

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

**KEFİRİN İNSANLAR ÜZERİNDEKİ İMMÜNOMODÜLATÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurettin GÖNÜLATEŞ

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ali K. ADILOĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1568-TU-07
proje numarası ile desteklenmiştir**

ISPARTA - 2008

ÖNSÖZ

Asistanlığımı bitirmek üzere olduğum şu an Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında görevli olduğum yıllara bakarak mutluluk duyuyorum. Burada olduğum zaman zarfında bilgilerinden yaralandığım hocalarım, Sayın Doç. Dr. Buket Cicioğlu Arıdoğan, tez hocam Sayın Doç. Dr. Ali Kudret Adiloğlu, Doç. Dr. Mustafa Demirci, Doç. Dr. Selçuk Kaya ve Yrd. Doç. Dr. Emel Sesli Çetin'e saygılar sunarım. Aynı zamanda görevli olduğum zaman zarfında çalışmaktan onur duyduğum arkadaşlarım Uzman Dr.Hasan Kesbiç, Uzman Dr. Salih Arıkan, Uzman Dr. İlker Pakbaş, Uzman Dr.Tülay Tetik, Arş. Gör. Dr.Hayati Güneş, Arş. Gör. Dr.Tekin Taş, Arş. Gör Dr. Osman Kılınç, Arş. Gör. Dr. Ayşe Aynalı, Arş. Gör. Dr. Ayşegül Özseven'e ömür boyu sağlık ve başarılar dilerim. Özellikle tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan Sayın Bedia Oğuz ve Cengiz Kayaer'e ve diğer biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma mutluluklar dilerim.

KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| Ig | : İmmunoglobulin |
| Muc 2 | : Müsin 2 |
| Rho | : Guanozin difosfotaz |
| Cox 2 | : Siklooksijenaz 2 |
| PGE2 | : Prostaglandin E2 |
| NF-B | : Nükleer faktör-kappa B |
| AP-1 | : Aktivatör Protein 1 |
| PPAR | : Peroksizomal proliferatörle aktive reseptör |
| TNF | : Tümör nekroze edici faktör |
| IFN | : İnterferon |
| ELİSA | : Enzim Bağlı İmmün Assay |
| NK | : Natural Killer cell (Doğal öldürücü hücre) |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| MHC | : Major histocompatibility factor (Ana doku uygunluk antijeni) |
| CD | : Cluster of differantation |
| FITC | : Floresan izotiyosiyonat |
| PE | : Pikoeritrin |
| EDTA | : Etilen Daimin Tetraasetik asit |
| FACS | : Facial Action Coding System |
| FISH | : Floresan in-situ hibridizasyon |
| Percp | : Perinidin Chlorophyll Protein |
| BD | : Becton Dickinson |
| APC | : Antigen Presenting Cell (Antijen sunucu hücre) |
| IL | : İnterlökin |
| TCR | : T cell receptor |
| Th | : T helper |
| T reg | : T regulatuar |

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------------|
| ÖNSÖZ | i |
| KISALTMALAR | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| TABLolar LİSTESİ | v |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi | 3 |
| 2.2. Probiyotiklere Bakış ve Bunların İnsanlarla Etkileşimi..... | 4 |
| 2.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri..... | 5 |
| 2.3.1. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler | 6 |
| 2.3.2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları..... | 7 |
| 2.4. Probiyotik Mikroorganizmalar | 8 |
| 2.4.1. <i>Bifidobacterium</i> Genusu | 8 |
| 2.4.2. <i>Lactobacillaceae</i> Familyası | 9 |
| 2.4.3. <i>Saccharomyces</i> Türleri..... | 9 |
| 2.4.4. <i>Streptococcaceae</i> Familyası..... | 10 |
| 2.4.5. Kefirin Tanımı..... | 10 |
| 2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bağışıklık Üzerine Etkileri | 11 |
| 2.6. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry) | 12 |
| 2.6.1. Akım Sitometrisi ile Hücrelerin Analizi | 13 |
| 2.6.2. Akım Sitometrisi Analizi | 14 |
| 2.7. CD Belirteçlerinin Özellikleri | 14 |
| 2.8. Bağışıklık Sistemi | 16 |
| 2.8.1. Doğal Bağışıklık Sistemi | 16 |
| 2.8.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi | 17 |
| 2.8.3. Bağışıklık Sisteminin Organları..... | 17 |
| 2.8.3.1. Merkezî Lenfoit Organlar | 17 |
| 2.8.3.1.1. Timus..... | 17 |
| 2.8.3.1.2. Kemik İliği | 18 |
| 2.8.3.2. Çevresel Lenfoit Organlar..... | 18 |
| 2.8.3.2.1. Plazma Hücreleri..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8.3.2.2. Dendritik Hücreler | 18 |
| 2.8.3.3. Natural Killer Hücreler: (Doğal Öldürücü Hücreler-NK)..... | 18 |
| 2.8.3.4. Granülositler..... | 20 |
| 2.8.3.5. Nötrofiller..... | 20 |
| 2.8.3.6. Bazofiller..... | 20 |
| 2.8.3.7. Eozinofiller..... | 20 |
| 2.8.3.8. Mukozal İlişkili Lenfoit Doku (MALT) | 20 |
| 2.8.4. Lenfositler | 20 |
| 2.8.4.1. B Lenfositler | 21 |
| 2.8.4.2. T Lenfositler..... | 22 |
| 2.8.4.2.1. T Lenfosit Hücre Algacı..... | 25 |
| 2.8.4.2.2. Yardımcı T Lenfositler - CD4 ⁺ T Lenfositler: T Helper Lenfositler (Th) | 25 |
| 2.8.4.2.2.1. Th1 Lenfositler..... | 26 |
| 2.8.4.2.2.2. Th2 Lenfositler..... | 26 |
| 2.8.4.2.2.3. Treg Hücreleri (Regülatör T Lenfositler)..... | 27 |
| 2.8.4.2.2.4. Th17 Hücreler | 27 |
| 2.8.4.2.3. Sitotoksik T Lenfositler (Tc) – CD8 ⁺ T Lenfositler..... | 27 |
| 2.8.5. Genel Bilgiler ve Çalışmanın Amacı | 28 |
| 3. MATERYAL METOD | 29 |
| 3.1. Manuel Lökosit Sayımı | 30 |
| 3.2. Bağışıklık Dönemi | 30 |
| 3.3. İstatistiksel Analiz..... | 30 |
| 4. BULGULAR..... | 33 |
| 5. TARTIŞMA | 38 |
| 6. ÖZET..... | 45 |
| 7. ABSTRACT | 47 |
| 8. KAYNAKLAR | 49 |

TABLULAR LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1 - Ticari olarak kullanılan probiyotik suşları | 6 |
| Tablo 2 - Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri | 10 |
| Tablo 3 - Tam kandaki lökosit sayılarının ($\times 10^3$) 0. 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 33 |
| Tablo 4 - Nötrofil parametrelerinin ikili haftalar ve toplamdaki dağılımı..... | 33 |
| Tablo 5: Tam kandaki lenfosit yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 33 |
| Tablo 6: Tam kandaki monosit yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı.... | 34 |
| Tablo 7: CD3+CD56+CD158+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 34 |
| Tablo 8: CD3-(negatif)CD56+CD158+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 34 |
| Tablo 9: CD3(negatif)CD56+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 35 |
| Tablo 10: CD3+CD56+ hücre yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 35 |
| Tablo 11: CD3-(negatif) CD56+ NKG2a+ hücre yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 35 |
| Tablo 12: CD3+ CD56+ NKG2a+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 36 |
| Tablo 13: CD3+ hücre yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 36 |
| Tablo 14: CD3+CD4+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 36 |
| Tablo 15: CD3+CD8+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 37 |
| Tablo 16: CD3-(negatif) CD19+ hücre yüzdelerinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı..... | 37 |

1. GİRİŞ

Probiyotikler, canlı mikrobiyal besin içerikleri olarak tanımlanabilirler. Belirli miktarda alındıklarında tüketicilerde olumlu sağlık etkileri oluşturabilirler. Probiyotikler olumlu etkilerini değişik mekanizmalarla ortaya koyarlar. Bunlar arasında patojen mikroorganizma kolonizasyonunu, hücre adezyonu ve invazyonlarını önlemeleri ve ayrıca direkt antimikrobiyal aktiviteleri ve konak bağışıklık cevabını ayarlamaları sayılabilir.

Probiyotik olarak tanımlanabilen mikroorganizma türlerinin içinde asidofiluslar ve bifiduslar sayılabilir. Bunlar faydalı bakteri ürünleri olup, bağırsaklarda normalde mevcuttur. Stres, yanlış beslenme, antibiyotik ve oral kontraseptik kullanımı normal bakteri ve mantar dengesini bozabilirler.

Probiyotiklerin klinik yararlılıkları açısından en güçlü etkileri arasında laktoz intolerasyonu semptomlarının önlenmesi, akut diarenin tedavisi, antibiyotik ilişkili gastrointestinal yan etkilerin azaltılması, önlenmesi ve alerjik bulguların tedavisi sayılabilir.

Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup, mukozal ve sistemik bağışıklığı ayarlayarak konağa etki ederler. Mide barsak sistemindeki mikrobiyal dengeyi sağlarlar. Probiyotik mikroorganizmalar vücut mukozal yüzey ve sindirim bölgelerinde yerleşmiş bakteri ve mantarlardan ibarettirler. Vücutta mevcut flora topluluğunda yerleşik mikroorganizmalar hem olumlu hem de olumsuz yönde etki gösterebilecek canlı etkenler olup belirli bir dengede bulunmaktadır. Sindirim sisteminin önemli bir bölümünü oluşturan bağırsaklarda, ilaç kullanımı veya hastalıklar sırasında açığa çıkan zararlı bakteriler, aynı bölgede bulunan iyi huylu bakterilere karşı atağa geçerler ve böylece bağırsağa yerleşmeye çalışırlar. Probiyotik bakteri suşları ise bağırsak duvarına tutunarak, bu zararlı etkenlerin içeriye girmesini önlerler.

Klinik çalışmalar göstermektedir ki, probiyotikler, rota virüs diarezi, antibiyotik ilişkili diare, Clostridium difficile diarezi ve turist diarelerini de içeren bir takım diare türü rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılabilir.

Çağımızın fiziksel ve ruhsal stresleri bağışıklık sistemimizi olumsuz yönde etkilemektedir. Beslenme yetersizlikleri, giderek artan ömür sonucu yaşlılık ve geriatric hastalıklar, günlük artan iş yoğunluğu ve buna ek olarak gelecekte kaygı, insanları enfeksiyon hastalıklarına, kansere, depresyona ve otoimmün rahatsızlıklara mâdur bırakmaktadır. Özellikle batı toplumlarında rafine gıdaların tüketiminin artması ve buna bağlı rahatsızlıklar, bu toplum insanlarının daha temiz ve katkısız doğal ürünleri tüketmelerine ön ayak olmaktadır.

İşte biz de bu çalışmamızda Kafkasya'nın dağlık kesimlerinde yaşamış kabilelerin sağlık işareti olarak gördükleri bir probiyotik türü olan kefirin bağışıklık sistemimiz üzerindeki immünomodulator etkilerini gözlemlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Bakterilerin vücudumuza zararlı ve hastalıklara neden olduğu kanısı uzun yıllar kabul görmüştür. Oysa günümüzde sayıları giderek artan bilimsel araştırma sonuçları canlı mikroorganizmaların bazı hastalıkların tedavisinde, hatta önlenmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Genelde “doğal” olanı kullanma ve tüketme alışkanlığının bulunması probiyotiklere olan ilgiyi arttırmıştır. Çeşitli gastrointestinal sistem hastalıklarının tedavisinde yardımcı, çocuklarda allerjik reaksiyonların ortaya çıkışını geciktirmede etkin, kadınlarda vajinal ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavi ve önlenmesinde yararlı olduğu ortaya konulmuştur (1–6).

Besinlerle birlikte veya ayrı olarak alınan, mukozal ve sistemik immüneyi düzenleyerek, bağırsaklarda besinsel ve mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen bu canlı mikroorganizmalara “probiyotik” adı verilir. “Pro” ve “biota” olmak üzere iki kısımdan oluşan bu terim “for life” (yaşam için) anlamını taşımakta olup, antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır. Patojen bakterilerin kontrolü için patojen olmayan bakterilerin kullanılması anlamına gelir. Probiyotiklere “biyoterapötik ajanlar” da denir. Probiyotik ile tedaviye “bakteriyel yerine koyma tedavisi”, “bakteriyoterapi” ve “patojen mikroorganizmaların patojen olmayanlar ile kontrolü tedavisi” şeklinde adlandırmalar da yapılmaktadır (7–13).

Probiyotik kavramı ilk kez XIX. yüzyılın başlarında Nobel ödülü sahibi Elie Metchnikoff tarafından gündeme getirilmiştir. Metchnikoff, Bulgar köylülerinin uzun yaşamalarının fazlaca fermente süt ürünü tüketmelerine bağlı olduğunu belirtmiştir (5, 9, 14).

Taş devri insanları önemli derecede daha az tuz, yağ ve şeker tüketmekte idiler, iki kat daha fazla mineral, 10 kat daha fazla bitkisel kaynaklı lif, 20 kattan daha fazla bitkisel antioksidan, 50 kattan daha fazla omega-3 yağ asitleri ve milyarlarca kat daha fazla canlı bakteri almaktaydılar. Tükettikleri besinlerin çoğu iyice fermente edilmiş besinlerdi. (tahıllar, inek sütü gibi). Son zamanlarda elde edilen veriler, doğal ve işlenmemiş besinlerden çoğunlukla enerji yoğunluğu yüksek işlenmiş besinlere geçişle kronik hastalıkların sıklığının arttığı konusuna dikkat çekmektedir.

Kronik hastalık sıklığının artışı ile bitkisel kaynaklı lif ve antioksidan tüketiminin azalması arasında açık bir etkileşim vardır. Kişi başına tüketilen şeker 1850 yılında yılda 0,5 kg iken, 2000 yılında yılda 50 kg'a yükselmiş durumdadır (15).

2.2. Probiyotiklere Bakış ve Bunların İnsanlarla Etkileşimi

Bağırsak mukozasının alanı 200 m^2 olup, deri yüzeyinin 100 katıdır. Bu yüzey insan vücudunu yaklaşık olarak 10^{14} mikroorganizmadan ayırmaktadır (10,16). İnsanların bitkiler ve organizmalar olmaksızın yaşamaları düşünülemez. Bu nedenle vücut yüzey ve boşlukları bir organizma tabakası ile kaplı durumdadır. Kalın bağırsaklarda 1–2 kg, deride 200 gr, ağız boşluğu, akciğerler ve vajenin her birinde 20'şer gr, burunda 10 gr, gözde 1 gr mikroorganizma vardır. İnsan vücudunda ökaryotik hücre sayısının (10^{13}) 10–20 katı prokaryotik hücre (10^{14}) bulunmaktadır. İçerdikleri genetik materyalin büyüklüğü ise vücudun diğer kısımlarındaki genlerin 30 katıdır. Sağlıklı bireylerin bağırsaklarındaki mikroorganizma türü sayısı yaklaşık olarak 500'dür. Vücudumuza yararlı olan bu mikroorganizmalar zararlı mikroorganizmaları kontrol altında tutar, sindirim ve besin ögesi emilimine yardımcı olur (5, 11, 12, 16, 17, 18, 19).

Fermente edilmiş günlük ürünler dünya insanların diyetlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bunlar bağırsak sisteminin uyarımı dâhilinde çok geniş bir spektrumda fizyolojik ve terapötik etkilere sahiptirler (20). İmmün cevapların özellikli ve nonspesifik olarak artımında laktik asit bakterilerinin olumlu etkileri değişik çalışmalarda gösterilmiştir (21). Bu açıdan mikroorganizmaların canlı ve belirgin dozda olmaları önemlidir (22, 23, 24). Probiotik mikroorganizmalar olumlu etkilerini iki mekanizma yoluyla ortaya çıkarırlar: Birincisi; canlı mikrobiyal hücrelerin direkt etkileriyle (probiyotikler) ve bu hücrelerin metabolitlerin indirekt etkileri yoluyla (biyojeniklik) Biyojenikler intestinal mikroflorayı etkilemeden sağlık açısından faydalı etkilerini aldıkları yiyecek komponentleri aracılığı ile açığa çıkarırlar (25). Fermente sütlerdeki en önemli biyojenikler fermentasyona yönelik ortamda bulunmayan peptitlerdir.

Genel anlamda bu şöyle belirlenmiştir ki, pozitif sağlık etkilerini ortaya çıkarabilmek için günlük ürünlerdeki probiotik mikroorganizmaların canlı olmaları

gerekmektedir. Öte yandan, canlı mikroorganizmaların yerine canlı olmayanların kullanılması ekonomik olarak cazibedar olabilir, çünkü buzdolabında bekletmek için gereksinimlerin azaltılmasına ve raf ömrünün uzatılmasına olanak sağlarlar. Buna ek olarak, fermentasyon yerine pastörize edilen ürünler, probiyotiklerin potansiyel kullanma spektrumunu, gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi zorunlu kullanma koşullarında desteklemektedirler (26). Fermente sütlerin farelerde kullanılması, doz bağımlı bir şekilde IgA üreten hücrelerdeki artış gibi değişik bağışık cevaplar üzerinde önemli etkilerle sonuçlanmıştır (27). Kefir krema kıvamında, hafif ekşimsi tadı olan fermente bir süt içeceğidir (28). Kefir adı, kefir'ten türetilmiş olup, Türkçe mutluluk verici tat olarak tanımlanmıştır. İlk kefir granüllerine veya kefirin ilk kez üretildiği zamana ait bir tarihi kayıt bulunmamaktadır. Şu bilinmektedir ki, kefir granülleri ilk kez Rusyada, Kuzey Kafkasya dağlık bölgesindeki kabilelerden gelmektedir. Bu bölge Karadeniz'le Hazar denizi arasında doğu batı yönündedir. Hâlâ üretilmekte olan ürünler kefir, kiaphur, kefir, kefer, knaphon, kepi ve kipe adlarını almaktadırlar (29).

Kefir de diğer bazı fermente ürünler gibi yeterli doz ve sürede verilirse insan ve hayvan organizmalarında sağlık için katkıları olan probiyotik olarak nitelendirilen fermente bir ürün grubundadır. Bu noktadan hareketle kefir de probiyotikler arasında değerlendirilebilir.

2.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri

Atalarımız uzun yıllardan beri bakterileri besinlerin saklanmasıyla fermentasyon amaçlı ve hiç bir yan etki gözlenmeksizin kullanmışlardır. Bu nedenle de, probiyotik mikroorganizmaların seçiminde atalarımızın kullandıklarına ağırlık verilmiştir. Örneğin, yoğurt böyle bir besindir; *Laktobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları içermektedir (28, 29, 30, 31).

Tablo 1 - Ticari olarak kullanılan probiyotik suşları

| <i>Lactobacillus</i> suşları | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Streptococcus</i> suşları | Mayalar |
|------------------------------|------------------------|------------------------------|---------|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>Saccharomyces</i> | |
| <i>L. casei</i> | <i>B. breve</i> | <i>boulardii</i> | |
| <i>L. fermentii</i> | <i>B. lactis</i> | <i>S. thermophilus</i> | |
| <i>L. gasseri</i> | <i>B. longum</i> | | |
| <i>L. johnsonii</i> | | | |
| <i>L. lactis</i> | | | |
| <i>L. paracasei</i> | | | |
| <i>L. plantarum</i> | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | |
| <i>L. rhamnosus</i> | | | |
| <i>L. salivarius</i> | | | |

2.3.1. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler

1. Normal insan bağırsağı kökenli olmalıdır.
2. Stabil olmalıdır, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır.
3. Güvenilir olmalıdır, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır.
4. Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
5. Karsinojenik ve patojenik bakterilere ters etkili olmalıdır.
6. Antimikrobiyal maddeler üretmelidir.
7. Konakta hastalıklara direnç artışı gibi yararlı etkiler oluşturma yeteneğinde olmalıdır.
8. Antibiyotiklere dirençli olmalıdır. Antibiyotiğe bağlı (diyare) ortaya çıkan hastalıklarda bağırsağın mikrobiyolojik içeriğini düzeltmek amacıyla kullanılabileceğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir.

9. Minimum etki dozları bilinmediğinden, canlı hücrelerde büyük miktarda bulunabilmelidir.
10. Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidir.
11. Ayrıca, probiyotik bakterilerin kesinlikle patojenler ile kontamine olmaması ve patojenik özelliğe sahip olmaması gerekmektedir (32).

2.3.2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

1. Patojen mikroorganizmaların üremelerine engel olur.
2. Bağırsak pH'sını düşürür.
3. Bakterisidal proteinler salgılar.
4. Paneth hücreleri ve epitel hücrelerinde defensin yapımını uyarır.
5. Kolonizasyonlarına direnç gösterir (ekolojik nişleri kaplayarak).
6. Nitrik oksit yapımını artırır.
7. Patojenlerin epitele tutunma ve epiteli istila etmesine engel olur.
8. MUC2'yi uyararak tutunmalarına engel olur.
9. Müküs yapımını uyarır.
10. Rho'ya bağımlı ya da bağımsız yollarla epitelin istilasını önler.
11. Epitel ve mukozanın engel oluşturma işlevini güçlendirir.
12. Bütirat da dâhil kısa zincirli yağ asitleri oluşturur.
13. Müküs yapımını artırır.
14. Engel oluşturan kısımların bütünlüğünü artırır.
15. Konakçının immün yanıtını değiştirir.
16. IL-10, TGF- β ve Cox2 (PGE2) ekspresyon ve salınımını artırır.
17. Salgısal IgA yapımını artırır.
18. TNF- α ve INF- γ ekspresyonunu azaltır.
19. Regülatuar T hücrelerini aktive eder.

20. Natural killer hücre aktivitesini artırır.
21. Dendritik hücre fenotip ve işlevlerini düzenler.
22. NF- κ B ve AP-1 yolaklarını düzenler.
23. PPAR- γ 'yı uyarır.
24. Apoptozu düzenler.
25. IL-10 ekspresyon ve salgılanmasını sağlar.

2.4. Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiotikler sporsuz, uçları yuvarlak çomak şeklinde mikroorganizmalar olup, toprakta ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Probiotikler ilk nitelendirildiği zaman sadece bakterilerden ibaret oldukları zannedildiği halde, bugün mantarların ve bazı protozoonların da bu grup içerisinde bulunduğu öngörülmektedir. Laktik asit bakterileri *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconococcus* ve *Streptococcus* türleri olmak üzere değişik mikroorganizmalardan ibarettirler. Bu mikroorganizmalar katalaz negatif olup, süperoksidad dismutaz enzimine sahip olmadıkları için oksidaz negatiftirler. Anaerob ortamda iyi üremekte, bazıları ise % 7,5 sodyum klorür ortamında yaşamaktadırlar. Laktik asit bakterileri fermentatif bir yapıya sahiptirler. Uygun şartlarda kolay bir şekilde üreyebilmektedirler. Laktik asit basilleri kendiliğinden karbonlaşmış olup, bazıları homofermentatif, bazıları da heterofermentatif bir yapıya sahiptirler. Etki gösterebilmeleri için mide asidi ve safra tuzları gibi olumsuz ortamlardan bağırsaklara canlı olarak ulaşabilmeleri ve orada metabolizmaya dâhil olmaları gerekmektedir.

2.4.1. Bifidobacterium Genusu

Actinomycetaceae familyası içinde bulunmaktadır. *Bifidobacter*'ler, insan ve bazı hayvanların kalın barsak, ağız ve vajina normal florasında bulunmaktadır.

Yeni doğanlar, özellikle anne sütüyle doğumdan birkaç gün sonra *bifidobakterler* ile kolonize olurlar. *Bifidobacter*'ler anne sütüyle beslenen infantların feçeslerinden izole edilebilirler. Kolonda bu bakteri popülasyonu yas ilerleyinceye kadar rölatif olarak sabit kalırken diyet, antibiyotik kullanımı ve stres gibi faktörlerle zaman zaman değişim görülebilir. Gram pozitif, anaerob, hareketsiz,

sporsuz, morfolojik olarak farklı şekillerde görülebilirler. Adlarını, genellikle Y şeklinde ya da bifid formda olmalarından alırlar (33).

Bifidobacter'lerin insan kaynaklı olanlarının çoğu optimum 36–38 °C'de gelişme gösterir. *Bifidobacter*'ler pH 5–7 ortamda gelişebilen asidofillerdendir.

Ancak faaliyetleri ve gelişmeleri pH 5 altı ve 8'in üstünde tamamen durur (33, 34).

2.4.2. *Lactobacillaceae* Familyası

Lactobacillus familyası üyeleri doğada oldukça yaygındır. Hayvan ve insan barsağında, normal süt florasında bulunmaktadırlar. Basil şeklinde olan bu bakteriler, düzgün çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan basil şeklinde bulunabilirler.

Çok az tür veya suşun dışında hareketsizdirler. Gram pozitif reaksiyon veren bakteri, kültürlerin eskimesi ile gram negatif ve uzun zincir görünümüne değişebilmektedir. Spor oluşturmayan, anaerop veya mikroaerofil bakterilerdir. Üreme sıcaklıkları 5–55 °C arasında değişebilir. Optimum üreme pH 5.5–5.8 aralığında görülmüştür.

Patojen özellik göstermezler. Aksine oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler ile patojen ve saprofit bakterilerin gelişmesini engelledikleri düşünülmektedir. *Lactobacillus* genusunun taksonomisi tam olarak bilinmekte ve bu genus içinde 50 tür, üç gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar, bakterinin laktozu fermente etme tiplerine göre oluşturulmuştur (33, 34).

2.4.3. *Saccharomyces* Türleri

Saccharomyces türleri, mantar ailesine ait olup, başlıca probiyotik mantar, *S. boulardii*'dir. *S. boulardii* aynı zamanda *S. cerevisiae* Hansen CBS 5296 olarak bilinir. *S. boulardii*, normalde non-patojenik bir mantardır. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen diare tedavisinde kullanılmaktadır.

Gram pozitif boyanma özelliği gösteren maya formunda görülmektedirler. 4–8 mm boyutlarında, oval veya sferik şekilde morfolojiye sahiptirler. Askospor oluşturmaktadırlar. Standart mantar besi yerinde 37 °C'de üremektedirler.

Karbonhidratları asimile ve fermente etme yeteneğine sahiptirler.

2.4.4. *Streptococcaceae* Familyası

Sferik ya da oval şekilde; tekli, ikili veya değişik uzunlukta zincir veya tetrad formunda bulunabilmektedirler. Gram pozitif, fakultatif anaerob, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif mikroorganizmalardır. Hareketsiz, sporsuz, homofermentatif özelliktedirler. Süt ve süt ürünlerinde bulunur; yoğurt yapımında kullanılmaktadırlar.

Belli başlı üç genusu vardır: *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* genusu (34).

Tablo 2 - Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri

| <i>Probiyotiklerin Etkisi</i> | <i>Probiyotiklerin Mekanizması</i> |
|--|---|
| Akut diyarenin besinsel olarak düzenlenebilmesi | Barsak mikrobiyal florasının düzenlenmesi. Rotavirüs yayılım süresinin kısaltılması |
| Alerjik ve inflamatuvar barsak hastalıklarının besinsel düzenlenmesi | Musin sentezinde artış, lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın, gut bariyer fonksiyonun ve mikrobiyal floranın özelliklerinin iyileştirilmesi |
| Enfeksiyon hastalıkları riskini azaltma | Rotavirüse karşı IgA salgısının ve musin sentezinin artışı |
| Alerjik ve inflamatuvar hastalıkların riskini azaltma | Barsak bariyer fonksiyonu, antiinflamatuvar etki, inflamatuvar moleküllerinin düzenlenmesi immün sistemin gelişiminin teşvik edilmesi |

2.4.5. Kefirin Tanımı

Kefir polisakkarit ve protein matriks içine hapsedilmiş, laktik asit bakterileri ve mayaların aktiviteleri ile oluşturulan fermente edilmiş bir süt ürünüdür. Kalıtsal yüksek beslenme değerinin yanı sıra protein ve kalsiyum kaynağı olan kefir diyet olarak önem verilen ülkelerde sağlık açısından iyi olarak tanımlanan uzun süreli bir geleneksel içecek özelliğine sahiptir. Öte yandan, insan ve hayvanlardaki beslenme özelliği olarak veya kefirin ortaya çıkardığı olumlu etkilerin mekanizmaları

hâlihazırda belirgin olarak yayımlanmamıştır. Rusya kaynaklı yayınlar kefir tüketiminin etkilerini açıklayan makalelere sahip olduğu halde, bu çalışmalar batılı ülkelerde hazır olarak bulunmamaktadır(35).

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Bağışıklık Üzerine Etkileri

Laktik asit bakterilerinin etkilerini gösterebilmeleri için canlı ve belirli miktarda olmaları gereklidir. Çok çeşitli raporlara göre, laktik asit bakterilerinin terapötik etkileri laktik asit bakterilerinin suşlarındaki farklılıklara ve çeşitli çalışmalarda kullanılan deneysel metodlara bağlı olabilir. Barsaklardaki artan miktardaki laktik asit bakterileri patojen bakterilerin büyümesini baskılayabilir. Bu sebeple iltihap oluşumunun azalmasına ve antikarsinojenik etkilerin artmasına yol açabilir. Laktik asit bakterilerinin bağışıklık uyarıcı etkileri barsak lümeninde geçici olarak kolonize olan bakterilerle lenfoit dokuların temas derecesine bağlıdır. Böylece laktik asit bakterilerinin mide barsak sistemi yolunda yaşayabilmeleri bakteriyel immünitelerini etkileyebilir(36). Laktik asit bakterilerinin mide barsak sistemi yolunda yaşama oranları gastrik pH'nın değişikliklerine bağlıdır (37). Laktobasil cinslerinin içinde olan *Lactobacillus acidophilus* konvansiyonel laktik asit kültürü olan *L. bulgaricuse* göre mide asidine daha dirençlidir (38).

Lactobacillus casei, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* ve bazı bakteriyel hücre ürünleriyle beraber olan süt ve yoğurt tüketiminin ve çeşitli laktik asit bakterilerininin karışımlarının İmmünoglobulin A üreten hücrelerin sayılarını, makrofaj, İmmunoglobulin G (IgG) miktarını ve antijenik uyarılara karşı özgün antikor cevabını laktik asit bakterilerini tüketmeyen hayvanlarla karşılaştırıldıklarında artırmaktadırlar. *L. casei* veya *L. Acidophilus* ve *bifidobacterium* ile fermente edilmiş sütün insanlarda rota virüs aşıları ve zayıflatılmış *Salmonella typhimuriuma* (Ty21a) karşı humoral immün cevabı güçlendirdiği gözlenmiştir (39, 40).

Kefir yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinden kefir granülleri (polisakkarit bir matriks içinde bir arada tutulmuş küçük mikroorganizma kümeleri) veya granüllerden ibaret materyallerin ana kültürden süte eklenmesiyle fermentasyona sebep olmalarıyla ayrılır (41). Yeterli bilginin olmamasına rağmen yapılan yeni çalışmalar kefirin hayvanlarda antibakteriyel, bağışıklık ve antitümöral etkilere

sahip olduğunu göstermektedir (42,43). Kefir ve kefirdeki lipitlerden izole edilen sifingomiyelinin, hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda bağışıklık sistemi uyardıkları rapor edilmiştir (42,44). Kefirin aynı zamanda geniş bir çerçevede bazı mantar, gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı in vitro olarak antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. (43,45).

Yaşlanma insanlarda ve hayvanlarda bağırsak mukozal bağışık cevabı olumsuz yönde etkilemektedir (46). Bağışıklık disfonksiyonundaki bu gözlemler mukozal aşuların etkinliğinde bir düşme, bununla beraber iltihabî hastalıkların insidansında ve yaşlılardaki bunlarla alakalı mortalite ve morbilite oranlarındaki yükselme ile beraberdir (47, 48,49). Laktobasiller yaşlı insanlarda barsak mukozal bağışık sistemi stimule etmektedir (50, 51, 52). *L. Acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidumun* sindirilmesinden sonra 70 yaşın üzerindeki bir yaşlı bireyler grubunda kolonik iltihap infiltrasyonlarında bir düşme ve periferik kanda B hücre yoğunlaşmasında bir yükselme not edilmiştir. Uzun dönem yoğurt tüketiminin yetişkin insan T lenfositleriyle interferon gama üretimini artırdığı ve yaşlı insanlarda alerjik belirtileri düşürdüğü gözlemlenmiştir (51,53).

2.6. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry)

Akım sitometrisi, bir sıvı akımı içerisinde ilerleyen hücreleri büyüklüğüne ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre seviyesinde araştırma imkânı sağlar. Akım sitometrisinde birçok teknik bir arada kullanılır. Akım sitometrisi sistemi, bilgisayar teknolojisi, optik, hidrodinamik odaklama ve elektronik alandaki teknik gelişmeler, monoklonal antikörlerin üretimi, sitokimyasal boyamalar ve florokrom kimyasındaki gelişmelerin birarada uygulanması ile ortaya çıkmıştır.

Akım sitometrisi; süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey ve hücre içi belirteçlerinin tipi ve sayısının belirlenmesi, B lenfositleri ile T lenfosit alt gruplarının eldesi, lösemi ve lenfoma tiplendirilme ve sınıflandırılması, DNA ve RNA içeriğinin tesbiti, fagositoz, otoantikör tayini ve kromozom analizi gibi birçok mevzuda kullanılmaktadır. Akım sitometrisiyle hücreler teker teker sayılır ve hücrelerin biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin niceleyici ölçümleri yapılır. Hücrelerin çok sayıda ve değişik parametreleri arka arkaya ölçülebilir ve hücre alt grupları olarak birbirlerinden ayırt edilebilir (54–57).

Akım sitometrisinin klinikteki önemi şöyle özetlenebilir:

1. Çok sayıda hücreyi hızla sayabilme özelliği vardır.
2. Çok az sayıdaki tümöral hücreyi geniş bir hücre grubu içerisinde saptama imkânı sağlar.
3. Sorting (ayırma) mekanizması hücre alt gruplarının ayırımına ve karışık hücre gruplarının saflaştırılmasına imkân sağlar.
4. Apoptozisin belirlenmesi, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tekniği ve tümör kinetiğinin saptanmasında da akım sitometrisi kullanılmaktadır (54).

2.6.1. Akım Sitometrisi ile Hücrelerin Analizi

Akım sitometrisi analizinde temel kural, örnekteki hücrelerin süspansiyon halinde elden geçirilmesi ve monoklonal antikolarla işaretlenmesidir. Hücreler; saf olarak elde edildikten sonra bir veya daha fazla floresan bağlı monoklonal antikor veya diğer kromoforlar ile konjuge edilir. Bu floresan bağlı monoklonal antikora veya kromoforlara prob denir. Problar genellikle hücre yüzey antijenine veya hücre içi elemanlara özgüdür. Hastalığın ön teşhisine göre o hastalığa ilişkin problemler kullanılır (54–57).

Direkt ve indirekt metodlar olmak üzere iki farklı immüno-floresan işaretleme tekniğinden yararlanılabilir. Direkt yöntemde antikorla konjuge olmuş florokrom madde [fluorescein isothiocyanate (FITC) ve phycoerythrin (PE)...vb.] kullanılır. İndirekt metotta ise süspansiyon halindeki hücelere ilkin işaretsiz monoklonal antikor bağlanır, bu antikora da işaretli monoklonal antikor bağlanır.

Direkt yöntemde kullanılan antikorun tek özellikli olması nedeniyle özgün olmayan bağlanma ihmal edilecek kadar azdır. Ancak çok düşük yoğunluğa sahip yüzey antijenlerinin gösterilememesi bir dezavantajdır. İndirekt metodun avantajı çok düşük yoğunluğa sahip yüzey antijenlerini gösterebiliyor olmasıdır. Fakat özellikli olmayan bağlanma daha sık görülmektedir (54–57).

2.6.2. Akım Sitometrisi Analizi

Akım sitometrisi; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), lazer kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik sinyal ve elektrik sinyali), bilgisayar (veri toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizması (cell sorting) olmak üzere pek çok sistemin birleşmesinden oluşur.

Süspansiyon halindeki işaretli hücreler belirli bir hava basıncı ile akış sisteminden ilerletilir ve hücreler akış kabineye getirilirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Hücreye bağlı florokrom, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar. Bu yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu, iç konfigürasyonu, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir (54–57).

2.7. CD Belirteçlerinin Özellikleri

Lenfosit ve diğer lökositler yüzeylerinde birçok sayıda farklı molekülleri ekspresse ederler. Bunlardan bazıları kısa aralıklarla hücrelerin özgün gelişim evrelerinde, hücre farklılaşması ve aktivasyonunda gözlenirken, diğerleri farklı hücre bağlamlarıyla karakterizedir. Hücre varlıklarının ayrılması için kullanılan bu moleküller belirteç adını almışlardır ve bunların çoğu özgül monoklonal antikorlarla ayırlanırlar. Yakın zamanda bu hücre yüzey molekülleri için bir sistematik sıralama geliştirilmiştir ki buna CD sistemi denir ve bu belirteçler CD1, CD2 gibi sıralanırlar. CD (Cluster designation) belirteçleri, insan lökosit antijenlerine karşı dünya çapındaki değişik laboratuvarlarda tesbit edilen monoklonal antikorların bilgisayar analizleriyle tanımlanmışlardır.

Bir uluslararası çalışma grubu, antikorlar yoluyla işaretlenen molekülleri ağırlıklarına ve boyanan lökositlerin üzerindeki yapılarına göre değerlendirilmiştir. Monoklonal antikorlar benzer özgül karakterleriyle birlikte gruplandırılmışlar ve kendilerine CD sayıları verilmiştir. Bu sayılar, günümüzde monoklonal antikorların bir grubuyla tanımlanmış özgül molekülleri belirtmek için de kullanılmaktadırlar. Çoğu vakalarda bu moleküllerin fonksiyonları bilinmemektedir(58).

Bu belirteçler probe olarak, floresan antikorların kullanımlarıyla tariflenmektedirler. Bu durumda yüzey belirteçleri antijenler olarak görev yapmaktadırlar.

CD 3: Bu belirteçler T hücreleri ve timositlerde bulunurlar. T hücre antijen reseptörünün hücre yüzeyinde ekspresyon ve sinyal iletiminden sorumludurlar.

CD 4: Sınıf 2 major histokompatibilite kompleksi (MHC II) ile sınırlı T hücreleri, timosit alt grupları, monosit ve makrofajlarda bulunurlar. Sınıf II MHC ile sınırlı T hücre aktivasyonunda sinyal iletimi ile alakalı olup adezyon eş reseptörüdür(59).

CD8: Sitotoksik T lenfositlerin yüzey belirleyicisidir. Periferik kan T lenfositleri CD8 molekülü ya CD8 α zincirinden oluşmuş bir homodimer ya da CD8 α ve CD8 β zincirlerinin birlikte oluşturdukları heterodimer yapısındadır. CD8 molekülü hem MHC sınıf I molekülüne tutunmayı sağlamakta hem de sinyal iletimini kolaylaştırmaktadır (14, 18, 26).

CD 14: Temel hücre kaynakları: Monosit, makrofaj ve granülositlerdir. Serumda çözünür formda bulunurlar. Lipopolisakkarit ve lipopolisakkarit kompleksine bağlanıp, lipopolisakkaritle indüklenen makrofaj aktivasyonu için gereklidirler.

CD 19: Birçok B hücresinde bulunur. B hücre aktivasyonunda rol oynar. CD21 ve CD81 ile eş-reseptör kompleksi oluşturarak B hücre antijen reseptör kompleksinden gelen sinyallerle görevdeşlik sağlar.

CD 45: Lökosit ortak antijeni olarak da isimlendirilir. Hematopoetik hücrelerden kaynak alır. T ve B hücresi antijen reseptör aracılı sinyal iletiminde önemli role sahiptir.

CD45R: CD45'in sınırlı hücresel ekspresyonuna sahip formları olarak da bilinirler.

CD45RO: Bellek T hücreleri ve B hücresi alt grupları, monosit ve makrofajlarda bulunurlar.

CD45RA: Naif T hücrelerinde, B hücreleri ve monositlerde bulunurlar.

CD45RB: B hücre ve T hücre alt gruplarında bulunurlar.

CD 56: Natural Killer(NK) hücreleri ve monositlerde bulunurlar. Homotipik adezyondan sorumludurlar.

CD 158: NK hücreleri ve bazı T hücrelerinden kaynak alırlar. NK hücrelerinin MHC sınıf I moleküllerini bağlamasını takiben aktivasyon veya inhibisyonundan sorumludur.

NKG2A: CD56 ile beraber lenfositler üzerindeki yardımcı T hücresi 2 (TH2) yolağını aktive ederler.NKG2A sitotoksik hücreler üzerinde ekspresse olmuşken, aktive yardımcı T hücreler üzerinde de bulunmaktadır. Makrofajların aktivasyonunu inhibe ederek immunomodülatör süreçte immünosupresif etkiye yol açabilirler.

NKG2C: TH1 yolağını aktive ederler. Böylece proinflamatuvar süreçte rol alırlar (59).

2.8. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi vücuda girmiş yabancı antijenlere karşı etkin görev yapan savunma elemanlarından ibarettir. Canlı organizmaların kendisinden olmayan antijenleri tanıması ve bunlara karşı aktive olmasına bağışık yanıt denir. Bağışıklık terimi ise bu antijenlere karşı direnci ifade eder (60–62).

Bağışıklık sistemi, yapısal olarak doğal (innate) ve kazanılmış (acquired) bağışıklık olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

2.8.1. Doğal Bağışıklık Sistemi

Herhangi bir patojenle ilk karşılaşmada ortaya çıkan bağışık yanıttır. Yabancı antijenlere karşı özellikli olmayan engelleri kapsar. Açığa çıkmasında hafıza özelliklerine gerek yoktur.

Doğal bağışıklık sisteminin elemanları şu öğeleri içerir:

1. Epitel tabakası ve mukozal engeller
2. Fagositler (monosit, makrofajlar)
3. Kompleman sistemi
4. Doğal bağışıklık sitokinleri

5. Plazma proteinleri (akut faz proteinleri) (60–62).

2.8.2. Edinsel Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklıktan temel farklılığı antijene özellikli olması ve hafıza etkisinin bulunmasıdır. Edinsel bağışıklığın efektör hücreleri B ve T lenfositleridir. Edinsel bağışıklık, hücresel ve humoral bağışıklık olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Sonradan kazanılmış bağışıklık yabancı antijenlerin belirlenmesi, bu antijenlere cevap olarak lenfositlerin artması ve efektör hücrelere farklılaşmasıyla başlar. Bu başlangıcın ardından yabancı antijenler yok edilir. Reaktif olarak ortaya çıkan savunma hücreleri apoptozize uğrar. Fagositik hücreler ortamdaki uzaklaştırılıp, etkisiz hale getirilir. Geriye kalan hücreler de hafıza elemanları olarak daha sonraki aynı tip ataklara karşı hazır halde bekletilir(63).

Antikorlar edinsel bağışıklığın humoral fazında etkilidirler. İşte bu antikorlar herhangi bir antijene karşı B lenfositlerinin özelleşmesiyle oluşan plazma hücrelerince üretilirler.

2.8.3. Bağışıklık Sisteminin Organları

Lenfoit organlar birincil ve ikincil olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Birincil lenfoit organlar, yeni lenfositlerin antijenden bağımsız olarak ayrılaştığı yerlerdir. Merkezî lenfoit organlarını timus ve kemik iliği oluşturur. Periferik lenfoit organlar ise lenfositlerin antijenik uyarılara karşı bağışık yanıtı başlattıkları organlar olup, başlıcaları dalak, lenf düğümleri ve değişik organlarda sınırlandırılmış mukozal ve sistemik yapılanmalardır (63–66).

2.8.3.1. Merkezî Lenfoit Organlar

2.8.3.1.1. Timus

Ön mediastende yer alan, yaşlanmayla atrofiye olan timositlerin ve artan yağ hücrelerinin bulunduğu, hücresel bağışıklığın mirengi noktasını oluşturan bir organ olup, kemik iliğinden göç eden T lenfositlerinin olgunlaştığı bir vücutsal yapıdır (63–66).

2.8.3.1.2. Kemik İliği

Ağsı hücrelerden oluşan, gevşek bir bağ dokusu içinde yer alan, gelişmekte olan kan ve yağ hücrelerinden oluşan, B lenfositlerin ana yerleşim yeridir(63–66).

2.8.3.2. Çevresel Lenfoit Organlar

Dalak: Kırmızı ve beyaz pulpadan ibarettir. Beyaz pulpada lenfositler, kırmızı pulpada ise eritrositler ve makrofajlar bulunur. Kanı filtre etmekte görevlidirler (63–66).

2.8.3.2.1. Plazma Hücreleri

Plazma hücreleri, uyarıcı antijene özellikli immunoglobulin sentezleyen 9–12 mikrometre çapında hücrelerdir. Bu hücreler, araba tekerleğini andıran kromatin yapısına sahip egzantrik konumdaki çekirdekleri ve hücrenin oval biçimiyle kolay tanınabilirler. IgG için Fc reseptörü ve kompleman reseptörü taşımazlar. B hücrelerinin aksine plazma hücreleri, sinyal üretici molekül B19 ekspresse etmezler

2.8.3.2.2. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Antijen sunan hücre görevini üstlenirler. Yardımcı hücreler olup ve antijenlerin işlenip T hücrelerine sunumunda rol alırlar. Primer T hücrelerine bağımlı bağışık yanıtın oluşumunda en etkili hücrelerdir. Dendritik hücreler, lokalizasyonlarına göre farklı isimlerle anılırlar. Örneğin derideki dendritik hücrelere Langerhans hücreleri adı verilir.

2.8.3.3. Natural Killer Hücreler: (Doğal Öldürücü Hücreler-NK)

Natural killer hücreler, daha önceden hedef hücre antijenleriyle sensitizasyona gerek olmadan ve MHC molekülleriyle ilişkisiz olarak sitolitik aktivite gösteren hücrelerdir. Bu hücreler, periferik kan lenfositlerinin % 5'ini oluştururlar, iki yönlü gelişim yeteneğine sahip T/NK progenitör hücrelerden gelişirler ve CD56(+) CD16(+) CD3(-) yüzey fenotipik özelliklerine sahip olup sitoplâzmalarında çok sayıda granül bulunduran büyük lenfosit görünümüne haizdirler. Natural killer hücreleri, virüsle enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini lizize uğratabilirler. NK hücrelerinin fagositik aktiviteleri yoktur ve lizozom gibi mikrobisidal sistemlere sahip değildirler. NK hücrelerinin hedef hücreleri

tahribindeki major mekanizma, bu hücrelerdeki granüllerin hedef hücreye ekzositozu ile tetiklenen apoptozdur (67, 68).

Natural killer hücreler IgG'nin FcγRIII olarak bilinen düşük affiniteli reseptörünü ve IL-2'nin p70 subtipini taşırlar. Yüzey antijenleri bakımından heterojen bir grup olmakla birlikte taşıdıkları CD16 (IgG için Fc reseptörü–FcγIII) ve CD56 (Nöral hücre adezyon molekülü, N–CAM izoformu) molekülleri büyük ölçüde NK'lara özgüdür ve fenotipik olarak tanımlanmalarında kullanılır (40, 41, 42). Natural killer hücreler tarafından tanınan hedef hücrelerin yüzey molekül yapıları henüz bilinmemektedir. Natural killer hücreleri, IgG ile kaplı hedef hücrelere, taşıdıkları FcγamaRIII reseptörleri ile bağlanması sonucu antikora bağımlı hücresel sitotoksik reaksiyonda efektör hücre olarak görev alabilirler.

Sitotoksik hücrelerden farklı olarak bu hücrelerin, sitolitik etkileri için hedef antijenler ile daha önce ilişki kurulmuş olmasına ve sitokinler ile etkileşime gerek yoktur. Ancak IFN, TNF ve IL–2 ile etkileşimini takiben bu hücrelerin lizis yeteneklerinde artış olduğu bilinmektedir, bu hücrelere LAK (lymhokine-activated killer) hücreler ismi verilmektedir (67,68).

Natural killer hücrelerin hedef hücreleri lizise uğratması, sitotoksik hücrelerde olduğu gibi (granül ekzositoz ve hücre toksin sekresyonu) benzer mekanizmalarla gerçekleşir. NK granülleri, por oluşturan protein, sitotoksinler, serin esterazlar ve proteoglikanları ihtiva ederler. Natural killer hücreler, TNF ve IFN-γ'yı sentezleyebilir.

Natural killer hücreleri tümörlere karşı nonspesifik bağışık savunma mekanizmalarının başında yer alır. NK hücre defektinde, özellikle *Varisella Zoster Virüs*, *Cytomegalovirüs*, *Ebstain Barr Virüs* gibi enfeksiyonlara sıkça rastlanır. Böylece virüs enfekte hücrelerin lizisinde ve parazitlere karşı konakçının korunmasında da rol oynamaktadırlar. Kemik iliği nakli yapılanlarda gelişen graft-versus-host hastalığında derinin histopatolojik incelemelerinde NK hücre sayısının çok fazla olduğu gösterilmiştir (67, 68).

2.8.3.4. Granüositler

Kemikiliğinde myelomonoblastik kök hücreden itibaren miyeloblast, promyelosit, miyelosit, metamiyelosit evrelerinden geçerek gelişirler ve periferik kana geçerler. Nükleus, genç şekillerde bant biçiminde olup hücre yaşlandıkça yer yer boğulmayla loblu görünüm alır. Wright boyasıyla boyandıklarında sitoplâzmalarında granülleri ince erguvanî renkli olan granulositlere nötrofil, iri parlak kırmızı renkli olanlara eozinofil; iri lacivert renkli olanlara da bazofil denir (68).

2.8.3.5. Nötrofiller

Nötrofillerin görevleri, mikroorganizmaların, yabancı maddelerin, doku yıkım artıklarının fagositozu, sekresyon ve akut faz cevabının oluşmasına katkıda bulunmaktır.

2.8.3.6. Bazofiller

Parazitlere karşı konak direncinin oluşmasında yer alırlar.

2.8.3.7. Eozinofiller

Eozinofiller, bazofil ve eozinofil niteliklerine sahip hibrid prokürsörlerden farklılaşırlar. Etkin oksijen metabolitleri (respiratory burst ürünleri) ve hedef hücre membranında oluşturdukları, osmotik sitolize neden olabilen hasarlayıcı etkileriyle parazitlere karşı mücadelede yer alırlar (69).

2.8.3.8. Mukozal İlişkili Lenfoit Doku (MALT)

Organize olmuş lenfoit dokular olup, solunum, ürogenital ve sindirim sistemindeki mukoit membranların savunmasında yer almaktadırlar. Bunlara örnek olarak peyer plakları ve tonsiller verilebilir (70–73).

2.8.4. Lenfositler

Lenfositler, değişik antijenik yapıları özellikli olarak tanıyan ve birbirinden ayıran tek hücre topluluğudur.

İşlevlerine ve salgıladıkları proteinlere göre üç ana gruba ayrılırlar:

1. B lenfositler
2. T lenfositler

3. Doğal öldürücü hücreler

Tüm bu lenfositlerin ayrımlanmalarını sağlayan, fenotipik bir ayıraç gibi davranan bir takım membran proteinleri bulunmaktadır. Numerik olarak tanımlanan bu proteinlere 'cluster of differantation' (CD) denilir (74).

2.8.4.1. B Lenfositler

B lenfositler, kemik iliğinden kaynaklanıp erken dönemdeki olgunlaşmalarını burada tamamlarlar. Vücutta antikor oluşturabilen tek hücre topluluğudur. B lenfositlerdeki antijen reseptörleri hücre membranına bağlı bulunan antikorlardır. Antijenlerin membrana bağlı bulunan bu antikorlarla karşılaşması ile B hücreleri aktive olup, aktif olarak antikor salgılayan efektör hücrelere doğru farklılaşma gösterirler. 84. Tüm B lenfositler kemik iliğinde (KI) bulunan ve B hücrelerine doğru farklılaşacağı belirlenmiş bir kök hücreden kaynaklanırlar. Tayin edilebilir bir immunglobulin gen ürünü sentezleyebilen ilk hücre pre-B lenfosit olup, salgılanan ürün değişken (variable, V) ve sabit (constant, C) bölgelerini içeren sitoplazmik m ağır zinciridir. Pre B lenfositler sadece kemik iliği ve fetal karaciğer gibi hematopoetik dokularda bulunurlar (75). B Lenfositlerin gelişim evreleri, yüzeylerinde sergilenen antijenler ile takip edilebilir. Erken dönem pre B lenfositlerin yüzeyinde Class II Büyük Doku Uyum (MHC Class II, Ia), CD19, CD34 antijenleri bulunurken, IgM ağır zincirinin yeniden düzenlenmiş genleri de bulunur. CD19, B lenfositlere sinyal iletilmesinde rol alan hücre yüzey antijen kompleksinin bir elemanıdır, CD34 ise immatür miyeloid hücrelerde de bulunan bir transmembran glikoprotein olup, yönlendirilmemiş öncü (progenitor) hücreleri tanımlar. CD 34'ün bir adezyon molekülü gibi çalıştığı düşünülmektedir (75).

Bu dönemde hücrelerin sitoplazmasında B lenfositlere özgün CD22 molekülü bulunsa da CD22 nin hücre yüzeyine çıkışı matür, istirahat halindeki hücrede yüzeyel Ig D (sIgD) nin çıkışından sonradır. CD22," neural cellullar adhesion molecule" (NCAM) ile çarpıcı bir benzerlik gösteren Ig benzen bir molekül olup; B lenfosit, monosit, eritrositler arasında iletişimde rol aldığı düşünülmektedir. Pre B hücre gelişimi sırasında CD29/49d, CD 40, CD45R, CD9. CD24 gibi çeşitli antijenler de sergilenir.

CD40 ise CD4+ olan T lenfositlerin yüzeyindeki CD40 ligandı (CD 40L) aracılığıyla B hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde rol almaktadır. CD45 molekülünün sitoplazmik kısmının tirozin kinaz aktivitesi olup, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir.

CD9, hücre adezyon ve aktivasyonunda rol alırken; granulositlerde de sergilenen CD24 sinyal iletiminde etkilidir.

Erişkinlerde pre B hücre gelişimi kemik iliğinde gerçekleşir. Fötusta ise bu gelişim karaciğerde başlayıp, kemik iliği, dalak ve lenf nodlarında devam eder.

Gebeliğin 22–24 üncü haftalarında fetal B hücrelerin çoğu sIgM ve IgD yanı sıra aslında matür T hücrelerine özgün olan CD5 molekülünü de sergiler. Pre B ve matur B lenfositlerde sergilenen CD72 molekülü CD5 in doğal bir ligandıdır. Pre B hücreler olgunlaştıkça periferik kana geçerek sekonder lenfoid organlara doğru hareket ederler. İstirahat halindeki olgun B hücrelerin yüzeyinde Ia, CD19, CD20, CD24, CD22, CD40 ve CD45R bulunurken CD9, CD10 ve CD34 ekspresyonu artık söz konusu değildir (76).

2.8.4.2. T Lenfositler

Timus, T lenfositlerin olgunlaşması ve aktif hale gelebilmesi için gerekli olan bir organdır. Hamileliğin dördüncü haftasında 3. ve 4. faringeal arkta aşağı doğru ilerleyen timus ön mediastende V şeklinde solit bir organ oluşturur. Fetal timus, hamileliğin üçüncü ayından itibaren fonksiyonel bir hale gelir (77,78).

Fetusta daha hiçbir timosit belirteci oluşmamışken, yüzeyinde CD7'yi bulduran protimositler fetusun karaciğeri ve vitellus kesesinde gestasyonun 7. haftasından itibaren görülmeye başlar. CD7+ belirtecinin oluşmasını CD2, CD3, T lenfosit hücre algacı (TCR), CD4 ve CD8 moleküllerinin ortaya çıkışı izler. Fetal timusta gama-delta reseptör sunumu 9. alfa-beta reseptör sunumu ise 10. gebelik haftasından itibaren görülür. Gebeliğin ancak 14. haftasından sonra major timosit alt gruplarının hepsi mevcuttur. CD4 ve CD8 T lenfositleri ilk olarak karaciğerde ve dalakta görülmeye başlar ve böylece T lenfositlerin sayıları gebeliğin 14. haftasından itibaren artmaya başlar. Bu artış doğumun ardından 6. aya kadar devam eder ve bu noktadan sonra yavaş yavaş düşerek erişkin seviyelerine iner. Yenidoğanda T ve total lenfosit sayısı, bir erişkinindekinden fazladır. CD4/CD8 oranı erişkin düzeyine

4 yaş civarında gelir ve bu esnada 2 civarındadır. Gebeliğin ilk üç ayında TCR spektrumu dardır. Doğumla birlikte bu repertuar artar (74, 77, 79).

T lenfositleri belli bir kök hücreden gelişirler. T lenfosit kök hücreleri kemik iliğinden kaynaklanmakta olup, olgunlaşmak için timus korteksine giderler. Timus korteksinde olgunlaşacak olan bu lenfositlere timosit denir. İlkel timositler timusa gitmeden önce olgun T lenfositlere özellikli olan yüzey belirteçlerine sahip değildirler.

Olgunlaşan timosit hücreleri medullaya doğru ilerleyip, bir takım değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler sürecinde, T lenfositler bazı yüzey belirteçlerini kaybederken bazılarını da kazanırlar (74, 77, 79).

Timositler yüzeylerinde CD4 ve CD8 moleküllerini barındırmalarına göre 4 alt gruba ayrılırlar:

1. CD4 ve CD8 bulundurmayan çift negatif
2. İki molekül de bulunduran çift pozitif
3. Sadece CD4 bulunduran tek pozitif
4. Sadece CD8 bulunduran tek pozitif

Kemik iliğinden timus korteksine göç eden temel hücrelerden olgunlaşan ilk hücrelerde (pro-T) TCR ve CD fenotipleri oluşmamıştır. Timustaki olgunlaşma esnasında ilk ortaya çıkan T hücre yüzey antijeni CD2'dir. Ayrıca CD71, CD38 ve CD7 yüzey molekülleri de bu evrede ortaya çıkar. Hücreler korteksten medullaya hareket ettiklerinde ve olgunlaşma süreçlerinde pre-T lenfositlerde CD2+, CD3-, CD4-, CD8- bulunur. Bunu takip eden süreçte CD2+, CD3+, CD4- ve CD8- fenotipini içeren hücreler oluşurlar. Bu dönemde ilk T lenfosit hücre algacı sentezlenir. T lenfosit hücre algaçları TCR-1 (gama/delta) ve TCR-2 (alfa/beta) olmak üzere ikiye ayrılırlar. İlk olarak beta ve ardından alfa zinciri sentez edilir. Çift pozitif hücrelere dönüşümde beta zincirinin sentezi tamamlanmış olmalıdır. TCR yapısıyla birlikte aynı zamanda hücre içi CD3 sentezi de başlar. CD2+, CD3+, CD4+, CD8+ fenotipini bulunduran ve TCR taşıyan hücreler ekspresse edilir (, 67,77,79, 80, 81).

Timus içerisindeki timositler olgunlaştıkça, dönüşen T lenfositlerde TCR ekspresyonu artar, aynı zamanda yüzeydeki CD4+ ve CD8+ moleküllerinden biri kaybedilir. Ardından CD2+ ve CD3+ belirteçlerini birlikte bulunduran, ayrı olarak sadece CD4+ veya CD8+ moleküllerini bünyesinde barındıran iki farklı lenfosit grubu oluşur. Daha sonra bu lenfositler organ içi kan dolaşımına katılıp venüller yoluyla organizmaya dağılır. Perifere geçmiş T lenfositlerde CD4 ve CD8 belirteçleri bir arada bulunmaz.

Timositler timustaki olgunlaşmalarını üç günde tamamlarlar. Bu esnada timositlerin tümüne yakını apoptozize uğrar (67, 77, 79, 80, 81).

Timusu, timositlerin ancak %1'i terk eder, geri kalanıysa programlanmış hücre ölümüne maruz kalır. Apoptozisle sonuçlanan bu süreçte, ölen timositlerin %75'i CD4+-CD8+(çift pozitifken) sadece %13'ü CD4-CD8- (çift negatif) hücrelerden ibarettir. Apoptozize uğrayan hücrelerden çoğu yüksek yoğunlukta bulunduğu kortikomedüller bağlantı bölgesindeki CD4+CD8+ lenfositler olup, daha azı da kortekste tesbit edilir. TCR spektrumunun özgülüğü değişip giden gen düzenlemeleriyle oluşur.

Kendi MHC moleküllerine uygun seçicilik gösteren TCR bulunduran timositler, pozitif bir seçimle ölümden kurtulup, olgunlaşabilirler. (pozitif seleksiyon) Kendi MHC'sine affinitesi olmayan hücrelerse ölür. Böylece periferde bulunan antijen sunucu hücrelerin sundukları antijenlerin tanımlanamamasıyla sonlanacak bir durum engellenmiş olur. T lenfositlerinin %95 kadarı alfa ve beta zincirlerinin yer aldığı TCR-2'leri taşır (77, 79, 80).

Timusta değişim evrelerini sonuçlandıran T lenfositlerinin kan akımına hangi mekanizmalarla girdiği ve hangi alt sınıflara ayrılacağı kesin olarak bilinmemektedir. Gelişimini tamamlayan T lenfositlerinin kan akımına karışarak dalak, lenf düğümleri ve mukozal lenfoit dokular gibi ikincil lenfoit oluşumlara gittikleri belirlenmiştir. Ayrıca dolaşımdaki lenfositlerin %60-80'i T lenfosit olup, üçte ikisi CD4, üçte biriyse CD8 belirtecini taşır (74,77,79,80).

T lenfositleri timustan perifere geçer ve orada çoğalır. Periferdeki T lenfosit sayılarının sabit tutulması, timik prekürsör havuzuna değil, timus dışı hücre bölünmesine bağlıdır. T lenfosit spektrumu timusta belirlenir, fakat T lenfosit

özelliklerinin ileri aşamaları vücuttaki şekillenmiş T lenfosit havuzunun genişlemesiyle sağlanır (79).

2.8.4.2.1. T Lenfosit Hücre Algacı

T lenfositler yüzeylerinde immunoglobulin bulundurmazlar. Peptit haline dönüştürülmüş antijenlerin belirlenmesi T lenfosit hücre algacıyla sağlanır. TCR immunoglobulinlerden hem fonksiyonel, hem de yapısal olarak farklıdır. T lenfositleri kendilerine MHC ile sunulan peptitleri tanır. TCR'ler hiçbir zaman salgılanmazlar. İki tip TCR bulunmuştur. T lenfosit hücre algacı genelde alfa ve beta (TCR-2) zincirlerinden oluşmuş olup, bu zincirler disülfid bağlarıyla bağlıdır. TCR-1'ler ise gama ve delta heterodimerlerinden oluşmuş olup, sayıları TCR-2'lere göre daha azdır. TCR-1'leri oluşturan polipeptitler TCR-2'lerden önce oluşmuş olup, CD4+ ve CD8+ bulundurmadıkları ve MHC'lerle bağlı olmayan bir şekilde sitotoksitede rol aldıkları zannedilmektedir. TCR'lerin sitoplazmik kısımları çok kısadır. Bu yüzden, antijene bağlanmaları sonrasında sinyal oluşturmazlar. Sinyal oluşum ve iletiminden TCR ile ilişkili polipeptit yapılar (CD3+ kompleksi) sorumludur. Bu bakımdan işlevsel T lenfosit algacı TCR/CD3 kompleksi olarak değerlendirilir. Kan dolaşımındaki insan T lenfositlerinin aşağı yukarı %95'inin yüzeyinde TCR-2 algacı bulunur (77, 80, 69, 75,76).

2.8.4.2.2. Yardımcı T Lenfositler - CD4⁺T Lenfositler: T Helper Lenfositler (Th)

Kandaki lenfositlerin %35-60 kadarını CD4⁺ Th alt grup lenfositler oluşturur. Th lenfositler kendi içinde 2 temel alt gruba (Th1 ve Th2) ayrılır. Daha sonra Treg hücreleri ve son yayınlarda özellikle otoimmün hastalıklarda sayıları artan Th17 hücreleri saptanmıştır. Tüm yardımcı T lenfositleri CD4 yüzey molekülüne sahiptirler. Ancak ürettikleri sitokinler ve fonksiyonları açısından farklıdır. Ortak bir prekürsör hücreden farklılaşarak gelişirler. Gelecek bağışık uyarılara göre INF- γ salgılayan Th1 veya IL-4 salgılayan Th2 fenotipine farklılaşırlar. Th1 ve Th2 fonksiyon farklılığı önceden belirlenemez. Farklılaşma, $\alpha\alpha$ onları bu tiplerden birine yönlendiren sinyallere bağlıdır (82).

Yardımcı T lenfositleri, MHC Klâs-II molekülleri ile sunulan peptidleri tanırlar. Antikor yapıcı B lenfositlerin ve sitotoksik T lenfositlerin aktivitelerini şiddetlendirirler.

Th lenfositlerin azlığında efektör T ve B lenfositlerin antijene cevabı zayıf olur. Bu hücreler ayrıca çeşitli lenfokinler salgılayarak T lenfositlerin, monosit-makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe artmalarını sağlarlar. Bu nitelikleri ile Th lenfositleri, bağışıklık sisteminin orkestra şefi hücreleridir (82).

2.8.4.2.2.1. Th1 Lenfositler

İnterferon gamma (INF- γ), IL-2, Tümör Nekrozis Faktör-beta (TNF- β) üretirler. Th1 lenfositler, B lenfositleri IgG₁ ve IgG₃ antikorlarını sentezlemeye yöneltir. Temel olarak INF- γ üreterek opsonizasyon sağlama, kompleman bağlayan antikor üretiminde artış ve makrofajların aktivasyonu sonucu antijenlerin yok edilmesi işlevlerini yürütürler. Th1 lenfositlerden üretilen sitokinler özellikle makrofajları ve sitotoksik T lenfositleri aktive eder. Th1 lenfositler asıl olarak sitolitik aktivite gösterirler ve hücrel bağışık cevapta etkin ve kilit rol oynarlar (83, 84,85).

2.8.4.2.2.2. Th2 Lenfositler

Th2 lenfositler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 gibi sitokinleri üretirler. Th2 lenfositler esas itibariyle sıvısal bağışık yanıtın gelişmesini etkilerler. B lenfositleri IgM, IgG₄ ve IgE sentezine yöneltirler. Ig switching'inden (IgM, IgG sentez switchingden) sorumludur. Böylece total IgG sentezi de artar. Antijenik uyarım sonucu çoğalan ve farklılaşan Th2 lenfositlerin salgıladığı IL-4, bir yandan B lenfositleri aktive ederek IgE sentezini, diğer yandan eozinofilleri aktive eden IL-5 sentezini uyarır. IgE, mast hücrelerinin aktivasyonuna katılır ve helmintleri kaplayarak eozinofiller tarafından parçalanmasını sağlar. Th2 lenfositler allerjik inflamasyon ve anti-paraziter bağışıklıkta önemli rol oynamaktadırlar. Th2 lenfositler tarafından üretilen bazı sitokinler makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve Th1 aracılığıyla yürütülen bağışıklığı baskılar. Bu hücreler, akut ve kronik enflamasyonu ve geç tipte hücrel aşırı duyarlılığı inhibe ederler (83,84, 85).

2.8.4.2.2.3. Treg Hücreleri (Regülatör T Lenfositler)

Son 10 yılda regülatör T lenfositleri (Treg hücreleri) olarak adlandırılan ayrı bir hücre popülasyonunun varlığı ortaya konmuştur. Treg hücreleri, CD4⁺ CD25⁺ T lenfositleridirler. Bu hücrelerin keşfi hücre aracılı süpresyon, self tolerans ve adaptif bağışık yanıtın regülasyonu ile ilgili bilgilerde ilerlemeler kaydedilmesini sağlamıştır. Periferal kanda CD4⁺ T lenfositlerin yaklaşık % 5–25'ini oluşturlar.

Bu hücreler, ayrıca CD45RB^{Lo}, CD5, OX40, CTLA-4, glukokortikoid–induced TNF reseptör (GITR), FOXP3 gibi molekülleri de eksprese ederler.(86-88)

Treg hücrelerinin regülasyon etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda bazı özellikleri ortaya konmuştur.

Treg hücreleri, hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T lenfositleri regüle eder. TGF-β ve IL-10 sentezleyerek efektör Th1 üzerinde inhibisyona neden olurlar. T lenfositlerin IL-2 üretimini ve proliferasyonunu baskırlar (86, 87, 89, 90).

2.8.4.2.2.4. Th17 Hücreler

IL-23 tarafından uyarılır ve IL-17 salgılayarak etkilerini gösterirler. IL-17, birçok doğal immünite efektör molekülün salgılanmasını indükler. Bunlar IL-6, akut faz proteinleri, G-CSF ve prostaglandin E2'dir. IL-17 nötrofil mobilizasyonunu da sağlar. TH17 lenfositlerin romatoid artrit, deneysel otoimmün ensefalomyelit ve bazı allerjen özellikli yanıtların patogeneğinde de etkili oldukları saptanmıştır (91).

2.8.4.2.3. Sitotoksik T Lenfositler (Tc) – CD8⁺T Lenfositler

CD8 molekülü taşıyan T lenfosit alt grubudur. Periferik kan T lenfositlerin % 20–40'ını oluşturur. MHC sınıf I molekülü ile sunulan antijeni tanıyarak aktive olur ve sitotoksik fonksiyon yaparlar. Savunmada virüs, parazit ve hücre içi bakteri ile enfekte hücreler, tümör hücreleri, doku ve organ transplant hücreleri gibi organizmaya zararlı, ayrıca yabancı ve etkilenmiş hücrelere doğrudan saldıran T lenfositlerdir. Öldürme işlevi, farklılaşmasına neden olan antijeni taşıyan hücreye spesifiktir. Hedef hücreyi yok ederken diğer komşu hücreler ve kendileri zarar görmezler. Dolayısıyla çok sayıda hedef hücreyi yok edebilirler. Membran bütünlüğünü bozarak hücreyi öldürürler. Sitotoksik T lenfositlerinde immünoglobülin için Fc reseptörü bulunmaz. Bu nedenle de antikor–bağımlı hücrel sitotoksiste göstermezler (83, 82, 92, 85).

Sitotoksik T lenfositler, sunulan antijeni tanıyınca hedef hücreyle sıkı bağlantılar oluştururlar. Hedef hücreyle temas edilen bölgeye Tc lenfositlerin granülleri ekzositozla boşaltılır. Bu granül içeriklerinden perforin, ortamdaki Ca^{++} ile polimerize olarak hedef hücrede delikler oluşturur.

Bu deliklerden veya endositozla hedef hücreye giren granzimler ise sitoplâzma da bulunan kaspaz isimli enzimleri aktive ederek apoptozisi başlatır ve hücre ölümü gerçekleşir. Granzimleri aktive etmek için kullanılan ikinci yol ise kalsiyumdan bağımsızdır. Bu yolda aktive Tc lenfositlerden eksprese edilen Fas ligand (Fas L), hedef hücredeki Fas(CD95) adı verilen uyarıcı reseptörlerle ilişki kurar. Yine granzimler aktive olarak apoptozis uyarılır. Hedef hücrelere bağlanmalarında pek çok adezyon molekülü (LFA-1, ICAM-1) görev yapar (83,82,92).

2.8.5. Genel Bilgiler ve Çalışmanın Amacı

Kefir protein ve kalsiyum gibi oldukça yüksek besin değerine sahip olmakla birlikte geleneksel olarak da diyete önem veren ülkelerde yararlı bir üründür. Bununla beraber yapılmış insan beslenme ölçütlerinde bu görüş açısı fazla önem görmemiştir. Rus edebiyatının ürettiği makalelerde kefir tüketiminin etkileri olumlu olarak değerlendirilirken, batı ülkelerinde bu besin maddesine ait detaylı bilgi hâlihazırda temin edilebilir değildir. Yapılan insan temelli çalışmalarda bu fermente edilmiş süt ürünlerinin tüketiminin laktozun sindirilmesine ve toleransına yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bazı araştırmalara göre kefir içinde taşıdığı canlı mikroorganizmalar ve düzenli doz ve doz aralıklarında alındığında özellikli ve nonspesifik bağışıklık cevabı uyarmaktadır. Böylece fermente sütlerin kullanımı sonucunda immünoglobülin A üreten hücreler doz bağımlı olarak artmış, makrofaj aktiviteleri yükselmiş, yangılar sırasındaki özellikli antikor cevapları olumlu derecelere ulaşmış ve ratlarda deneysel olarak indüklenmiş muhtemel kanser oluşumları önlenmiştir. Bu çalışmada kefir kullanımının insanlarda bağışıklık sistem parametreleri üzerinde in vivo etkilerini araştırmayı planladık. Olası pozitif ve negatif etkilerinin açığa çıkması ile kefir kullanımının hem daha güvenli hem de daha yaygın olarak kullanılması suretiyle insan sağlığına pozitif yönde katkıda bulunması nihai hedeflerimizdendir.

3. MATERYAL METOD

Çalışmamız prospektif, randomize olarak planlanmıştır. Araştırmamıza 18 sağlıklı Süleyman Demirel Üniversitesi çalışanı katılmış olup bu çalışanların 15'i erkek ve 3'ü de kadındır. Bu çalışanların yaşları 30 ile 60 arasında değişmektedir. Çalışmaya katılan bayanların hiçbiri hamile değildir. Çalışma süremiz 9 hafta olarak belirlenmiştir. Çalışanlar arasında boy, kilo ve vücut kitle indeksi olarak farklılıklar bulunmamaktadır. Olgularımız sağlıklı kontrol grubu olmuştur. Bu olgulardan süte allerjileri veya intoleransları olanlar, çalışma sırasında atopik belirtiler gelişenler, çalışma sırasında veya çalışmaya başlamadan önceki bir ay içinde yangı geçirenler ve antibiyotik kullananlar, çalışmaya başlamadan 3 ay öncesine kadar invaziv bir işlem geçirmiş olanlar çalışmaya dahil edilmemişlerdir (93–95).

Kefir verilmeden önce gönüllülerden 2 hafta fermente ürünlerden yoksun diyet almaları rica edilmiştir. Bu yoksunluk süresi sonrası toplam 6 hafta, hafta içi günleri 200 mililitre kefir verilmiştir. Laboratuvar testleri için kefir verilmeden hemen önce (0. hafta) kefir başladıktan sonra 3. ve 6. haftalar ve kefir verilmesi kesildikten 3 hafta sonra (9. hafta) kan ve serum örnekleri toplanmıştır. Toplanan kan örneklerinden manüel olarak toplam lökosit sayısı tespit edilmiştir

Çalışmamızda fermente edilmek üzere %100 yağsız SEK süt kullanılmış ve elimizde mevcut kefir tozlarıyla karıştırılmış süt bir gece 37 derecede mayalanmaya tâbi tutulmuştur. Deneklerimiz çalışma boyunca sabah kahvaltılılarıyla beraber 200 mililitre kefirle fermente edilmiş bu ürünleri içmişler ve çalışma boyunca her 3 haftalık kefir alım aşaması ardından sabah aç karnına tam kan sonuçlarına bakılmış ve deneye adaptasyonları değerlendirilmiştir.

Akım sitometrede boyasız olarak granülosit, monosit ve toplam lenfosit oranları forward ve side scatter grafiğinden belirlenmiş, lenfosit kapısından monoklonal antikorlarla boyandıktan sonra mononükleer hücre alt gruplarının sayıları (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, Cd158a, NKG2a ve NKG2c) ölçülmüştür ve yine lökosit, lenfosit, monosit ve nötrofil alt grupları incelenerek araştırmaya yön verilmiştir.

3.1. Manuel Lökosit Sayımı

Lökosit sayma eriyiği; 30 ml glasial asetik asit, 0,4 gr kristal viole, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. EDTA'lı tüpe alınan kan lökosit sayma eriyiği ile 10 kat sulandırılarak thoma lamının sayma kamarasına yayılarak ışık mikroskobu altında sayım yapılmıştır. Bir büyük karedeki hacim $0,1 \text{ mm}^3$ tür. Bir mm^3 için sayı 10 ile ve sonra kan 10 defa seyreltildiğinden 10 ile de çarpılıp 1mm^3 'teki lökosit sayısı bulunmuştur.

3.2. Bağışıklık Dönemi

Ortalama ve standart deviasyonlar bakımından minimum ve maksimum değerler farklı lökosit ve lenfosit alt gruplarına göre Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, Calif. USA) tarafından üretilmiş bir FACS Calibur 2'li lazer sistemiyle belirlenmiştir. Lenfosit, monosit ve granüositler boyut ve granülaritelerine göre ayrılmıştır. Daha sonra fluroscein isothiocyante (FITC), phycoersthin (PE) ve perinidin chlorophyll protein (PERcp) ile özellikli monoklonal antikolarla konjuge edilerek ve böylece hücrelerle işaretlenerek detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Tam kandan akım sitometre yöntemiyle CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD158a, NKG2a ve NKG2c parametreleri ve yine lökosit, lenfosit, monosit ve nötrofil alt grupları incelenerek araştırmaya yön verilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Değerlendirilen bütün bilgiler SPSS yazılım 15,0 (SPSS Inc. Chicago 3i USA) göre analiz edilmiştir.

Her çalışma değerinin çalışmaya başlama ve sonuçları arasındaki ve ikili haftalar dâhilindeki genel istatistiksel göstergeleri non parametrik Friedman testi ile belirlenmiş ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. 2'li karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed-Rank testi kullanılmış ve Benferoni düzeltmesi yapıldıktan sonra $p < 0,0125$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Çalışmada kullanılan moAb'lar:

Anti-CD3 PE (Katalog no: 555340, BD Pharmingen, USA).

Anti-CD4 FITC (Katalog no: 555346, BD Pharmingen, USA).

Anti-CD 8 FITC (Katalog no: 555634, BD Pharmingen, USA).

Anti- CD19 PE (Katalog no: 555413, BD Pharmingen, USA).

Anti-CD56 FITC (Katalog no: 555516, BD Pharmingen, USA).

Anti-CD158 PE (Katalog no: 556063, BD Pharmingen, USA).

NKG2A (Katalog no: 550520, BD Pharmingen, USA)

NKG2C (Katalog no: 550520, BD Pharmingen, USA)

Çalışmada CD3 FITC/CD4 PE, CD3 FITC/CD8 PE, CD3(negatif) FITC/CD19 PE, CD3 PE/CD56 FITC ve CD3(negatif) PE/CD56 FITC ile birlikte ikili, CD158a PE/CD56 FITC/CD3 PerCp, CD158a PE/CD56 FITC/CD3(negatif) PerCp, NKG2a PE/CD56 FITC/CD3 PerCp ve NKG2a PE/CD56 FITC/CD3(negatif) PerCp ile birlikte üçlü olarak diğer moAb'lar ise ayrı tüplerde çalışıldı.

1. EDTA'lı tüplere alınan bir hacim (2 ml) venöz kan örneği beş hacim (10 ml) lysis buffer ile 50 ml'lik falcon tüplerinde oda ısısında eritrosit lizisine tabi tutuldu (Lysis buffer: 0,15 M NH₄Cl, 0,01 M KHCO₃, 100 µM EDTA, 1000 ml distile su).
2. 800 devirde (rpm) 10 dakika santrifüj edildikten sonra pellet 25 ml phosphate buffer saline(PBS)'de çözülerek 1500 devirde 10 dakika santrifüj edildi (PBS: 0,005 M K₂HPO₄, 0,005 M KH₂PO₄, 0,014 M NaCl, 1000 ml distile su).
3. Pellet 2 ml PBS'te çözülüp 100'er µl hücre süspansiyonu 75 mm'lik polipropilen tüplere aktararak moAb'larla birleştirildi. 20 dakika oda ısısında karanlık alanda inkübasyon yapıldı.
4. Tüpler PBS ile doldurulup 1500 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra pellet 300 µl PBS ile sulandırılıp akım sitometri cihazında okutuldu.

Tüm numuneler akım sitometri ile (FACS Calibur 3A, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) çalışıldı ve sonuçlar CellQuest Pro yazılımı (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ile analiz edildi. Sonuçlar forward scatter / side scatter ve side scatter / CD45 grafikleri yardımıyla oluşturulan lenfosit kapısındaki hücrelerin CD ile işaretli hücrelere oranları olarak hesaplandı ve yüzde olarak kaydedildi.

4. BULGULAR

Tablo 3 - Tam kandaki lökosit sayılarının ($\times 10^3$) 0., 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | P |
|----------------|-------|--------------------|-----------------------|----------|
| LOKOSİT | | | | (0,016)* |
| | 0 – 3 | 7,45 (4,30–13,10) | – 6,75 (4,90–8,91) | 0,004 |
| | 0 – 6 | 7,45(4,30–13,10) | – 6,90 (3,80-10,50) | 0,007 |
| | 0 – 9 | 7,45(4,30- 13,10)- | 7,00 (5,40- 10,00) | 0,244 |
| | 3 – 6 | 6,75 (4,90 – 8,40) | – 6,90 (3,80 – 10,50) | 0,421 |

Lökositler 3. ve 6. haftalarda 0. haftaya göre anlamlı oranda düşmüştür.

Tablo 4 - Nötrofil parametrelerinin ikili haftalar ve toplamdaki dağılımı

| | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,14)* |
|-----------------|-------|----------------------|-------------------------|---------|
| NÖTROFİL | 0 – 3 | 66,15 (30,00–85,20) | – 58,80 (40,00–70,00) | 0,058 |
| | 0 – 6 | 66,15 (30,00 -85,20) | – 57,90 (44,90 – 70,80) | 0,035 |
| | 0 – 9 | 66,15(30,00 – 85,20) | – 56,70 (43,30 – 6670) | 0,016 |
| | | | | |
| | 3 – 6 | 58,80(40,00 – 70,00) | – 57,90 (44,90- 70,80) | 0,983 |

Nötrofiller 3. , 6. ve 9. haftalarda 0. haftaya göre değişmemiştir.

Tablo 5 - Tam kandaki lenfosit yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| LENFOSİT | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,025)* |
|-----------------|-------|----------------------|-------------------------|----------|
| | 0 – 3 | 25,50(11,80 – 47,00) | – 29,15 (6,30 – 51,40) | 0,472 |
| | 0 – 6 | 25,50(11,80 – 47,00) | – 32,30 (22,00- 49,60) | 0,005 |
| | 0 – 9 | 25,50(11,80 – 47,00) | – 32,30 (19,50 – 48,40) | 0,012 |
| | 3 – 6 | 29,15(6,30 - 51,40) | – 32,30(22,00 – 49,60) | 0,094 |

Lenfositler 9. haftada 0. haftaya göre anlamlı oranda artmıştır.

Tablo 6 - Tam kandaki monosit yüzdelерinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| MONOSİT | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,002)* |
|----------------|-------|--------------------|----------------------|----------|
| | 0 – 3 | 4,20(1,30 – 24,50) | – 6,45(4,00 – 52,10) | 0,001 |
| | 0 – 6 | 4,20(1,30 – 24,50) | – 6,80(0,80 – 10,80) | 0,031 |
| | 0 – 9 | 4,20(1,30 – 24,50) | – 6,90(3,30 – 9,20) | 0,007 |
| | 3 – 6 | 6,45(4,00 – 52,10) | – 6,80(0,80–10,80) | 0,472 |
| | 6 – 9 | 6,80(0,80 – 10,80) | – 6,90(3,30 – 9,20) | |

Monositler 3. ve 9. haftalarda 0. haftaya göre anlamlı oranda artmıştır

Tablo 7 - CD3+CD56+CD158+ hücre yüzdelерinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | P |
|---------------|-------|------------------|------------------|----------|
| CD3+ | | | | (0,014)* |
| CD56+ | 0–3 | 2,75(0,20–9,10) | 0,80(0,00- 9,20) | 0,028 |
| CD158+ | 0–6 | 2,75(0,20–9,10) | 0,10(0,00–3,10) | 0,000 |
| | 0–9 | 2,75(0,20–9,10) | 0,30(0,00–5,10) | 0,004 |
| | 3–6 | 0,80(0,00- 9,20) | 0,10(0,00–3,10) | 0,015 |
| | 3–9 | 0,80(0,00- 9,20) | 0,30(0,00–5,10) | 0,085 |
| | 6–9 | 0,10(0,00- 3,10) | 0,30(0,00–5,10) | 0,035 |

CD3+, CD 56+ ve CD158+ de 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir düşüş ve 9. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artışa rastlanmıştır.

Tablo 8 - CD3-(negatif)CD56+CD158+ hücre yüzdelерinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3- | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,030)* |
|---------------|-------|-------------------|-------------------|----------|
| CD56+ | 0–3 | 4,38(0,00- 10,10) | 2,55(0,00–13,31) | 0,170 |
| CD158+ | 0–6 | 4,38(0,00- 10,10) | 3,20(0,00- 11,50) | 0,446 |
| | 0–9 | 4,38(0,00- 10,10) | 4,10(0,30- 16,60) | 0,472 |
| | 3–6 | 2,55(0,00–13,30) | 3,20(0,00- 11,50) | 0,538 |
| | 3–9 | 2,55(0,30- 13,30) | 4,10(0,30- 16,60) | 0,022 |
| | 6–9 | 3,20(0,00- 11,50) | 4,10(0,30- 16,60) | 0,020 |

CD3- CD56+ ve CD158+ parametrelerinde haftalar arasında değişiklikler olmamıştır.

Tablo 9 - CD3(negatif)CD56+ hücre yüzdelerinin 0. 3. 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | P |
|------------------|-------|--------------------|--------------------|----------|
| CD3-CD56+ | | | | (0,488)* |
| | 0-3 | 9,20(0,40- 25,90) | 9,30(1,90 – 19,30) | 0,276 |
| | 0-6 | 9,20(0,40- 25,30) | 8,07(0,00- 20,10) | 0,184 |
| | 0-9 | 9,20(0,40- 25,90) | 10,65(3,20–18,64) | 0,663 |
| | 3-6 | 9,30(1,90 – 19,30) | 8,07(0,00–20,10) | 0,014 |
| | 3-9 | 9,30(1,90 – 19,30) | 10,65(3,20- 18,64) | 0,486 |
| | 6-9 | 8,07(0,00–20,10) | 10,65(3,20- 18,64) | 0,127 |

CD3- ve CD56+ parametrelerinde haftalar arasında değişiklikler olmamıştır.

Tablo 10 - CD3+CD56+ hücre yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3+CD56+ | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,874)* |
|------------------|-------|------------------|------------------|----------|
| | 0-3 | 3,95(0,20–7,60) | 3,65(1,10–24,00) | 0,943 |
| | 0-6 | 3,95(0,20–7,60) | 4,05(0,30–9,44) | 0,542 |
| | 0-9 | 3,95(0,20–7,60) | 3,65(0,70–9,00) | 0,571 |
| | 3-6 | 3,65(1,10–24,00) | 4,05(0,30–9,44) | 0,619 |
| | 3-9 | 3,65(1,10–24,00) | 3,65(0,70–0,90) | 0,122 |
| | 6-9 | 4,05(0,30–9,44) | 3,65(0,70–9,00) | 0,292 |

CD3+ ve CD56+ parametrelerinde haftalar arasında değişiklikler olmamıştır.

Tablo 11 - CD3-(negatif) CD56+ NKG2a+ hücre yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3n | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,001)* |
|------------------------------|-------|-------------------|------------------|----------|
| CD56+ NKG2a | 0-3 | 7,75(0,10- 29–70) | 4,80(0,90–15,70) | 0,102 |
| | 0-6 | 7,75(0,10- 29–70) | 2,95(1,13–11,30) | 0,006 |
| | 0-9 | 7,75(0,10- 29–70) | 3,10(0,10–11,30) | 0,004 |
| | 6-9 | 4,80(0,90–15,70) | 2,95(1,13–11,30) | 0,140 |

CD3- CD56+ NKG2a parametrelerinde 6. ve 9. haftalarda 0. haftaya göre anlamlı düşüşler görülmüştür.

Tablo 12 - CD3+ CD56+ NKG2a+ hücre yüzdelерinin 0., 3., 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3+CD56+ NKG2a+ | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,006)* |
|-----------------------------|-------|------------------|------------------|----------|
| | 0-3 | 2,65(0,10-15,00) | 2,20(0,80-8,20) | 0,500 |
| | 0-6 | 2,65(0,10-15,00) | 1,15(0,30- 3,80) | 0,002 |
| | 0-9 | 2,65(0,10-15,00) | 0,90(0,10-11,80) | 0,007 |
| | 3-6 | 2,20(0,80-8,20) | 1,15(0,30-3,80) | 0,013 |
| | 3-9 | 2,20(0,80-8,20) | 0,90(0,10-11,80) | 0,005 |
| | 6-9 | 1,15(0,30-3,80) | 0,90(0,10-11,80) | 0,459 |

CD3+ parametresinde haftalar arasında değışiklikler olmamıştır.

Tablo 13 - CD3+ hücre yüzdelерinin 0, 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | P |
|-------------|-------|--------------------|--------------------|----------|
| CD3+ | | | | (0,649)* |
| | 0-3 | 73,20(65,50-82,40) | 76,20(48,20-82,00) | 0,266 |
| | 0-6 | 73,20(65,50-82,40) | 74,35(62,40-85,90) | 0,384 |
| | 0-9 | 73,21(65,50-82,40) | 74,00(63,00-81,50) | 0,983 |
| | 3-6 | 76,20(48,20-82,00) | 74,35(62,40-85,90) | 0,811 |
| | 3-9 | 76,20(48,20-82,00) | 74,00(63,00-81,50) | 0,653 |
| | 6-9 | 74,35(62,40-85,90) | 74,00(63,00-81,50) | 0,687 |

CD3+ CD56+ NKG2a+ parametrelerinde 6. ve 9. haftalarda 0. haftaya ve 9. haftada 3. haftaya göre anlamlı düşüşler görülmüştür.

Tablo 14 - CD3+CD4+ hücre yüzdelерinin 0., 3, 6 ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3+ CD4+ | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,284)* |
|----------------------|-------|--------------------|----------------------|----------|
| | 0-3 | 42,08(32,70-54,40) | 46,70(26,90-56,40) | 0,016 |
| | 0-6 | 42,08(32,70-54,40) | 46,36(28,00- 53,00) | 0,102 |
| | 0-9 | 42,08(32,70-54,40) | 44,15(37,60 - 57,96) | 0,107 |
| | 3-6 | 46,70(26,90-56,40) | 46,36(28,00 - 53,00) | 0,327 |
| | 3-9 | 46,70(26,90-56,40) | 44,15(37,60-57,96) | 0,107 |
| | 6-9 | 44,36(28,00-53,00) | 44,15(37,60-57,96) | 0,828 |

CD3+ ve CD4+ parametrelerinde haftalar arasında değışiklikler olmamıştır.

Tablo 15 - CD3+CD8+ hücre yüzdelерinin 0. 3. 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3+ | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,003)* |
|-------------|--------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| CD8+ | 0-3 | 25,50(15,40-38,70) | 24,30(14,90-42,30) | 0,309 |
| | 0-6 | 25,50(15,40-38,70) | 26,10(18,65-42,90) | 0,031 |
| | 0-9 | 25,50(15,40-38,70) | 27,40(19,65-38,80) | 0,004 |
| | 3-6 | 24,30(14,90-42,30) | 26,10(18,65 - 42,90) | 0,381 |
| | 3-9 | 24,30(14,90-42,30) | 27,40(19,65-38,80) | 0,016 |
| | 6-9 | 26,10(18,65 - 42,90) | 27,40(19,65-38,80) | 0,163 |

CD3+ ve CD8+ parametrelerinde 9. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir yükselme görülmüştür.

Tablo 16 - CD3-(negatif) CD19+ hücre yüzdelерinin 0. 3. 6. ve 9. haftalardaki dağılımı

| CD3- | Hafta | Median (min-max) | Median (min-max) | (0,006)* |
|--------------|--------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| CD19+ | 0-3 | 6,40(3,30-29,00) | 9,19(3,70-30,87) | 0,006 |
| | 0-6 | 6,40(3,30-29,00) | 10,30(1,56-32,50) | 0,005 |
| | 0-9 | 6,40(3,30-29,00) | 9,20(3,40-20,00) | 0,043 |
| | 3-6 | 9,19(3,70-30,87) | 10,30(1,56-32,50) | 0,435 |
| | 3-9 | 9,19(3,70-30,87) | 9,20(3,40-20,00) | 0,360 |
| | 6-9 | 10,30(1,56-32,50) | 9,20(3,40-20,00) | 0,170 |

CD3- ve CD19+ parametrelerinde 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artış görülmüştür.

5. TARTIŞMA

İlk kez ortaya çıktığı düşünülen Kuzey Kafkasya'dan, önce Karadeniz ve Hazar Denizi arasında yoğun olarak kullanılmakta olan kefirin yüzyıllarca Rus literatüründe faydalı etkileri olduğu düşünülmüştür, rafine ürünlerle beslenen özellikle Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'daki insanlar arasında bu ürünleri tüketmeye bağlı olarak ortaya çıkan rahatsızlıklar ve doğal ürünleri kullanmaya dair yeni gelişen organik gıdalara eğilim neticesinde, bu fermente ürünlere ait kabul edilebilir araştırmalarda hem invitro hem de nadir yapılan invivo insan çalışmalarında artış kaydedilmiştir.

Kefirin hem hücresel hem de sıvısal bağışık sistem üzerine aktive edici etkisi bulunmaktadır. Olivares ve arkadaşlarının bir çalışmasında (95) *L. Gasseri* ve *L.coryniformis* alan insanlarda CD3, CD48, CD19,CD45RO ve CD56 parametrelerine bakılmış, sadece CD56 da 2 hafta sonra anlamlı artış olmuş yine CD56 da kontrol hastalarına göre artış saptanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ise CD3n(negatif)56+ ve CD3+CD56+ profillerinde çalışma haftaları göz önüne alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Marcus ve arkadaşlarının 2003 tarihli bir araştırmalarında kefirin CD'56yı anlamlı, CD3 ve CD19'u ise istatistiksel olarak anlamsız derecede artırdığını saptamışlardır. Ayrıca akut stresin bağışıklıkta reaktivasyona, kronik stresin ise farklı olarak immün supresyona neden olduğunu saptanmıştır (96). Bizim tarafımızdan yapılan bu çalışmada ise CD3 parametreleri kendi mecralarında seyretmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. CD3n (negatif) 19 parametrelerinde 0–6 haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak bir artış gözlenmiştir.

Alvarez ve arkadaşları tarafından İspanya Madrit'te 2003'te yapılan bir çalışmada sınav stresi altındaki dökumante edilen öğrencilerin bağışıklık sisteminin baskılandığı gözlenmiştir (96). Bu çalışmada *Lactobacillus casei DN-114001* ilave edilmiş fermente sütlerin etkisiyle oluşturulmuş yoğurt kültürlerinin akademik sınav stresi altındaki öğrencilerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Methods Üniversitesinde yapılan bu çalışmada öğrenciler, sınavdan 3 hafta öncesinde ve aynı zamanda sınav periyodu boyunca olmak üzere 6 hafta süresince her gün bir bardak yeni sağılmış süt (kontrol grubu, n = 63) ve her gün 100 mililitre

porsiyonunda fermente edilmiş süt (tedavi grubu n=73) içenler olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır.

Çalışma başında (Faz 0) ve çalışma sonunda (Faz1) olmak üzere kaygı ve immünolojik parametreler değerlendirilmiştir. Sonuçlar Faz 0 ve Faz1 arasındaki fark olarak bilgi şeklinde elde edilmiştir. Bu fark, Faz1 sonuçlarından Faz0 sonuçlarının çıkarılmasıyla elde edilmiştir ve bu da ‘Tedavi Etkisi’ olarak isimlendirilmiştir. Ortalama kaygı (+SE) bütün öğrenciler için yapılan 6 haftalık çalışma boyunca ($p<0.05$) $40.74 +$ veya $- 2.50$ ’den $61.19 +$ veya $- 2.64$ ’e doğru (yüzde oranlarında) belirgin olarak artmıştır. Bu artış tedavi ve kontrol gruplarında benzer şekilde olduğu için tedavi etkisinde bir değişiklik olmamıştır. Öte yandan, 6 haftalık çalışma boyunca, lenfositlerin mutlak sayılarında ortalama değişiklikler üzerinde önemli bir tedavi etkisi görülmüştür. Bu etki, kontrol grubunda düşmüş ($-0.04 + 0.12$ hücre $\times 10^3 / \text{mm}^3$) ve tedavi grubunda artmıştır. ($0.37 +$ veya- 0.11 hücre $\times 10^3 \text{mm}^3$)

Aynı zamanda 6 haftalık çalışma boyunca CD56 hücrelerinin mutlak sayılarındaki değişiklik olarak önemli bir tedavi etkisi de olmamıştır. CD56 hücrelerinin ortalama mutlak değeri kontrol grubunda ($p<0.05$) ($-51.97 +$ veya- 21.33 hücre/ mm^3) düşmüşken, tedavi grubunda aynı kalmıştır. ($17.29 +$ veya- 17.27 hücre/ mm^3)

Bu çalışma boyunca ortalama serum kortizol seviyesi kontrol ($4.30 +$ veya- 0.98 nanogram/desilitre) ve tedavi gruplarında ($1.75 +$ veya- 1.05 nanogram/desilitre) artmış iken her iki değer arasında ($p=0.062$) önemli bir tedavi etkisi değişikliği bulunmamıştır.

Böylece söylenebilir ki, *Lactobacillus casei* DN-14001 ilave edilmiş yoğurt kültürleriyle fermente olmuş sütler akademik sınav stresi altındaki şahıslarda CD56 belirtecine sahip hücreler ve lenfositlerin sayılarını düzenleyebilmişlerdir.

Pujol P. ve ark. nın 2000’de katıldıkları bu çalışmada *Lactobacillus casei* DN-114001 ve yoğurt kültürleri ile fermente edilmiş süt ürünlerinin eklendiği diyetlerle beslenen bu öğrencilerin 6 haftalık bu diyet döneminin ardından periferik kan NK hücrelerinin düşüşünün önlendiği saptanmıştır (97).

Genç sağlıklı bayanlar arasında yapılan başka bir çalışmada, dört haftalık bir yoğurt tüketiminin hücrel bağışıklıkları üzerinde uyarıcı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Yoğurt alımıyla yapılan bu çalışmada CD3+/CD16+/CD56+ sitotoksik T hücrelerinde bir artma gözlenmiştir, öyle ki bu probiotik alan grupta bu olgu daha belirgindir.

63 ve 84 yaşları arasındaki 30 sağlıklı yaşlı gönüllünün katıldığı bir çalışmada, bu bireylerde T (CD3+), yardımcı T (CD4+), doğal öldürücü (CD3-/CD56+) hücrelerde (toplam lenfositlerin yüzdeleri olarak) artışlara rastlanmıştır ki bu şahısların üç hafta boyunca *B. lactis* içeren süt tükettikleri bilinmektedir, fakat bu artışların fizyolojik sınırlarda olduğu bulunmuştur (98). Bizim çalışmamızda T(CD3+) ve T yardımcı (CD4+) belirteçlerinde 9 haftalık periyotta ve 2'li haftalar arasında karşılıklı seviyelerde önemli değişikliklere rastlanmamıştır.

Farklı hücre alt popülasyonları arasındaki fizyolojik dengelerde derin değişiklikler istenmemektedir, sitotoksik hücre sistemleri üzerinde hafif bir uyarılma kanser seviyesinde önemli bir rol oynayabilmektedir (99). Günlük konvansiyonel yoğurt yerine probiotik alınmasının genç sağlıklı kadınlarda hücrel bağışıklığı uyarma etkisinin çalışıldığı bu araştırmada sadece probiotik alan grupta sitotoksik T lenfositlerinin (CD3+CD16+CD56+) belirli olarak arttığı gözlemlenmiştir. (100). Bizim çalışmamızda ise CD3+/CD56+ bakımından normal parametrelerin dışında farklı bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Yoğurt ve bir probiotik ürünün bağışıklık sistemine etkilerinin karşılıklı olarak kıyaslanarak çalışıldığı bu çalışmada probiyotiğin alınmasından sonra sitotoksik aktivitenin arttığı ve alımın kesilmesinin ardından bu etkilerin devam ettiği gözlemlenmiştir. Öte yandan probiyotik ve konvansiyonel yoğurt grupları arasında bağışıklık sistemine etkileri açısından bir farklılığa rastlanmamıştır

Bağışıklığı azalmış olan yaşlılarda periferik dolaşımdaki total, yardımcı ve aktive edilmiş T lenfosit alt grup fenotiplerinin yüzdeler oranlarında düşüşler belirlenmiştir (101).

Bu çalışmada *B. lactis HN019* tüketiminin hücrel bağışıklık fonksiyonlarını, lökosit fagositozunu ve tümörisidal aktiviteyi artırdığı gözlenmiştir.

Tanımlanmış probiyotik suşları tüketen yetişkinlerde doğal hücresel bağışıklığın arttığı bulunmuştur (102–103).

Kefirin alınmasıyla beraber doğal öldürücü hücre aktivitesi ve CD56 sayısı artar. CD56'nın değişiklikleri doğal öldürücü hücrelerinin değişikliklerine bağlıdır. Doğal öldürücü hücrelerin artmasıyla beraber yangılarda azalma olur. Kefirin alınmasıyla beraber yardımcı T hücrelerin aktivitesi ve CD3'lerin ekspresyonu, ayrıca B hücrelerinin aktiviteleri ve CD19 ekspresyonu artar (102,103).

Probiyotikler için yapılan başka bir çalışmada farelere *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus acidophilus* içeren konvansiyonel yoğurdun, *S. thermophilus*, *L. Bulgaricus* ve *Bifidobacterium* içeren üçlü probiyotik grubun ve kontrol grubu olarak yağsız sütün verildiği 14 günlük bir beslenme periyodu uygulanmıştır (104). Bu periyodun sonunda hayvanların peyer plakları ve dalakları çıkarılmış ve lenfositleri akım sitometriyle fenotipik olarak bir analize tabi tutulmuştur. Yapılan bu çalışmada *Lactobacillus acidophilus* ve *bifidobacterium* içeren yoğurdun verilmesinden sonra CD8+ T lenfositlerin, B220+ B hücrelerinin lenfosit alt grupları olarak yüzdelerinde herhangi bir etkileri olmamıştır. Bununla beraber CD4+ yardımcı T hücrelerinin yüzdelerinde bir artışa rastlanmamıştır.

Bu çalışmaya göre toplamda sistemik ve mukozal bağışıklık kompartmanlarında lenfositlerin dağılımları arasında 2 haftalık konvansiyonel ve probiyotik içerikli yoğurtların tüketilmesinden sonra çok fazla bir etki değişikliğine rastlanmamıştır.

Bizim planladığımız 9 haftalık kefir tüketim evreleri dışında, sağlıklı insanlar üzerinde lenfosit subgruplarının araştırıldığı çalışmanın ardından CD3+ parametrelerinde bir değişiklik olmamış, CD3+ CD4+ ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. CD3+CD8+ sitotoksik hücre yüzey belirteçlerine yönelik yaptığımız çalışmada çalışma başındaki taban ölçümlerine göre 9. hafta çalışma sonu değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı hafif bir yükselme olmuştur. Yani, probiyotik tüketimi sonunda hafif de olsa bir miktar sitotoksik hücre yanıtlarında bir artış görülebilmiş ve sitotoksik aktivite artmıştır.

Ayrıca CD19 yüzey belirteçlerinde 0. haftaya göre 6. hafta sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa rastlanmıştır, yani humoral bağışıklığa etki yönünden olumlu bir kıpırdanma tespit edilmiştir.

Amacı, anoreksia nervroza hastalarında yoğurdun belirgin bağışıklık parametrelerini değişip değişmediği olan bir çalışmada CD4+/CD8+ oranı araştırıldığında kontrol grubunda yoğurtla tedavi edilmek istenen anoreksia nervozalı hastalara göre önemli bir düşüş görülmüştür (105). CD8+ alt grup seviyesi yoğurt tüketmeyen sağlıklı kontrol grubunda ve yoğurt tüketmeyen anoreksia nervozalı kontrol grubunda belirgin bir şekilde yükselmiştir. Lökosit ve lenfosit sayıları bütün çalışma boyunca anoreksia nervozalı hastalarda sağlıklı adolesanlara göre düşük bulunmuştur. Araştırma daha da derinleştirildiğinde 10 haftalık süt alımından sonra sağlıklı adolesan ve yoğurtla beslenen anoreksia nervozalı hasta grubunda CD8+ T sitotoksik hücrelerinde önemli bir artışa rastlanmamıştır. Yapılan çalışma aynı zamanda göstermektedir ki, 10 hafta sütle beslenen anoreksia nervozalı hastalarda CD4+/CD8+ oranı belirgin bir şekilde düşmüştür.

Yoğurdun anoreksia nervozalı hastalarda CD4+/CD8+ oranında gözlenen düşüşü önlemede güzel bir alternatif olduğu gözlemlenmiştir. Öyle ki, insanlarda CD4/CD8+ oranının 1,5'ten düşük olması bağışıklığın baskılanması ile koreledir (106).

Kefirin hem hücresele, hem de sıvısal bağışıklık sistemi üzerinde aktive edici etkisi bulunmaktadır. Kefir genel olarak bağışıklık sistemini enfeksiyonlara karşı hazır tutmaktadır.

Probiyotikler hakkında yapılan bir başka çalışmada Oliver ve arkadaşları CD3,CD4,CD8,CD19 ve CD56 belirteçlerine bakmış, probiotik içeren fermente ürünlerin alımından sonra, sadece CD56'da 2 hafta sonra anlamlı bir artış olmuştur (107). Yine CD56 da kefir almayan kontrol grubuna göre önemli bir artış saptanmıştır. Marcus ve arkadaşları (2004) çalışmalarında kefirin CD56'yı anlamlı CD3+ ve CD19'u ise istatistiksel olarak anlamsız bir derecede artırdığını saptamışlardır. Ayrıca akut stresin bağışık reaktivasyona, kronik stresin ise, bağışık baskılamaya neden olduğunu saptamışlardır (108).

Ayrıca Nova ve arkadaşları *L. Bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* (yoğurtta en fazla bulunan probiyotikler) verilen hastalarda CD4+/CD8+ oranının arttığını saptamışlardır (109). Marcus ve arkadaşlarının 2004'te yaptıkları bir çalışmada tıp fakültesi öğrencilerinin akademik final sınavlarında yaşadıkları stresin araştırılması aşamasında, stresin doğal öldürücü hücre sayısı ve aktivitelerini azalttığı (108) ve CD4+/CD8+ oranını düşürdüğü gözlenmiştir. Stresin verilen probiotiklerle geçip öğrencilerin rahatlayıp, rahatlamadıklarının araştırıldığı bu dönemde, strestekilerin CD56 hücre sayılarının düştüğü (110) görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, stresli ortamlarda probiotik alındığı zaman CD8+ T hücre sayılarının düştüğü gözlemlenmiştir. Böyle bir durumda CD56 hücre sayıları aynı kalmıştır. CD 56'lı hücrelerin aynı kalmasının sebebi doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonudur. Doğal öldürücü hücre yüzey inhibitör reseptörü olan NKG2a ve CD56, lenfositler üzerindeki TH1 yolağını değil, TH2 yolağını beraber aktive eder. NKG2a sitotoksik hücreler üzerinde ekspresse olmuşken, aktive yardımcı T hücreler üzerinde de bulunmaktadır (104). TH2 yolağı aktive edildiği zaman, inhibitör etki gösterir ve NKG2a reseptörünü ve CD56 belirteçini aktif hale getirir. TH2 yolağı ile TH1'in proinflatuvar etkileri regüle edilmiş olur. Öyle ki, IL-10 ve transforming growth factor-beta aktive edilmiş olur.

TH1 yolağı ise NKG2c reseptörü yoluyla aktive edilir. Bu durumda CD56 seviyesinde artma olmaz (108).

Bizim çalışmamızda bulunan pozitif değerlerin dışında, anlamsız istatistiksel analizlerin sebebi uygulama süresi, alınan probiotik dozu, kefir hazırlamak için kullanılan sütün ısısı, sağıldığı hayvanların sağlık durumu, beslendiği ortam ve probiotik suşların genel özellikleri olabilir. Önemli olan ortaya çıktığı bölgeden dünyaya yayılan bu fermente süt ürününün olumlu ve olumsuz yönlerinin iyi bir şekilde araştırılması ve halihazırda elimizde bulunan bu değerlerin toplum sağlığına olan katkısının artırılmasıdır.

Sonuç olarak, kefir verilen grupta 0. hafta ile karşılaştırıldığında 3. ve 6. haftalarda toplam lökosit sayıları azalmış, nötrofil sayılarında anlamsız da olsa azalma, yine 0. hafta ile karşılaştırıldığında 6. ve 9. haftalarda lenfosit sayıları ve 3. ve 9. haftalarda ise monosit sayılarında artma saptanmıştır. Lenfosit alt gruplarının

akım sitometri ile yüzdelerinin ve aktivitelerine bakıldığında CD3+ CD8+ hücrelerde 0. ve 9. haftalar arasında anlamlı artma, CD3(-) CD19+ hücrelerde 0. hafta ile karşılaştırıldığında 3. ve 6. haftalar anlamlı artma kaydedilmiştir. NK-T hücreleri üzerinde CD 158 ekspresyonunda anlamlı azalma saptanırken NK hücreleri üzerinde CD158 ekspresyonunda bir fark saptanmamıştır. NK ve NK-T hücreleri üzerinde NKG2a ekspresyonunda 0. hafta ile karşılaştırıldığında 6. ve 9. haftalarda anlamlı bir düşme saptanmıştır.

Bu bulgular ışığında kefirin lökositler ve efektör hücreler olan nötrofiller üzerinde azalma ancak hem Th1 yanıtın efektör hücresi olan CD8+ hücrelerde hem de Th2 yanıtın efektör hücresi olan CD19+ hücrelerde artışlar kaydedilmiştir. Böylece immün sistemin dışarıdan gelecek antijene karşı teyakkuzda (alert) hale gelmesi ancak bu yanıtın da kontrollü olabilmesi için nötrofil gibi efektör hücrelerinde sayılarının azaldığı gözlemlenmektedir. Kefirin içinde bulunan bakterilerin vücut tarafından patojen olarak algılanmadığı nötrofil sayılarındaki azalmadan anlaşılmaktadır. Kefir alımı sonucu NK-T hücresinin regülasyonunda görev yapan CD158 molekülünün ekspresyonunun azalmış olması bu hücrelerin abartılı yanıt vermelerini engellemektedir. NK hücrelerinin Th2 yanıtını arttıran ve Th1 yanıtını azaltan NKG2a ekspresyonunun azalması kefirin allerjik yanıtta abartılı çalışan Th2 yanıtının regülasyonunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada kefir kullanımının insanlarda bağışıklık sistem parametreleri üzerinde in vivo etkilerini araştırmayı planladık.

Olası pozitif ve negatif etkilerinin açığa çıkması ile kefir kullanımının hem daha güvenli hem de daha yaygın olarak kullanılması suretiyle insan sağlığına pozitif yönde katkıda bulunması nihai hedeflerimizdendir.

Çalışmamız prospektif ve randomize olarak planlanmıştır. Araştırmamıza Süleyman Demirel Üniversitesinde çalışan 18 sağlıklı gönüllü katılmıştır. Kefir verilmeden önce gönüllülerden 2 hafta fermente ürünlerden yoksun diyet almaları, bu yoksunluk süresi sonrasında toplam 6 hafta, hafta içi günleri 200 mililitre kefir verilmiştir. Laboratuvar testleri için, kefir verilmeden hemen önce (0. hafta) kefir başladıktan sonra 3. ve 6. haftalar ve kefir verilmesi kesildikten 3 hafta sonra (9. hafta) kan ve serum örnekleri toplanmıştır. Akım sitometrede boyasız olarak granülosit, monosit ve lenfosit oranları belirlenmiş, lenfosit kapısından monoklonal antikolarla boyandıktan sonra mononükleer hücre alt gruplarının lenfositlere göre yüzdeleri (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD158a, NKG2a ve NKG2c) ölçülmüştür.

Kefir verilen grupta 0. hafta ile karşılaştırıldığında 3. ve 6. haftalarda toplam lökosit sayıları azalmış, yine 0. hafta ile karşılaştırıldığında 6. ve 9. haftalarda lenfosit sayıları ve 3. ve 9. haftalarda ise monosit sayılarında artma saptanmıştır.

Lenfosit alt gruplarının akım sitometri ile yüzdelerinin ve aktivitelerinin bakıldığında CD3+CD8+ hücrelerde 0. ve 9. haftalar arasında artma, CD3(-)CD19+ hücrelerde 0. hafta ile karşılaştırıldığında 3. ve 6. haftalarda artma kaydedilmiştir. NK-T hücreleri üzerinde CD158 ekspresyonunda anlamlı azalma saptanırken, NK hücreleri üzerinde CD158 koekspresyonunda bir fark saptanmamıştır. NK ve NK-T hücreleri üzerinde NKG2a ekspresyonunda 0. hafta ile karşılaştırıldığında 6. ve 9. haftalarda düşme saptanmıştır.

Bu bulgular ışığında kefir lökositler ve efektör hücreler olan nötrofiller üzerinde azalma ancak hem Th1 yanıtın efektör hücresi olan CD8+ hücrelerde hem de Th2 yanıtın efektör hücresi olan CD19+ hücrelerde artışa neden olmuştur.

Böylece immün sistemin dışarıdan gelecek antijene karşı teyakkuz hale gelmesi ancak bu yanıtın da kontrollü olabilmesi için nötrofil gibi efektör hücrelerinde sayılarının azaldığı gözlemlenmektedir. Kefir alımı sonucu NK-T hücrelerinin regülasyonunda görev yapan CD158 molekülünün ekspresyonunun azalmış olması bu hücrelerin abartılı yanıt vermelerini engellemektedir. NK hücrelerinin Th2 yanıtını arttıran ve Th1 yanıtını azaltan NKG2a ekspresyonunun azalması kefirin alerjik yanıtta abartılı çalışan Th2 yanıtının regülasyonunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kefir, probiyotik, İmmünomodülasyon.

7. ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the in vivo effects of kefir consumption in humans on the parameters of the immune system.

Our aim is to obtain more reliable and widespread consumption of kefir to maintain a positive effect on human health by revealing the possible positive and negative effects of kefir.

Our study has been planned as prospective and randomized study. Eighteen healthy volunteers working in Süleyman Demirel University, have participated in our study. The volunteers are initially asked to pursue a diet lacking fermented food for 2 weeks prior to kefir intake. Following this term of abstinence, the volunteers have been supplemented with 200 ml of kefir for next 6 weeks at the weekdays. Blood and serum samples have been collected from the participants for laboratory tests just before the intake of kefir (week 0) and the 3rd and 6th weeks of the intake and 3 weeks later after the termination of intake of kefir (9th week). Granulocyte, monocyte and lymphocyte percentages to total white blood cells have been detected through forward and side scatter graphics on flow cytometer in unstained state; the percentages of mononuclear cellular subgroup in respect to lymphocyte (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD158a, NKG2a, NKG2c) have been measured after they have been stained with monoclonal antibodies through lymphocyte gate.

In the group supplemented with kefir, the leukocyte rates has decreased and the rate of lymphocyte has risen in the 6th and 9th weeks and the rate of monocyte risen in the 3rd and 9th weeks compared to the week 0.

When the rates and activities of lymphocyte subgroups have been monitored through flow cytometer, a rise in CD3+ CD8+ cells between the week 0 and the 9th week; a rise in CD3(-) CD19+ cells in the 3rd and 6th weeks compared to the week 0 has been detected. A decrease has been detected on NK-T cells during CD 158 expression while no difference has been observed on NK cells during CD158 expression. A significant decrease has been detected on NK and NK-T cells during NKG2a expression in the 6th and 9th weeks compared to the week 0.

In the light of these evidences, the kefir has diminished the leukocytes and neutrophils which assume an effector nature; however, some rises have been detected in CD8+ cells, which are the effector cells of Th1 response, as well as in CD19+ cells, which are the effector cells of Th2 response. Thus, it has been detected that the immune system gets on alert against foreign antigens and that the rates of effector cells like neutrophil has diminished to establish a regulated response.

The diminished expression of CD158 which is a key factor in NK-T cell regulation as a result of kefir consumption prevents the exaggerated response of these cells.

It has been considered that the decrease in NKG2a expression, which deepens Th2 response and diminishes Th1 response of NK cells, acts a crucial role in the regulation of Th2 response by kefir, which is important in regulation of allergic immune responses.

Key Words: Kefir, Probiotic, Immunomodulation.

8. KAYNAKLAR

1. Vanderhoof JA, Young RJ. Pediatric applications of probiotics. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 451–463.
2. Floch MH, Montrose DC. Use of probiotics in humans: an analysis of the literature. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 547–570.
3. Isolauri E. The role of probiotics in paediatrics. *Curr Pediatr* 2004; 14: 104–109.
4. Broussard EK, Surawicz CM. Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutr Clin Care* 2004; 7: 104–113.
5. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001; 101: 229–238.
6. Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 279–289.
7. Hill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004; 80: 516–526.
8. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401–1412.
9. Ötleş S, Çağındı Ö, Akçiçek E. Probiotics and health. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2003; 4: 369–372.
10. Markowitz JE, Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Pediatr Clin North Am* 2002; 49: 127–141.
11. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 299–313.
12. Young RJ, Huffman S. Probiotic use in children. *J Pediatr Health Care* 2003; 17: 277–283.
13. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658–672.
14. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev* 2003; 61: 91–99.
15. Bengmark S. Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 413–436.
16. Yan F, Polk DB. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 565–571.
17. Caicedo RA, Schanler RJ, Li N, Neu J. The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. *Pediatr Res* 2005; 58: 625–628.
18. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004; 80: 516–526.
19. Ouwehand A, Vesterlund S. Health aspects of probiotics. *Drugs* 2003; 6: 573–580.
20. Gill HS 1998 Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Daily Journal* 8 535–544.

21. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H & Salminen S 2001 Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 444S-450S.
22. Perdigon G, Alvares S & Pesce de Ruis Holgado A 1991 Immuno-adjunct activity of oral lactobacillus casei: Influence of dose on the secretory immune response and productive capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research* 58 485–496.
23. Marin ML, Tejada-Simon, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z & Pestha JJ 1998 Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Protection* 61 859–864.
24. Vinderole CG, Medici M & Perdigon G 2004 Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulation capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 96 230–243.
25. Takano T 2002 Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek* 82 333–340.
26. Ouwehand AC, Tolkkio SW, Kulmala J, Salminen S & Salminen E 2000 Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 31 82–85.
27. Perdigon G, Alvares S, Medina M, Vintini E & Roux E 1999 Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 12 97–102.
28. Gorski D. Kefir: 21st century yogurt? *Dairy Foods* 1994; 95: 49.
29. Encyclopedia of fermented fresh milk products. Van Nostrand Reinhold, New York 2 Kurman J.A. and Kroger, M 1992. p.156–160)
30. Kefir. The champagne of cultured dairy product. *Cultured dairy Products J.* 29–303. Kemp, N 1984.
31. Coşkun T. (Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Pro-, pre- and synbiotics. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006; 49: 128–148.
32. YILSAY, T.Ö. KURDAL, E. 2000. Probiyotik Süt Ürünlerinin Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkisi, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (ed.m. Demirci), Tekirdağ, 279–286.
33. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: WW Lippincott, 2006.
34. Kılıc S. Probiyotik özelliğindeki laktik asit bakterileri. In: Kılıc S, eds. *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
35. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res.* 2005 May;72(2):195–202.
36. Alm L, Pettersson L. Survival rate of lactobacilli during digestion. An invitro study. *Am J Clin Nutr* 1980;33(suppl):S2543(abstr).
37. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987;70,1–12.
38. Robins-Browne RM, Path FF, Levine MM. The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. *Am J. Clin Nutr* 1981; 34.514–9.

39. Isolauri, E. Majamaa, H. Arvola, T. Rantala, I., Virtanen, E. & Arvilommi, H. (1993) Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105: 1643–1650.
40. Link-Amster, H. Rochat, F. Saudan, K. Y. Mignot, O. & Aeschlimann, J. M. (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10: 55–63.
41. Halle, C. Leroi, F. Dousset, X. & Pidoux, M. (1994) Les kefir: des associations bacteries lactiques-levures. In: *Bacteries Lactiques: Aspects Fondamentaux et Technologiques*, pp 169–182. Loriga, Uriage, France.
42. Furukawa, N. Matsuoka, A. Takahashi, T. & Yamanaka, Y. (1990) Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 43: 450–453.
43. Zacconi C. Parisi M.G. Sarra P.G. Dallavalle P. Bottazzi V. (1995). Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiol. Alim. Nutr.* 12: 387–390.
44. Çevikbaş A. Yemni, E. , Ezzedenn, F. W & Yardimici, T. (1994) Antitumoral antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother Res* 78–82.
45. Osada, K. Nagira, K. Teyura, K. Tachibana, H. Shirahata, S. & Murakami, H. (1994) Enhancement of Interferon-beta production with sphingomyelin from fermented milk. *Biotherapy* 7: 115–123.
46. Schmucker and Owen, 1997. D.L. Schmucker and R.L. Owen, Aging and the gastrointestinal mucosal immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 13 (1997),
47. Jeandel, C. Laurain, M. C. & Decottignies, F. (1996) Infectious diarrhea in the aged *Rev. Prat.* 46: 184–188
48. Owen, R. L & Lew, J. (1995) Gastrointestinal infections in the elderly. In: *Gastrointestinal and Hepatic Infections* (Surawicz, C. & Owen, R.L. eds.) , pp. 551–564. W. B. Saunders, Philadelphia, PA.
49. Schmucker D. L. Gilbert R. Jones A. L, Hradek G. Bazin H. Effect of aging on the hepatobiliary transport of dimeric immunoglobulin A in the male Fischer rat. *Gastroenterology* 1985;88:436–443.
50. De Simone, C. , Ciardi, A. , Grassi, A. Lambert-Gardini, S. Tzantzoglou, S. Trinchieri, V. Moretti, S & Jirillo, E. (1992) Effect of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 14: 331–340.
51. Van de Water J, Keen CL, Gershwin ME. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J Nutr.* 1999 Jul;129(7 Suppl):1492S-5S. Erratum in: *J Nutr* 1999 Oct;129(10):1932.
52. De Simone, C. Vesely, R. Bianchi, B. S. & Jirillo, E. (1993) The role of probiotics in modulation of immune system in man and in animals. *Int. J. Immunother.* 9: 23–28.
53. Halpern, G. M. Vruwink, K. G. Van de Water, J. Keen, C. L. & Gershwin, M. E. (1991) Influence of long term yogurt consumption in young adults *Int. J. Immunother.* 7: 205–210
54. Bilgiç S. Flow cytometry'nin çalışma mekanizması ve prensipleri. Yılmaz M.T. Deniz G.(editörler). *Flow cytometry ve Tıpta Kullanımı*. İstanbul. Bilim Medya Grup. *Aktüel Tıp Dergisi*, 1999s. P. 26–55.

55. McCoy JP, Basic principles in clinical flow cytometry. In: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE (eds). *Flowcytometry and Clinical Diagnosis*, Chicago: American Society of Clinical Pathologist Press, 1994; p.26–55.
56. Nguyen A, Henry J. Principles of Instrumentation. In: Henry J. (Ed). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20 nd Ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001, p.60–78.
57. Paxton H, Cunningham–Rundles S, and O’Gorman M.R. G. Laboratory evaluation of the Celluler Immun System. In: Henry JB (ed). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20 nd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, p.850–877.
58. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 2nd Edition. London: Chuchill Livingstone 1989;2,4
59. Abbas AK, Lichtman AH. *Temel İmmünoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi 2007; 230–61.
60. D. Male Champion B. Cooke A. , Owen M.(ed.) *The İmmune System*. In *Advanced Immunology*. 2nd Ed. London, Gower Med Publ. 1991 p.1–15.
61. Male D. Roitt I. Adaptive and Innate Immunity In *Immunology*. İn: Roitt I. Brostoff J. Male D.(Eds), 2nd Ed. London, Churchill & Livingstone. 1989 p. :1–10.
62. Janeway CA jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197–216.
63. Peter J. Delves D. Ivan M. *The İmmune System*. N. Engl. J. Med. 2000; 343,37–49.
64. Haynes BF. Fauci AS. Introduction of the İmmune System. İn.: Braunwald E. Fauci AS. Kasper DL .(eds.) . *Harrison’s Principles of İnternal Medicine*. 15nd Ed. New York, Mc Graw–Hill, 2001, p: 1805–1830.
65. Kuby H. Overview of the İmmune system and cell and organs of the immune system. İn *Immunology*. 3nd Ed. W.H. Freeman and Company, USA. 1997: 1–83.
66. Fike DJ. Cells and tissues of the immune system. İn: Sheehan C (ed.) *Clinical Immunology Principles and Laboratory Diagnosis* 2nd. Ed.Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1997 p. 7–18.
67. Kılıçturgay K. *İmmünoloji* Bursa: Nobel&Güneş Kitabevi 2003; 39–42.
68. Kılıçturgay K. *İmmünoloji* Bursa: Nobel&Güneş Kitapevi 2003; 15–20.
69. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 1999 Ankara, Sayfa 153–154.
70. Imboden JB. T Lymphocytes & Natural Killer Cells. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). *Medical Immunology*. 9nd Ed. California, Appleton & Lange, 1997, p.130–145.
71. Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol*. 1994;12.675–705.
72. Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol Today*. 1999; 20(10):463–8.
73. Chinen J, Finkelman F, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(2):489–95.

74. Samelson LE, Donovan JA, Isakov N, Ota Y, Wange RL. Signal transduction mediated by the T-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Sep 7;766:157–72.
75. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999;155–156.
76. Lehrer RI, Ganz T. Biochemistry and Function of Monocytes and Macrophages. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, eds. *Williams Hematology*, 6th edn. New York: Mc Graw Hill, 2001:865–869.
77. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* 1994; 76(2):263–74.
78. Vukmavovic-Stejic M, Tomas MJ, Noble A, Kemeny DM. Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8⁺ T cells. *Immunology* 2001; 112: 115–122.
79. Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA. Signal transduction by the T cell antigen receptor. *Semin Immunol.* 1991;3(5):313–24.
80. Bauer S, Groh V, Wu T et al. Activation on NK cells and T cells by NKG2D, receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:645–646.
81. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 224.
82. Imboden JB. T Lymphocytes & Natural Killer Cells. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). *Medical Immunology*. 9nd Ed. California, Appleton & Lange, 1997, p.130–145.
83. Kılıçturgay K. İmmünoloji. Bursa. Nobel & Güneş Kitabevi. 2003, s. :15–51.
84. Araslı M. Lökosit yüzey molekülleri. Yılmaz MT, Deniz G.(editörler). *Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı*. İstanbul: Bilim Medya Grup. Aktüel Tıp Dergisi, 1999s.21–32.
85. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998; 10(12):1969–80.
86. Thornton AM, Shevach EM CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. 1998; 188(2):287–96.
87. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest.* 2004; 114(9):1209–17.
88. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. 2005; 201(7):1061–7.
89. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prifer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 172(5):3157–66.
90. Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol.* 2007; 211(2):273–8.
91. Ciccone E, Moretta A, Moretta L. Specific functions of human NK cells. *Immunol Lett.* 1992; 31(2): 99–103.

92. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 85(1):9–18.
93. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 74, No. 6, 833–839 December 2001.
94. Nova E, Toro O, Varela P, Lopez-Vidriero I, Morande G, Marcos A *Eur J Nutr* (2006) 45:225–233.
95. Olivares M, Diaz Ropero MP, Gomez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J. (2006) The consumption of two new probiotic strains, *L. gasseri* CECT 5714 and *L. coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *Int Microbiol* 9: 47–52.
96. Marcos A, Warnberg J, Nova E, Gomez S, Alvarez A, Mateos JA, Cobo JM. (2004) The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress *Eur J Nutr* 43:381–389.
97. Nova E; Toro O; Varela P; López-Vidriero I; Morandé G; Marcos A. (2006 Jun) Effects of a nutritional intervention with yogurt on lymphocyte subsets and cytokine production capacity in anorexia nervosa patients. *Eur J Nutr*;45(4):225–33.
98. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F: CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005;26:136–140.
99. Meyer AL, Micksche M, Herbacek I, Elmadfa I *Ann Nutr Metab* 2006;50:282–289.
100. Makinodan T. Patterns of age-related immunologic changes *Nutr Rev* 1995;53:S27–31.
101. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following in ingesting off lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995;78:491–7 (Abstract).
102. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997;66(suppl): 515S-20S. (Abstract/Free Full Text)
103. Pestka JJ, Ha CL, Warner RW, Lee JH, Ustunol Z. *Food Prot.* 2001 Mar;64(3):392–5.
104. Chailleux E, Bingon JD, Peyrat MA, Godard A, Soullilleux JP (1985) Lymphocyte subsets, phytohaemagglutinin responsiveness of blood lymphocytes, and interleukin 2 production in sarcoidosis. *Thorax* 40:768–773.
105. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher CE, Penn GM, Holliday JE, Glaser R (1984) Psychosocial modifiers of immunocompetance in medical students *Psychosom Med* 46,7–14.
106. Solis B, Samartin S, Gomez S, Nova E, de la Rosa B, Marcos A (2002) Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhoea. *Eur J Clin Nutr* 56(Suppl 3):S57-S59.
107. Gary WJ, Margaret B, Sarah S et al. (1997) Impact of Dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* 313:120–123.

108. Marcos A, Warnberg J, Nova E, Gomez S, Alvarez A, Mateos JA, Cobo JM. (2004) The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress *Eur J Nutr* 43.381–389.
109. Freishtat RJ, Mitchell LW, Ghimbovschi SD, Meyers SB and Hoffman EP *Human Immunology* 66, 1223–1234 (2005) American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006 Published by Elsevier Inc.
110. Borruel N, Carol M, Casellas F, et al. (2002) Increased mucosal TNF alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 5.659–664.