tüketiminin ise kefir gruplarında

düşük miktarda olduğu gözlenirken çeşme suyu alan gruplardaki günlük yem tüketimi daha yüksek miktarda idi. Bu durum kefir gruplarındaki ratların günlük enerji ihtiyacını kefirden karşılamaları dolayısıyla yem tüketiminin azalması şeklinde açıklanabilir.

Çalışmamızda elde edilen verilerin güvenilir olması amacıyla çalışmaya dahil edilen ratların ağırlıkları arasında anlamlı fark olmamasına ve homojen gruplar oluşturulmasına özen gösterildi. Çalışmanın ilk 6 günü ratların ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Çalışmanın 7. günü tüm gruplarda kilo kaybı olduğu görüldü. Bu durum kolit indüksiyonunun 24 saat öncesinden itibaren ratlara yem verilmemesi, ayrıca ir SF ya da TNBS verilmesi dolayısıyla anestezi alan ratların oral alımlarının azalmasına bağlı olabilir. Kolit indüksiyonundan itibaren kolit gruplarında özellikle de Kolit-Kontrol ve %30Kefir-Kolit grubundaki ratlarda kilo kaybının diğer gruplara göre daha belirgin olduğu ve bu kaybın çalışmanın ilerleyen günlerinde de devam ettiği görüldü. Bu durum Kolit-Kontrol ve %30Kefir-Kolit gruplarında kolit bulgularının daha şiddetli olması nedeniyle kilo kaybının da daha belirgin olması şeklinde açıklanabilir.

Çalışmanın 14. günü yani TNBS uygulamasının 8. gününde sakrifikasyon işlemi yapılarak barsak dokusundaki patolojileri makroskopik ve histopatolojik olarak değerlendirdik. Bununla birlikte barsakdaki doku hasarında kesin bir tetikleyici mekanizma olarak kabul edilen ve dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan MPO; lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA; proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ; antiinflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-10 tayini yapıldı ve kefirin tüm bu parametreler üzerine olası etkisini inceledik.

Sakrifikasyon sonrası yapılan makroskopik kolit değerlendirmesinde %30Kefir-Kolit grubunda kolondaki ülser boyutlarının tüm kolit gruplarına göre daha büyük olduğu görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamasına rağmen rakamsal olarak ele alındığında %30Kefir-Kolit grubunda, kolonda duvar kalınlığında artış, kolon ağırlığında artış ve kolon boyunda kısalmanın kolit grupları da dahil olmak üzere tüm gruplardan daha belirgin olduğu görüldü. Kolon ağırlık/boy oranı değerlendirildiğinde de yine %30Kefir-Kolit grubunda oranın tüm gruplardan daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Kolonun makroskopik değerlendirmesi sonucunda uluslararası standardizasyona uygun olması bakımından bilimsel araştırmalarda sıkça kullanılan Wallace Skalası ile kolondaki lezyonlar skorlandı (88-90). Makroskopik skor açısından karşılaştırıldığında skorun %30Kefir-Kolit grubunda, Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol, %30Kefir-Kontrol ($p<0,001$) ve %10Kefir-Kolit ($p<0,05$) gruplarına göre belirgin olarak daha yüksek olduğu görüldü. Kolit grupları arasında en düşük makroskopik skor %10Kefir-Kolit grubunda izlendi. İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen yine rakamsal olarak değerlendirildiğinde %30Kefir-Kolit grubundaki makroskopik skorun Kolit-Kontrol grubundan da daha yüksek olduğu gözlendi.

Kolondaki lezyonların mikroskopik değerlendirmesi sonucunda histopatolojik skorlama yapıldı (57). Yine kolit grupları arasında en düşük mikroskopik skorun %10Kefir-Kolit grubunda olduğu görüldü. Bu sonuçlara dayanarak kefirin düşük dozlarda koruyucu etkisinin olmasına karşın yüksek dozda koruyucu etkisinin olmadığını, bilakis TNBS ile birlikte verildiğinde kolit tablosunu daha da şiddetlendirdiğini söyleyebiliriz.

İBH'da ve deneysel kolitte inflamatuvar proçes; nötrofil, monosit ve lenfosit gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile ortaya çıkar. Lökositler serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır (14). Reaktif oksijen radikalleri, lipid membranların peroksidasyonu, protein denaturasyonu ve DNA hasarı yaparak hücre ve doku düzeyinde hasara yol açarlar. İnflemasyonlu dokuda nötrofil infiltrasyonu, MPO enzimi aracılığıyla, güçlü sitotoksik oksidanların ortaya çıkmasını kolaylaştırır (15). Yapılan alışmalarda MPO aktivitesinin, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak TNBS kolitindeki doku hasarının ciddiyeti ile korele olduğu ve kolit gruplarında kontrol gruplarına göre kat kat yükseldiği gösterilmiştir (15, 94, 95).

İnflematuvar proçes esnasında hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir (16, 17). Oluşan lipid peroksil radikalleri; hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dnşrlenir. Bu aldehidler içinde en çok bilineni MDA'dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA

seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin ve bunlara bağılı olarak da yıkımın arttığını gösterir (18, 96).

İBH gelişimi süresince, inflamasyonlu barsak mukozasındaki makrofajlar ve lenfositler tarafından en başta TNF- α , IL-1 β ve IL-6 olmak üzere birçok proinflamatuvar sitokin üretilmekte ve bu proinflamatuvar sitokinler inflamatuvar cevabın devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca yapılan çalışmalarda bu proinflamatuvar sitokinler artarken; IL-4, IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin de baskılandığı saptanmıştır (9, 57, 97).

İntestinal immun sistem sürekli olarak antijen maruziyeti altındadır. Nitekim bir çalışmada, $\gamma\delta$ -T hücreden yoksun ratlarda mukozada DSS ile oluşturulan hasar sonrası şiddetli inflamasyon ortaya çıktığı görülmüştür. Bir başka çalışmada ise $\gamma\delta$ -T hücrelerinin inflamasyonda regülatör fonksiyonlarının olup olmadığı araştırılmıştır. Dalak ve mezenterik lenf nodlarından elde edilen $\gamma\delta$ -T hücreleri TNBS aracılı kolit oluşturulmuş ratlara aktarılmış; $\gamma\delta$ -T hücrelerinin invitro olarak CD3/CD28 stimülasyonu, ve CD4+ T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. İlâveten bu transfer sonrası TNBS aracılı kolit grubunda surveyde uzama ve histolojik hasarda azalma meydana gelmiştir. Bu duruma intestinal ve dalak lenfositlerinden salınan TNF- α düzeylerinde azalma ve IL-10, *Transforming growth factor* (TGF)- β düzeylerinde artışın da eşlik ettiği görülmüştür (98).

Sitokin ağı İBH'da mukozadaki doğal ve kazanılmış immun yanıtları düzenlemede önemli rol oynayan kompleks ve dinamik bir sistemdir. Alex ve ark.'nın yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre; TNBS kolitinde hastalık kronikleştikçe Th1-Th17 yanıtlarında belirginleşme (artmış IL-12 ve IL-17 üzerinden) olmaktadır. Aksine DSS kolitinde Th1-Th17 aracılı akut inflamasyon (artmış TNF- α , IL-6, IL-17 üzerinden) tablosunun hakim olduğu, Th2 aracılı inflamatuvar yanıt (artmış IL-4, IL-10 ve eşlik eden TNF- α , IL-6, IL-17 düzeylerinde azalma) ile kronik faza geçtiği saptanmıştır (99). Yapılan çalışmalarda sitokin profillerinin çözülmesi İBH'nın immunpatogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

İntestinal inflamasyonun santral sinir sistemi üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır. *Dorsal motor nucleus of the vagus (DMNV)* santral ve periferel uyarıları düzenleyip gastrointestinal sisteme gönderen önemli bir merkezdir. Ammori ve

ark.'nın yaptığı bir çalışmada; TNBS aracılı deneysel kolitte meydana gelen inflamatuvar sürecin bu merkez üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolit grubunda DMNV nöronlarında %77 oranında bir kayıp olduğu görülmüştür. 24 saatlik sitokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6) maruziyeti sonucunda DMNV nöronlarında hücre proliferasyonunda belirgin azalma, nöronlarda apoptoz artışı ve glutamata kalsiyum yanıtının bozulmuş olduğu saptanmıştır (100). Bu sonuçlar göstermektedir ki; intestinal inflamasyon nöronal surveyi ve DMNV fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir.

İBH tedavisinin temel taşlarından biri olan 5-ASA, remisyonun indüksiyonu ve idamesinde yıllardır ilk seçenek olmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 5-ASA'nın antikolitik etkisi tam olarak açıklanamamıştır. Kolonik inflamasyonun modülasyonunda endojen antioksidan ve antiinflamatuvar oldukları bilinen ısı şok proteini indüksiyonu ve *heme oxygenase* (HO)-1'e yönelik faydalı etkileri üzerinde durulmuştur. Bir çalışmada TNBS aracılı kolit modelinde HO-1'in kolonik ekspresyonu ve aktivitesi üzerine 5-ASA'nın etkileri değerlendirilmiştir. 5-ASA'nın intrakolonik uygulaması doz bağımlı olarak makroskopik kolonik inflamatuvar hasarın, MPO aktivitesinin, TNF- α düzeyinin azalmasını sağlarken yine doz bağımlı olarak kolonik hemoksijenaz enzim aktivitesini ve HO-1 protein ekspresyonunu artırmıştır. Kolonik hemoksijenaz enzim aktivitesinin artışını engelleyen *zinc protoporphyrin* uygulaması ise 5-ASA'nın antikolitik etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlara göre 5-ASA *in vivo* olarak kolonik antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliğini HO-1 enzim ekspresyonu ve aktivitesini artırarak sağlamaktadır (101).

Günümüze kadar yapılan birçok bilimsel araştırmada İBH etiyopatogenezinde yer alan tüm bu inflamatuvar sitokinlerin baskılanması ve tedavide ilerleme kaydedilmesi amacıyla çok sayıda antiinflamatuvar ve immunmodülatör ajan denenmiştir. *Adrenomedulline* (AM), *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) ailesinin bir üyesi olup 52 aminositten oluşan bir proteindir. Birçok deneysel kolit modellerinde AM'nin potansiyel immunmodülatör ve antiinflamatuvar özellikleri saptanmıştır. Bir çalışmada TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde kolitin akut ve kronik fazlarında AM'nin intestinal inflamasyon üzerine olası terapotik etkileri araştırılmıştır. Akut fazda AM'nin, diyare sıklığını, kolon hasarını azalttığı ve surveyi iyileştirdiği, yine akut dönemde TNF- α 'nın üretimini baskılayıp IFN- γ ve IL-10'un bazal düzeylerinin

devamını sağladığı saptanmıştır. Kronik fazda da diyare ve kilo kaybı insidansını ve kolonik hasarın yayılımını azaltmıştır. TNBS aracılığı ile ortaya çıkan nötrofil infiltrasyonu ve takip eden dönemdeki MPO artışı, AM uygulamasıyla düşme göstermiştir. AM kronik hastalığın iyileşmesinde, Th1/Th2 sitokin dengesi ve değişimi üzerinde önemli role sahiptir. Bu etkisini TNF- α ve IFN- γ düzeylerinde azalma, IL-10 düzeylerinde de anlamlı artışa neden olması sayesinde gösterdiği düşünülmektedir (102).

Kemokinler kronik inflamasyonda meydana gelen lökosit aktivasyonu üzerine önemli bir etkiye sahiptir. *Monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 sentez inhibitörü olan bindarit in ise intestinal epitelyum hücrelerinde kemokin üretimini inhibe edici etkisi mevcuttur. Yapılan bir çalışmada TNBS aracılı deneysel kolitte bindarit, kolit indüksiyonundan 2 gün önce ratlara oral yolla verilmiş, kilo kaybı, histoloji ve kolon ekstraktlarında MCP-1 düzeyi, MPO aktivitesi değerlendirilmiştir. İntestinal epitelyum hücrelerinde TNF- α ve IFN- γ kaynaklı MCP-1 sekresyonu konsantrasyon bağımlı ve selektif olarak bindarit tarafından inhibe edilmiştir. Ayrıca bindarit tedavisi ile kolitin klinik ve histopatolojik şiddetinin azaldığı gösterilmiştir. Bu etkiler, kolon ekstraktlarındaki belirgin MCP-1 ve MPO inhibisyonuyla ilişkilendirilmiştir (103).

Bir çalışmada TNBS aracılı deneysel kolit oluşturulmuş ratlara antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri olduğu bilinen bir madde olan *Tanshinone IIA* uygulanmıştır. Tedavi alan grupta diğer kolit grubuyla karşılaştırıldığında daha az doku hasarı, MPO aktivitesi, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde belirgin azalma olduğu, kolon dokusunda daha yüksek glutatyon düzeyleri ve lamina propria mononükleer hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunda baskılanma olduğu tespit edilmiştir (104).

Bir başka çalışmada talidomidin TNBS kolitinde terapötik ve profilaktik etkileri değerlendirilmiştir. Talidomidin, CH'daki intestinal inflamasyonun en önemli belirteçlerinden biri olan TNF- α , IL-12 ve *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ekspresyonunu inhibe ettiği, tedavi verilmeyen gruba karşılaştırıldığında talidomid alan grupta inflamatuvar skor ve VEGF+ hücrelerin oranında anlamlı azalma olduğu görülmüştür. İntestinal TNF- α ve IL-12 düzeyleri ile inflamatuvar skor ve VEGF+ hücre sayısında anlamlı korelasyon olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak talidomidin intestinal TNF- α , IL-12 ve VEGF üretimini inhibe ederek TNBS kolitinde anlamlı derecede düzelme sağladığı tespit edilmiştir (105).

İmmünsüpresif bir ilaç olan *15-deoxyspergualin* (DSG), greft surveyini uzatmak ve rejeksiyonu önlemek amacıyla klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada DSG'nin mukozal inflamasyonu iyileştirici etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. TNBS aracılı kolit modelinde DSG'nin kolit şiddetini azalttığı saptanmıştır. DSG ön tedavisi almış ratlar tedavi almayan grupla karşılaştırıldığında, CD19+ B hücre alt grubunda anlamlı değişiklik olduğu görülmüştür. DSG tedavisi alan grupta TNF- α üretiminde baskılanma olduğu, yine DSG alan grupta B hücreleri ve dendritik hücrelerde MD-1 ekspresyonunda anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak DSG alan grupta, dendritik hücreler ve B hücreleri üzerinden immun yanıt bakımından çok önemli bir role sahip olan MD-1 ekspresyonunun modülasyonu ve inflamatuvar yanıtta azalma, belirgin histolojik iyileşme ve mukozal lezyonlara karşı koruma sağlanmıştır. Aynı zamanda bu gelişmeye TNF- α oranlarında azalma da eşlik etmiştir (106).

2,4,6-Tris(methoxymethoxy) chalcone (TMMC) ratların hepatik stellat hücrelerinde ve makrofajlarında potent antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkileri olan bir ilaçtır. Bir çalışmada, TMMC'nin mukozal inflamasyonla karakterize hastalıklarda iyileşme sağlayabileceği hipotezi araştırılmıştır. TMMC tedavisi verilen TNBS kolitli ratlarda kilo kaybı, kolonda mukozal hasar ile karakterize parametrelere karşı belirgin koruma sağlanmıştır. Hatta TMMC, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, IL-1 β ve TNF- α ekspresyonlarını süprese etmiştir. TMMC ile tedavi edilen grupta HT-29 hücrelerinde IL-8 inhibe olurken IL-8 ve TNF- α aracılı ekstraselüler matriks *metalloproteinase-7* düzeyleri de anlamlı derecede inhibe olmuştur. TMMC, HT-29 hücrelerinde HO-1 ekspresyonunu uyarmıştır. TMMC doğrudan ve dolaylı olarak TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmektedir (107).

Bir çalışmada TNBS kolitinde kolinerjik agonist etkisi olan *anabasein* (AN) ve nikotinik reseptör antagonisti olan *chlorisond-amine diodide* (CHD)'in etkileri araştırılmıştır. AN tedavisi alanlarda kolonik doku hasarı, MPO aktivitesi, TNF- α düzeylerinde azalma gözlenirken NF- κ B aktivasyonunun baskılandığı saptanmıştır. CHD alanlarda ise daha ciddi doku hasarı, MPO aktivitesi ve TNF- α düzeylerinde belirgin artış gözlenirken NF- κ B aktivasyonunun da artmış olduğu görülmüştür. İBH'nin inflame dokuda proinflamatuvar sitokin artışı ve nöron kaybı ile karakterize olması inflamatuvar yanıtta kolinerjik antiinflamatuvar yolağın tahrip olmuş

olabileceğini düşündürmektedir. Kolinerjik agonistler kolondaki inflamatuvar hadiseyi TNF- α üretimini ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek baskılamaktadır. Bu sonuçlar da, kolinerjik antiinflamatuvar yolağın İBH'nın tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir (108).

İBH'da en popüler tedavilerden biri de probiyotiklerin kullanımınıdır. Yapılan bir çalışmada immunmodülatör etkileri olduğu bilinen probiyotik bakteriler olan *L. casei*, *L. acidophilus* ve *B. lactis*'in TNBS aracılı deneysel kolit modelinde intestinal antiinflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçta tüm bu probiyotiklerin intestinal antiinflamatuvar etkileri olduğu görülmüş, lezyonların makroskopik görünümünde ve kolonik ağırlık/boy oranında belirgin azalma saptanmıştır. Tedavi almamış grupla karşılaştırıldığında sadece *B. Lactis*'de diyare insidansı azalmıştır. Biyokimyasal olarak tüm probiyotik gruplarında kolonik glutatyon düzeylerinde düzelme görülmüş olup, bu durum inflamatuvar süreçteki oksidatif stresin baskılanmasının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. *B. lactis* tedavisi kolonik TNF- α üretimini, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ve COX-2 ekspresyonunu azaltmıştır. *L. acidophilus* uygulaması kolonik *Leucotriene* (LT)-B4 yapımını ve iNOS ekspresyonunu azaltmıştır ve *L. casei* uygulaması kolonik COX-2 ekspresyonunda azalma ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak her üç probiyotik türünün de TNBS aracılı deneysel kolitte intestinal antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu ve her probiyotik bakterinin de kendine has bir antiinflamatuvar profil ile etki ettiği saptanmıştır (109).

Yine probiyotik bakterilerin kullanıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre; *L. fermentum* ACA-DC 179, *L. plantarum* ACA-DC 287 ve *Str. macedonicus* ACA-DC 198'in insan periferik kan mononükleer hücrelerinde proinflamatuvar sitokinler olan IL-12, IFN- γ ve TNF- α 'nın sekresyonunu artırıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Aynı zamanda *L. fermentum* antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeylerinde artışa sebep olmuştur. *L. fermentum* TNBS aracılı kolit modelinde anlamlı derecede düzelme sağlamakla birlikte, deneysel olarak salmonella enfeksiyonu meydana getirilmiş ratlarda tedavide kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak *L. fermentum* suşunun probiyotik özelliklere sahip olmakla birlikte invitro olarak hayvan modellerinde antimikrobiyal aktivite ve immunmodülatör etki gösterdiği, bu türün TNBS aracılı kolit modelinde de önemli oranda düzelme sağladığı görülmüştür (110).

Başka bir çalışmada ise TNBS aracılı kolit modelinde insan HT-29 kolonisitlerinde *Saccharomyces (S) boulardii*'nin *peroxizome proliferator-activated receptor* (PPAR)- γ ve IL-8 ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. *S. Boulardii*'nin hem *invivo* hem de *invitro* olarak PPAR- γ ve IL-8 ekspresyonlarını transkripsiyon düzeyinde etkilediği saptanmıştır. *S. boulardii* TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunu bozarak, PPAR- γ ve IL-8'in regülasyonunu bloke etmiştir. Hatta *S. boulardii*'nin *invivo* olarak proinflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonunu ve koliti süprese ettiği saptanmıştır. Bu çalışmada *S. boulardii*'nin kolonik inflamasyonu azalttığı ve inflamatuvar gen ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (111).

Son yıllarda gastrointestinal florada mantarların yoğunluğu ilginç bir şekilde artmıştır. Brzozowski ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; TNBS ile indüklenen deneysel kolit modelinde kolondaki mikrobiyal kolonizasyonun inflamatuvar değişiklikler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TNBS'nin rektal yolla verilmesinden sonraki 3. günde inflame kolondan izole edilen segmentlerin ağırlığında artma, kolon dokusundaki kan akımında azalma, plazma MPO aktivitesinde normale göre 4-5 kat artış olduğu saptanmıştır. Aynı ratların kolonuna *Candida* solüsyonları inoküle edildiğinde ise, TNBS tarafından indüklenen kolonik ülserlerin iyileşmesinde gecikme olduğu görülmüştür. Bu durumun IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin artışı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ardından antifungal bir ajan olan Flukonazol ve probiyotik (*Lacidofil*) tedavisi verilmiş ve kolondaki inflamatuvar yanıt tekrar değerlendirilmiştir. Tedavi verilen gurupda sadece *candida* solüsyonları inoküle edilenlere göre ülserasyon bölgelerinde küçülme sağlandığı görülmüştür (3).

Birçok probiyotik bakteri grubunu içinde barındıran kefirin TNBS aracılı deneysel kolit modelinde koruyucu etkinliği bakımından denendiği bizim çalışmamızda ise inflamatuvar parametreler açısından bakıldığında; yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde kolit gruplarında, kontrol gruplarına göre MPO aktivitesinin 3-4 kat daha yüksek olduğu görüldü. Rakamsal olarak değerlendirildiğinde %30Kefir-Kolit grubundaki MPO aktivitesi, Kolit-Kontrol grubundan bile daha yüksek seviyede aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Kolit grupları arasında en düşük MPO düzeyinin %10Kefir-Kolit grubunda olduğu görüldü. Sonuçta TNBS kolitinde MPO aktivitesinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yükseldiği, bununla birlikte makroskopik kolit skorlamasına benzer şekilde yüksek doz kefirin

koruyucu etkisinin olmadığı, bilakis MPO aktivitesini Kolit-Kontrol grubundan bile daha fazla artırdığı görüldü.

MDA düzeyi açısından değerlendirildiğinde Kolit-Kontrol grubunda MDA düzeyinin; Normal-Kontrol, %10Kefir-Kontrol ve %30Kefir-Kolit gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$), kolit grupları arasında ise en düşük MDA düzeyinin %30Kefir-Kolit grubunda olduğu görüldü. Yüksek doz kefir MDA düzeyini düşük doz kefire göre daha fazla düşürürken aralarında MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Proinflamatuvar sitokin üretebilme kabiliyetindeki RAW 264.7 kültür hücrelerinde kefirin proinflamatuvar sitokin üretimine olası etkisinin araştırıldığı invitro bir çalışmada kefir tanesinden izole edilen laktik asit bakterilerinin TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-12 üretimini artırdığı gösterilmiştir. IL-6 48. saatte ve TNF- α 72. saatte pik yaparken, IL-12 ve IL-1 β 6. saatte en yüksek seviyeye ulaşmış ve 24. saatteki ölçümlerde konsantrasyonlarının başlangıç düzeyine kadar gerilediği gözlenmiştir (112).

Kefirin immun sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, kefir alımının 2. gününde peritoneal makrofajlarda TNF- α 'nın çok yüksek düzeylere ulaştığı izlenmiştir. İntestinal payer plaklarında da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yine TNF- α 'nın yükseldiği fakat peritoneal makrofajlardaki TNF- α salınımının payer plaklarındakine oranla daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. IL-10 salınımı peritoneal makrofajlarda anlamlı derecede artış göstermezken, intestinal payer plaklarında 5. ve 7. günlerde belirgin artış olduğu gözlenmiştir (113). IL-10 intestinal mukozal immunitiyi ve sitokinler arası bağlantıyı kontrol etme potansiyeline sahip bir sitokindir. Bundan dolayı İBH tedavisinde biyolojik antiinflamatuvar bir etkiye sahiptir. TNF- α ise makrofajların adezyonu için aksesuar moleküllerin sunumunu gerçekleştiren bir molekül olarak bilinir. Bundan dolayı peritoneal makrofajlarda ve intestinal payer plaklarında artmış TNF- α üretimi enfeksiyon süresince inflamasyona geçişi ve bu faza daha iyi hazırlanmayı sağlayacaktır. Payer plaklarından derivate edilmiş hücrelerde TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmış üretimi, inflamatuvar poçesi regüle eden IL-10'un da artması sayesinde kontrol altında tutulur. Bu hadisenin de intestinal mukozada doku hasarı meydana gelmesini engellediği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda ise IL-10 düzeyi açısından değerlendirildiğinde %30Kefir-Kolit grubunda IL-10 düzeyi; Normal-Kontrol ($p<0,05$), %10Kefir-Kontrol ($p<0,01$), %30Kefir-Kontrol ($p<0,05$) ve Kolit-Kontrol ($p<0,01$) gruplarına göre belirgin düzeyde baskılanmış olarak saptandı. Literatürde probiyotiklerin ve kefirin IL-10 düzeyini artırdığına dair çok sayıda veri olmasına rağmen bizim çalışmamızda çeşme suyu/kefir alan kontrol gruplarındaki IL-10 düzeyleri benzer iken kolit gruplarında ise %30Kefir-Kolit grubunda IL-10 düzeyinin belirgin ölçüde baskılanmış olduğu gözlenmiştir. En şiddetli kolit bulgularının da %30Kefir-Kolit grubunda olması sebebiyle IL-10 üzerinden etkili olan antiinflamatuvar yolağın bu grupta hasar görmüş olabileceğini, bu hadisenin de yüksek doz kefir alımına bağlı olabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda IL-1 β düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Hong ve ark.'nın yaptığı çalışmada kefir alımı sonrasında IL-1 β düzeyinin 6. saatte pik yaptığı ve 24. saatteki ölçümler sırasında başlangıç seviyesine kadar gerilediği gözlenmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da IL-1 β açısından anlamlı fark saptanmaması IL-1 β 'nin pik düzeyine ulaştığı zamanda ölçüm yapamamış olmamızdan kaynaklandığı şeklinde açıklanabilir.

TNF- α açısından değerlendirildiğinde ise; beklenenin aksine kontrol gruplarında TNF- α yüksek düzeyde iken kolit gruplarında TNF- α 'nın baskılanmış olduğu görüldü. Klinik, makroskopik, histopatolojik ve MPO düzeyleri açısından anlamlı derecede kolit bulguları olduğu halde TNF- α 'nın bu gruplarda neden düşük seviyede olduğu açıklanamadı.

6. SONUÇ

TNBS aracılı deneysel kolit modelinde %10 konsantrasyonda verilen kefirin klinik, makroskopik, histopatolojik ve sitokin paterni açısından değerlendirildiğinde koruyucu etkisi olmasına karşın %30 konsantrasyonda yani daha yüksek dozda verildiğinde koruyucu etkisinin olmadığı, bilakis kolit tablosunu şiddetlendirdiği saptanmıştır.

7. ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada, TNBS aracılı deneysel kolit modelinde ratlara %10 ve %30 konsantrasyonlarda verilen kefirin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD: Çalışmamıza 54 erkek Wistar-albino rat dahil edildi. 3 grup 8'erli, 3 grupta 10'arlı olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. 7 gün boyunca çeşme suyu veya kefirle ön tedavi verildi. Çalışmanın 7.günü kontrol gruplarına ir SF verilirken, kolit gruplarına da ir TNBS instilasyonu ile kolit indüklendi. İndüksiyon sonrasında aynı şekilde 7 gün daha çeşme suyu veya kefir solüsyonları ile beslenmelerine devam edildi. Çalışmanın 14. gününde ratların yaşamlarına son verilerek laparotomi yapıldı ve kolonları çıkarıldı. Kolon mukozası makroskopik ve histolojik olarak değerlendirildi, doku düzeyinde MPO, MDA, TNF- α , IL-1 β ve IL-10 düzeyleri ölçüldü.

BULGULAR: TNBS aracılı (15 mg TNBS 0.25ml %50 etanolde çözüldürülerek) deneysel kolit modelinde %10 konsantrasyonda kefir verilen grupta klinik, makroskopik ve histolojik kolit bulgularında düzelme sağlandığı görüldü. Fakat kefirin %30 konsantrasyonda verildiği grupta diyare insidansı, kilo kaybı ve histolojik kolit skorlarının Kolit-Kontrol grubuna benzer olduğu, hatta makroskopik kolit skorunun Kolit-Kontrol grubundan bile daha yüksek olduğu gözlemlendi. Doku düzeyinde bakılan biyokimyasal parametreler açısından değerlendirildiğinde; MPO düzeyinin kolit gruplarında kontrol gruplarına göre 3-4 kat arttığı izlendi. %30Kefir-Kolit grubunda MPO düzeyinin en yüksek seviyede olduğu görüldü. IL-1 β açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken IL-10 düzeyinin kolit gruplarında özellikle de %30Kefir-Kolit grubunda baskılanmış olduğu görüldü. TNF- α açısından değerlendirildiğinde ise; beklenenin aksine kontrol gruplarında TNF- α yüksek düzeyde iken kolit gruplarında TNF- α 'nın baskılanmış olduğu görüldü. Klinik, makroskopik, histopatolojik ve MPO düzeyleri açısından anlamlı derecede kolit bulguları olduğu halde TNF- α 'nın bu gruplarda neden düşük seviyede olduğu açıklanamadı.

SONUÇ: TNBS aracılı deneysel kolit modelinde %10 konsantrasyonda verilen kefirin klinik, makroskopik, histopatolojik ve sitokin paterni açısından

değerlendirildiğinde koruyucu etkisi olmasına karşın %30 konsantrasyonda yani daha yüksek dozda verildiğinde koruyucu etkisinin olmadığı, bilakis kolit tablosunu şiddetlendirdiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kefir, İnflamatuvar Barsak Hastalığı, Trinitrobenzen Sulfonik Asit, Deneysel Kolit

7. SUMMARY

OBJECTIVE: In this study, it has been aimed to investigate the protective efficacy of kefir which was given to rats in 10% and 30% concentrations in the model of TNBS mediated experimental colitis.

MATERIALS AND METHODS: In our study, 54 male Wistar-albino rats were involved. Three groups each had 8 subjects and the other 3 groups each had 10 subjects in totally 6 groups were composed. In the period of 7 days, tap water or kefir were given as a pretreatment. In the 7th day of the study; ir SF was given to the control groups whereas colitis was induced by ir TNBS instillation to colitis groups. After this induction we kept on feeding with tap water or kefir solutions likewise for 7 days more. In the 14th day of our study, rats were put an end and laparotomy was performed and their colons were removed. Mucosa of the colon was assessed macroscopically and histologically; MPO, MDA, TNF- α , IL-1 β and IL-10 levels were measured as tissue based.

RESULTS: In the model of TNBS (15 mg TNBS solved in 0.25 ml 50% ethanol) mediated experimental colitis; clinical, macroscopical and histological findings of the group which was given 10% kefir concentration showed improvement. However; in the 30% concentration kefir given group, it has been observed that the incidence of diarrhea, weight loss and histological colitis scores were similar to Colitis-Control group's findings; moreover macroscopical colitis score was more than Colitis-Control group's score. According to biochemical parameters performed as tissue based, it was observed that MPO levels in colitis groups increased 3-4 fold in comparison with the control groups'. It was observed that MPO levels in 30% Kefir-Colitis group were at the peak point. For IL-1 β ; no significant difference was determined, on the other hand IL-10 levels were suppressed, in particular in the 30% Kefir-Kolit given group. When detected according to TNF- α , opposite to the expected, TNF- α levels higher in control groups, whereas TNF- α suppressed in kolit groups. Although according to clinical, macroscopical, histopathological findings and levels of the MPO, there was significant colitis signs, why the TNF- α levels are low in these groups were not explained.

CONCLUSION: In the model of TNBS mediated experimental colitis, although 10% concentration Kefir had protective effects when it was assessed clinically,

macroscopically, histologically and in cytokine pattern; at 30% concentration, at a higher dose, it has no protective effect, contrarily it exacerbates the colitis pattern.

KEY WORDS: Kefir, Inflammatory Bowel Disease, Trinitrobenzene Sulphonic Acid, Experimental Colitis

8. KAYNAKLAR

1. Martins NB, Peppercorn MA. Inflammatory Bowel Disease. *Am J Manag Care*. 2004;10:544-552
2. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *Journal of Internal Medicine* 2002; 252: 475–496
3. Zwolińska-Wcisło M, Brzozowski T, Budak A, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Kwiecień S et al. Studies on the influence of *Candida* fungal colonization on the healing process of inflammatory lesions in the colon in rat animal model. *Przegl Lek*. 2007;64(3):124-9.
4. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci* 1998; 81: 48-53.
5. Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci*. 2004; 49: 320-7.
6. Stenson WF: Inflammatory bowel disease. In Goldman L, Ausiello D (eds): *Cecil textbook of medicine*, 22nd edition.861-868,2004.
7. Kirsner JB, ed. *Inflammatory Bowel Disease*. 5th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 2000.
8. Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002;31:1-20.
9. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347:417-429.
10. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991;324:84-88.
11. Hay JW, Hay AR. Inflammatory bowel disease: costs-of-illness. *J Clin Gastroenterol*. 1992;14:309-317.
12. Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40:619-622.
13. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut*. 1988;29:352-357.
14. Martin AR, Villegas I, La Casa C, Alarcon de la Lastra C. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, attenuates mucosal damage due to colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;481:281–91.
15. Girgin F, Karaoglu O, Erkus M et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health A* 2000;59:641–52.

16. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82: 747-752.
17. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
18. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1-15.
19. Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, Ushijima T, Kajinami T, Bamba T. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15: 61-8.
20. 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.
21. Schultz M, Scholmerich J, Rath HC. Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis.* 2003; 21: 105-28.
22. Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 37: 42-7.
23. Kwon JH, Peppercorn MA, Farrelll RJ. Diagnostic features of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Endosc News.* 2002;53:28-29.
24. Su CG, Judge TA, Lichtenstein GR: Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 31:307-327, 2002.
25. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.*
26. Tremaine WJ. (Bayless TM and Hanauer SB, eds.) *Advanced Therapy of Irritable Bowel Disease.* 2nd ed. 2000:115-117.
27. Gjaffer MH, O'Brien CJ, Holdsworth CD. Clinical tolerance to three 5-aminosalicylic acid releasing preparations in patients with inflammatory bowel disease intolerant or allergic to sulphasalazine. *Aliment Pharmacol Ther.* 1992;6:51-59.
28. Cohen RD, Woseth DM, Thisted RA, Hanauer SB. A metaanalysis and overview of the literature on treatment options for left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1263-1276
29. Marshall JK, Irvine EJ. Putting rectal 5-aminosalicylic acid in its place: the role in distal ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1628-1636
30. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. *BMJ.* 1955;2:1041-1048.
31. Katz JA. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 171-189.
32. Baron JH, Connell AM, Kanaghinis TG, Lennard-Jones JE, Jones AF. Out-patient treatment of ulcerative colitis. Comparison between three doses of oral prednisone. *Br Med J* 1962; 2: 441-443

33. Patricia L Kozuch, Stephen B Hanauer. Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy. *World J Gastroenterol*. 2008 January 21; 14(3): 354-377
34. Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol*. 1996;91:423-433.
35. Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, et al. North American Crohn's Study Group Investigators. Comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1627-1632.
36. Pierik M, Rutgeerts P, Vlietinck R, Vermeire S. Pharmacogenetics in Inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3657-3667
37. Jani N, Regueiro MD. Medical therapy for ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 147-166
38. Cohen RD, Stein R, Hanauer SB. Intravenous cyclosporine in ulcerative colitis: a five-year experience. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1587-1592.
39. Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, et al. Double-blind placebo-controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*. 1991;32:1071-1075.
40. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology*. 1995;108:1617-1621.
41. Arnold GL, Beaves MR, Pryjduń VO, Mook WJ. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 10-15
42. Turunen UM, Färkkilä MA, Hakala K, Seppälä K, Sivonen A, Ogren M, et al. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1998; 115: 1072-8.
43. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:601-608.
44. Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kühbacher T, Ghosh S, Arnott ID, et al. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut*. 2003;52:998-1002.
45. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476
46. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132: 52-65
47. Marshall JK. Review: azathioprine, infliximab, certolizumab, and adalimumab are effective for maintaining remission in Crohn's disease. *Evid Based Med*. 2008 Aug;13(4):115.

48. Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, et al. Funtolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 1131-1137
49. Marteau P. Living drugs for gastrointestinal diseases: the case for probiotics. *Dig Dis.* 2006;24:137-47.
50. Metchnikoff E. The prolongation of life. New York & London. Putnam's Sons.
51. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39: 237-238
52. Bengmark S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17: 833-48.
53. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* 1999; 354: 635-9.
54. Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22: 56-63.
55. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, et al. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* 2004; 53: 108-14.
56. Hai-Hong cui, Cun-long Chen, Ji-De Wang, Yu-Jie Yang, Yong Cun, Jin-Bao Wu, et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World j Gastroenterol* 2004; 10: 1521-1525.
57. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, GrossV, Falk W. Interferon-gamma(IFN- γ)- 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.
58. Prantera C, Zannoni F, Scribona ML, Berto E, Andreoli A, Lohn A, et al. An antibiotic regimen for to the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled trial of metranidazole plus ciprofloxacin. *Am j Gastroenterol* 1996; 91: 328-32.
59. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short- term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's disease cA2 Study group. *NEJM* 1997; 337: 1029-35.
60. Van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multipl doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's disease Study Group. *Gastroenterology* 1997; 113: 383-9.
61. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-defficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-74.
62. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like-disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; 75: 253-61.

63. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289(5483): 1352-5.
64. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1804-8.
65. Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J Food Prot* 1999; 62(2): 162-9.
66. Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*. 1996; 38: 568-73.
67. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ. colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg*. 1993; 80: 512-6.
68. La Riviere JW, Kooiman P. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch Mikrobiol*. 1967;59(1):269-78.
69. Marshall VM, Cole WM, Farrow JA. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. *J Appl Bacteriol*. 1984 Jun;56(3):503-5.
70. Tamime AY. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Dec;56 Suppl 4:S2-S15.
71. Otles S, Cagindi O, Akcicek E. Probiotics and health. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2003 Aug-Dec;4(4):369-72.
72. Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova Ts, Frengova G, Spasov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 28, 1–6
73. Garrote L.G., Abraham G.A., Antoni G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Jorunal of Dairy Research*, 2001; 68: 639-652,
74. Witthuhn RC, Cilliers A, Britz TJ. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. *J Dairy Res*. 2005 Feb;72(1):125-8.
75. Savaiano DA, Levitt MD. Nutritional and therapeutic aspects of fermented dairy products. *ASDC J Dent Child*. 1984 Jul-Aug;51(4):305-8.
76. Adam AC, Rubio-Teixeira M, Polaina J. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(7-8):553-7. Review.
77. Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K, Kitamura S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *J Agric Food Chem*. 2004 Aug 25;52(17):5533-8.
78. Maeda H, Zhu X, Omura K, Suzuki S, Kitamura S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*. 2004;22(1-4):197-200.

79. Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* 2005 Apr 6;53(7):2467-74.
80. Ota A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* 0-157. *Med Hypotheses.* 1999 Jul;53(1):87-8.
81. Böhmler G, Gerwert J, Scupin E, Sinell HJ. The epidemiology of helicobacteriosis in humans; studies of the survival capacity of the microbe in food. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1996 Oct;103(10):438-43.
82. Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 May;25(5):404-8.
83. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigón G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res.* 2005; 72: 195-202.
84. Anje A. te Velde(PhD(* Marleen I. Verstege(* and Daniel W. Hommes(PhD, MD. Critical Appraisal of the Current Practice in Murine TNBS-induced Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:995–999
85. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:521Y533.
86. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, et al. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med.* 2003;9:218Y222.
87. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989;96:795–803.
88. Lamine F, Eutamène H, Fioramonti J, Buéno L, Théodorou V. Colonic responses to *Lactobacillus farciminis* treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Dec;39(12):1250-8.
89. Zhang L, Lu YM, Dong XY. Effects and mechanism of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on rat colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Chin J Dig Dis.* 2004;5(3):110-4.
90. Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 1996 Nov 1;98(9):2076-85.
91. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları, Konya.* 1995; 1-132.
92. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
93. Calkins BM., Mendelhoff AI. The epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB., Shorter RG (eds). *Inflammatory bowel disease.* Williams and Wilkins, Baltimore pp; 31-68; 1995

94. Wallace J.L., Le T., Carter L., Appleyard C.B., Beck P.L. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33:237-239.
95. Peran L, Camuesco D, Comalada M. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21: 737-746
96. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529-1542.
97. Haller D, Serrant P, Peruisseau G, Bode C, Hammes WP, Schiffrin E, Blum S. IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *Microbiol Immunol*. 2002;46:195-205.
98. Hoffmann JC, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Kühl AA. Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Oct;23(10):909-20. Epub 2008 Jul 23.
99. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct 22
100. Ammori JB, Zhang WZ, Li JY, Chai BX, Mulholland MW. Effect of intestinal inflammation on neuronal survival and function in the dorsal motor nucleus of the vagus. *Surgery*. 2008 Aug;144(2):149-58.
101. Horváth K, Varga C, Berkó A, Pósa A, László F, Whittle BJ. The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis. *Eur J Pharmacol*. 2008 Mar 10;581(3):315-23. Epub 2007 Dec 14.
102. Talero E, Sánchez-Fidalgo S, de la Lastra CA, Illanes M, Calvo JR, Motilva V. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides*. 2008 Nov;29(11):2001-12. Epub 2008 Jul 29.
103. Bhatia M, Landolfi C, Basta F, Bovi G, Ramnath RD, de Joannon AC, Guglielmotti A. Treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 synthesis, protects mice against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Inflamm Res*. 2008 Oct 2.
104. Bai A, Lu N, Guo Y, Fan X. Tanshinone IIA ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced murine colitis. *Dig Dis Sci*. 2008 Feb;53(2) :421-8. Epub 2007 Jun 12.
105. Carvalho AT, Souza H, Carneiro AJ, Castelo-Branco M, Madi K, Schanaider A, et al. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: synergistic effects on TNF-alpha, IL-12 and VEGF production. *World J Gastroenterol*. 2007 Apr 21;13(15):2166-73.
106. Lee J, Kim MS, Kim EY, Park HJ, Chang CY, Jung DY, Kwon et al. 15-deoxyspergualin prevents mucosal injury by inhibiting production of TNF-alpha and down-regulating expression of MD-1 in a murine model of TNBS-induced colitis. *Int Immunopharmacol*. 2007 Aug;7(8):1003-12. Epub 2007 Apr 4.

107. Lee SH, Sohn DH, Jin XY, Kim SW, Choi SC, Seo GS. 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways. *Biochem Pharmacol.* 2007 Sep 15;74(6):870-80. Epub 2007 Jun 27.
108. Bai A, Guo Y, Lu N. The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on experimental colitis. *Scand J Immunol.* 2007 Nov;66(5):538-45.
109. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J et al. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J Appl Microbiol.* 2007 Oct;103(4):836-44.
110. Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jan 15;121(1):18-26. Epub 2007 Nov 6.
111. Lee SK, Kim YW, Chi SG, Joo YS, Kim HJ. The Effect of *Saccharomyces boulardii* on Human Colon Cells and Inflammation in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *Dig Dis Sci.* 2008 Jul 10.
112. Wei-Sheng Hong, Hsi-Chia Chen, Yen-Po Chen, Ming-Ju Chen. Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on in vitro cytokine production through a toll-like receptor pathway.
<https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/D94626003a.pdf>
113. Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Thangavel D, Farnworth E, Matar C. Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology.* 2006;211(3):149-56. Epub 2006 Feb 7.