

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KEFİRİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARININ SEMPTOMLARINA,
HASTA DIŞKILARINDAKİ *LACTOBACİLLUS* FLORASINA ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

İlkay YILMAZ

(Y1113.640041)

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Gıda Mühendisliği Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

Nisan , 2018





06/04/2018

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DOKTORA TEZ ONAY BELGESİ

Enstitümüz Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gıda Mühendisliği Doktora Programı Y1113.640041 numaralı öğrencisi İlky YILMAZ'ın "KEFİRİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARININ SEMPTOMLARINA, HASTA DIŞKILARINDAKİ *LACTOBACİLLUS* FLORASINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

" adlı doktora tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 29.03.2018 tarih ve 2018/06 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından ile Doktora tezi olarak edilmiştir.

	Unvan- Ad-Soyad	İmza
Danışman	Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Güner ARKUN	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Gürhan Raif ÇİFTÇİOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Gülden OMURTAG	
Üye	Prof. Dr. Kamil BOSTAN	

Tezin Savunulduğu Tarih: 06/04/2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yadigar İZMİRLİ
Enstitü Müdürü (Uhdesinde)



YEMİN METNİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Kefirin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi Ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalarının Semptomlarına, Hasta Dışkılarındaki Lactobacillus Florasına Etkilerinin İncelenmesi” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden olduğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (.../.../2018)

İlkay YILMAZ





Bilim kadınlarına,



ÖNSÖZ

Bu aşamaya kadar gelmemde çok sayıda kişinin destekleri bulunmaktadır.

Başta, üniversiteye başladığımdan itibaren her türlü desteği esirgemeyen, doktoramın tüm safhalarında bana önder olan kıymetli Doktora yürütücüm ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a tüm içtenliklerimle teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Komitesi Üyesi Sayın hocam, tıp doktoru Prof. Dr. M. Enver DOLAR'a bilimsel destekleri, gastroenteroloji alanındaki danışmanlığı, hastalara ulaşmamdaki yardımları ve tezime katılacak gönüllüleri teşvik etmesindeki destekleri için çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi Üyesi Sayın hocam Prof. Dr. Kâmil BOSTAN'a, tez çalışmam süresince desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı TEKİNER'e, Yrd. Doç. Dr. Murat AY'a, Kudret ATEŞ'e, Öğr. Gör. Kadriye TÜRKEŞŞİZ'e, Shila VAHABZADEH'e, Fatma ÜNEN'e,

Tez çalışmama katılan tüm gönüllü İnflamatuvar Bağırsak Hastalarına,

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Eker Süt A. Ş'ne ve Marka Müdürü Sn. Özge KİRAZ'a, Fullgen Biyoteknolojiden genetik mühendisi Sn. Selçuk Ahmet ALGINGİL'e, Genometri Biyoteknolojiden Elif AKYAYLA'ya, Güneş TUNÇGENÇ'e, Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Bölümünden Doç.Dr. Güven ÖZKAYA'ya,

Sabırları için, sevgili eşim Emir Hasan YILMAZ'a, sevgili kızım Zeynep Bahar YILMAZ'a ve sevgili annem, babam ve kardeşlerim İsmail ŞEHİTOĞLU'na, Mükerrrem ŞEHİTOĞLU'na, Elif ŞEHİTOĞLU'na, Egemen ŞEHİTOĞLU'na, varlığımı borçlu olduğum aziz milletime ve Türk kadınının bu günlere gelmesini sağlayan ATA'ma şükranlarımı sunarım.

Nisan 2018

İlkay YILMAZ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
ABSTRACT	xxi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları.....	3
2.1.1 Ülseratif Kolit.....	4
2.1.2 Crohn Hastalığı	4
2.2 Probiyotikler	5
2.2.1 Süt Kefiri.....	8
2.2.1.1 Kefirden İzole Edilen Mikroorganizmalar	10
2.2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri:	11
2.2.1.3 Laktoz intolerans kişilerde kefir:	12
2.2.1.4 Kefirin antibakteriyel, anti inflamatuvar etkileri:	12
2.3 İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında probiyotikler	13
2.3.1 İnflamatuvar bağırsak hastalığında probiyotiklerin etki mekanizmaları	13
2.3.2 İnflamatuvar bağırsak hastalığında bakteriyel floranın rol oynadığını	
gösteren veriler	13
3 GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1 Gereç.....	15
3.1.1 Hastalar:	15
3.1.2 Mikrobiyolojik Tayinler İçin Gereçler.....	20
3.1.2.1 Örnek hazırlama ve homojenizasyon.....	20
3.1.2.2 Besiyerleri	20
3.1.2.3 Boyalar	21
3.1.2.4 Çözeltiler.....	21
3.1.2.5 Test bakterileri	21
3.1.2.6 Antibiyotik Diskler	22
3.1.3 Maltitoff Ms	22
3.1.4 API 50 CH.....	22
3.1.5 PCR	22
3.2 Yöntem	23
3.2.1 Mikrobiyolojik incelemeler.....	23
3.2.1.1 Örnek Hazırlama	23
3.2.1.2 Besiyerlerine Ekim.....	23
3.2.1.3 Toplam canlı bakteri sayımı.....	24
3.2.1.4 İzolasyon, İdentifikasyon	24

3.2.2	İzolatların asit toleranslarının tespiti	27
3.2.3	İzolatların safra tuzu toleranslarının tespiti	27
3.2.4	İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının tespiti	27
3.2.5	İzolatların antimikrobiyal etkilerin tespiti	28
3.2.6	Moleküler İncelemeler:	29
3.2.2.1.1	DNA izolasyonları.....	29
3.2.7	İstatistiksel değerlendirmeler	36
4	BULGULAR.....	39
4.1	Kefir analizleri Mikrobiyolojik Bulguları	39
4.2	Lactobacillus suşlarının identifikasyonu bulguları	39
4.3	İzolatların Asit ve Safra Tolerans Bulguları	39
4.3.1	Asit Tolerans Bulguları	39
4.3.2	Safra Tolerans Bulguları	41
4.4	İzolatların Antibakteriyel Aktivite Bulguları	42
4.5	İzolatların Antibiyotik Direnci Bulguları	44
4.6	Hastaların gaita örnekleri bulguları	45
4.7	Hastaların Semptom Günlüğü ve Biyokimyasal Parametre Bulguları	50
4.8	Semptom Günlüğü Sonuçları.....	53
5	TARTIŞMA VE SONUÇ	69
5.1	Kefir analizleri Mikrobiyolojik Bulguları	69
5.2	Lactobacillus suşlarının identifikasyonu bulguları	69
5.3	Asit toleransı	70
5.4	Safra tuzu toleransı	70
5.5	Antibiyotik duyarlılığı	71
5.6	Antimikrobiyal etki.....	71
5.7	Kefirin hastalıklar üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar	72
5.8	Crohn hastalığı tedavisinde probiyotiklerin tartışılması.....	75
5.9	Ülseratif Kolit hastalığı tedavisinde denenen probiyotiklerin tartışılması ..	76
5.10	Moleküler Tekniklerle Mikrobiota Analizlerinin Değerlendirilmesi	77
5.11	Kefirin Gastrointestinal Rahatsızlıklar Üzerine Etkilerinin Tartışılması	79
5.12	Gaita sonuçları, semptom günlüğü verileri ve biyokimyasal parametrelerin tartışılması	80
5.13	Gıda Bilimi açısından bulguların önemi ve öneriler	82
	KAYNAKLAR.....	85
	ÖZGEÇMİŞ.....	93

KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
CH	: Crohn Hastalığı
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GALT	: Bağırsak ilişkili lenfoid doku
GIS	: Gastrointestinal Sistem
GN	: Gram negatif
GP	: Gram pozitif
İBH	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
kob	: Koloni Oluşturan Birim
Lt	: Litre
Malditof MS	: Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi
ml	: Mililitre
mm	:Milimetre MRS :De-Man Rogosa Sharp
pH	: Bir Çözeltinin Asitlik veya Bazlık Derecesi
R	:Dirençli
RT qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	:Hassas
spp.	: Alt Tür
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
ÜK	: Ülseratif Kolit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: Mikrogram
µL	: Mikro Litre
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
İBS	: İrritable Bağırsak Sendromu
İBH	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
API 50 CH	: İdentifikasyon Kiti
NCBI	: National Center for Biotechnology Information



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1: Hastaların kullandığı steril gaita tüpleri	20
Şekil 3.2: İzolatların anaerobik ortamda inkübasyonu	23
Şekil 3.3: Laboratuvar çalışmaları	24
Şekil 3.4: İzolatların mikroskopta incelenmesi ve basil şekilli mikroorganizmalar..	25
Şekil 3.5: Bakteri izolasyonu	26
Şekil 3.6: Asit toleransı tespiti için hazırlanmış 2,5 ph MRS brothlar	27
Şekil 3.7: İzolatların antibiyotik duyarlılıkları testleri	28
Şekil 3.8: Primer spesifitesini kontrol etmek için <i>Lactobacillus</i> PCR amplifikasyonu	36
Şekil 3.9: Primer spesifitesini kontrol etmek için <i>Lactobacillus</i> PCR amplifikasyonu	36
Şekil 4.1: Kefir tüketimi öncesi ve sonrası, tedavi grubundaki ülseratif kolit hastalarının gaitalarındaki <i>Lactobacillus</i> miktarı (ilk sütun: önce, son sütun: sonra)	49
Şekil 4.2: Kefir tüketimi öncesi ve sonrası, tedavi grubundaki Crohn hastalarının gaitalarındaki <i>Lactobacillus</i> miktarı (ilk sütun: önce, son sütun: sonra). 49	
Şekil 4.3: Hastalık süresinin hasta gruplarına göre dağılımı	52
Şekil 4.4: Tedavi ve kontrol gruplarındaki UK ve CH hastalarının birinci ve ikinci iki haftada kefir tüketimi sonrası şişkinlik skorları değişimi	56
Şekil 4.5: Kefir izolatlarının %0,3 oxgall konsantrasyondaki safra toleransları	61
Şekil 4.6: İzolatların 2 ve 4.saatlerde asit ortamında hayatta kalma oranları	61
Şekil 4.7: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının dışkılama sıklığı değişimi grafikleri	62
Şekil 4.8: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının kendini iyi hissetme değişimi grafikleri.....	62
Şekil 4.9: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının dışkılama kıvamı değişimi grafikleri	63
Şekil 4.10: Kontrol ve hasta numunelerinde <i>Lactobacillus kefiri</i> gerçek zamanlı PCR görüntüsü	64
Şekil 4.11: Kontrol ve hasta numunelerinde <i>Lactobacillus spp.</i> gerçek zamanlı PCR görüntüsü	65
Şekil 4.12: Üç deneyden elde edilen ortalama değerlerden oluşan 0,2 ve 4. saatlerde 2,5 ph değerinde suşların aside toleranslarını gösteren grafik (log 10 cfu / ml değerine karşı zaman (saat)).....	66



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Ülseratif Kolit Hastalığı Klinik Aktivitesi için Truelove-Witts kriteri .	17
Çizelge 3.2: Tedavi grubundaki hastaların demografik ve hastalık özellikleri	17
Çizelge 3.3: Lactobacillus ve Lactobacillus kefirı tespiti için kullanılan primer çifti bilgileri.....	31
Çizelge 3.4: Çalışmada kullanılan PCR içerikleri	31
Çizelge 3.5: PCR işleminde kullanılan Termal Saykır cihaz koşulları	32
Çizelge 3.6: Exo-Sap Saflaştırması Reaksiyon İçeriği	33
Çizelge 3.7: Exo-Sap Saflaştırma Termal Saykır Cihaz Koşulları:.....	33
Çizelge 3.8: Big Dye Termination Reaksiyon İçeriği:	33
Çizelge 3.9: Big Dye Reaksiyonu için Termal Saykır Cihaz Koşulları:	34
Çizelge 3.10: Real Time PCR İçerikleri:	35
Çizelge 3.11: Melting Curve Koşulları.....	35
Çizelge 4.1: Lactobacillus izolatlarının asit ve safra oratmında 0, 2 ve 4 saat sonunda canlılık değerleri ve hayatta kalma yüzdeleri (log CFU/ml)	40
Çizelge 4.2: İzolatların antimikrobiyal etkilerin sonuçları	43
Çizelge 4.3: Seçilen izolatların antibiyotik dirençliliği	44
Çizelge 4.4: Crohn Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki Lactobacillus ve Lactobacillus Kefiri Bulguları	45
Çizelge 4.5: Ülseratif Kolit Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki Lactobacillus ve Lactobacillus Kefiri Bulguları	47
Çizelge 4.6: Tedavi gruplarının demografik ve klinik özellikleri	51
Çizelge 4.7: Hasta gruplarının biyokimyasal değişkenlerinin grup içi karşılaştırılması	52
Çizelge 4.8: Hasta gruplarının semptom günlüğü değişkenlerinin grup içi karşılaştırılması	54
Çizelge 4.9: Hasta gruplarının arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması	55
Çizelge 4.10: Crohn hastalığı tedavi ve kontrol gruplarının demografik ve klinik özellikleri	57
Çizelge 4.11: Ülseratif Kolit tedavi ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri	58
Çizelge 4.12: Ülseratif Kolit ve kontrol grubu arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması	59
Çizelge 4.13: Crohn ve kontrol grubu arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması	60
Çizelge 4.14: Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formu	67



KEFİRİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARININ SEMPTOMLARINA, HASTA DIŞKILARINDAKİ *LACTOBACİLLUS* FLORASINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Probiyotikler, uygun miktarlarda tüketildiklerinde, insanlarda sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda probiyotiklerin, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olumlu etkisi olduğu bildirilmektedir. Kefir de probiyotik etkisine sahip fermente bir içecektir ve azalan bağırsak mikroflorası için faydalı probiyotik bakteri sayısını takviye ederek bozulan mikroflora dengesini sağlayabileceği düşünülmektedir. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) Ülseratif Kolit (UK) ve Crohn hastalığı (CH) olarak ikiye ayrılır. UK ve CH her yaş grubunda artan sıklıkta görülmektedir. Bu çalışmada, geleneksel Türk fermente içeceği olan kefirin, İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) olan hastaların gaitalarında *Lactobacillus* florasındaki değişikliği ve bu değişimin hastaların biyokimyasal parametrelerine, semptomlarına ve hayat kalitelerine etkilerini görmek amaçlanmaktadır. Bu araştırmada; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Genel Dâhiliye ve Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışma ile ilgili tüm izinler Uludağ Üniversitesi Etik Kurulundan alınmıştır. (B.30.2.ULU.0.20.70.02-050.99/440, 25.11.2013)

Hastalara verilecek kefirin toplam mikroorganizma ve *Lactobacillus* içeriği mikrobiyolojik olarak belirlenmiştir. İzole edilen türlerin identifikasyonu Vitek® MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) kütle spektrometresi ile ve API 50 CH (bioMerieux) ile yapılmıştır. Belirlenen izolatlarda bazı probiyotik aktivitelerinin tespiti için antimikrobiyal aktivite, aside ve safraya tolerans, antibiyotik direnci deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda LB3 hariç tüm *Lactobacillus* izolatları 2,5 pH aside ve safraya dayanım göstermiştir. LPL5 susu deneylerde kullanılan tüm antibiyotiklere direnç göstermiş ve probiyotik olarak değerlendirilemez olduğu belirlenmiştir. LK9 şuşu tüm antibiyotiklere duyarlı olarak bulunmuştur. LF7, LK9 ve LL10 şuşları tüm patojen test bakterilerine antagonistik etki göstermiştir.

Çalışma tek merkezli, açık etiketli randomize kontrollü çalışma olarak yapılmıştır. 48 adet İnflamatuvar Bağırsak Hastası tedavi ve kontrol grubu olarak ikiye ayrılmıştır. (Tedavi için 28, kontrol için 20 hasta.) Tedavi grubundaki hastalar, 4 hafta boyunca, sabah akşam, 200ml kefir tüketmiş, kontrol grubu hastaları kefir tüketmemişlerdir. Üç hasta çalışmadan kendi isteği ile ayrılmıştır. Hastaların gaitalarındaki *Lactobacillus* miktarları rt-qPCR (Roche LightCycler Nano) ile kantitatif olarak bulunmuştur. Bir aylık kefir tüketimi sonunda, tedavi grubunda gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 10^4 – 10^7 CFU/g olarak, 17 denek için *Lactobacillus* keferi miktarı 10^4 – 10^6 CFU/g olarak bulunmuştur. Aynı zamanda hastalar hastalıkla ilgili yaşam

kaliteleri; gaita kıvamı, karın ağrısı, şişkinlik, defaksiyon sıklığı, kendini iyi hissetme gibi parametreleri içeren bir semptom günlüğü formu ile izlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kefir tüketimi sonrası dışkıda Lactobacillus miktarının anlamlı düzeyde arttığı (p=0,001) tespit edilmiştir. Crohn hastalarında tüm değişkenler açısından kefir kullanım sonrasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermiştir. HGB’de artış görülürken, ESR ve CRP’de anlamlı düşüş gözlenmiştir. Crohn hastaları için son 2 hafta şişkinlik skorları anlamlı derecede düşerken hastaların durumunda düzelmeye görülmüştür (p=0.012). Aynı zamanda kendini iyi hissetme skoru son iki haftada yükselerek hastaların durumunda düzelmeye görülmüştür (p=0.032). Ülseratif kolit hastalarında ilk hafta ile ikinci hafta arasında karın ağrısı, şişkinlik, dışkılama sayısı, dışkılama kıvamı ve kendini iyi hissetme değişkenleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Crohn ve kontrol grubu arasında Lactobacillus ve HGB son ölçümlerindeki değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Crohn hastalarında son ölçümdeki Lactobacillus ve HGB ölçümlerindeki artış Crohn kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. (p=0,024, p=0,029). Diğer değişkenler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ülseratif Kolit ve kontrol grubu arasında ilk iki haftadaki dışkılama kıvamı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p=0.026) diğer değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Ülseratif Kolit grubunun dışkılama kıvamı skoru, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Crohn ve kontrol grubu arasındason iki haftadaki karın ağrısı ve şişkinlik skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p=0.006; p=0.003) diğer değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Crohn grubunun son iki haftadaki karın ağrısı ve şişkinlik skorlarındaki azalış miktarı kontrol grubundakilerden daha yüksektir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre düzenli kefir kullanımı özellikle Crohn hastalarında lactobacillus artışına sebep olabilir ve semptomlar ve hayat kalitesinde kısa dönemde düzelmeye yol açabilir.

Anahtar Kelimeler: *İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları, Crohn Hastalığı, Ülseratif Kolit, Probiyotikler, Kefir, Bağırsak Mikroflorası, Gut Mikrobiyota, Lactobacillus, Lactobacillus kefir*

**DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF KEFIR AND
INVESTIGATION ITS EFFECTS ON INFLAMMATORY BOWEL DISEASE
SYMPTOMS, PATIENT'S *LACTOBACILLUS* FLORA OF FECES**

ABSTRACT

Probiotics are defined as living microorganisms which are useful for human health when they are consumed in appropriate portions. Some researches show that probiotics have useful effects on inflammatory bowel diseases. Kefir, which is a fermented milk drink, has probiotic properties that are thought to balance the degraded microflora. Chronic Inflammatory Bowel Disease (IBD) is divided into two groups which are; Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). It is being observed that the number of cases of UC and CD is increasing rapidly in every age group. The objective of this study was to investigate the effects of kefir consumption on patients' Lactobacillus microflora, biochemical parameters, symptoms and also quality of life of people with IBD.

The patients, who are under regular control of the General Internal Medicine and Gastroenterology Polyclinics of Uludağ University Medical Faculty, Department of Internal Diseases, were accepted to the study. All permits are obtained from Uludağ University Ethical Commity (B.30.2.ULU.0.20.70.02-050.99/440, 25.11.2013) for those patients.

Kefir, consumed by patients, had been analyzed microbiologically for their total microorganisms and Lactobacillus flora. The species identification of Lactobacillus isolates were performed by Vitek® MS mass spectrometer (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) and API 50 CH (bioMerieux). Identified isolates were examined for their antibacterial activity, against bile and acid tolerance and antibiotic resistance to identify their probiotic activity.

As a result, all kefir Lactobacillus isolates, except LB3, showed resistance to 2,5 pH acid and bile 0,3% oxgall. LPL5 strain showed resistance to all antibiotics used in the experiments and was not evaluated as probiotic. LK9 was susceptible to all antibiotics. LF7, LK9 and LL10 showed antagonistic effect on all pathogen test bacteria.

The study was performed as a single center, prospective, open-label randomized control trial of 48 patients, with IBD who were separated into two groups (28 patients for treatment and 20 patients for control). Three patients drop out the trial with her/ his own wish. Treatment group consumed, 200 ml. each time for day and night which have 2×10^{10} cfu/400 ml viable cell, for four weeks and control group didn't consume kefir at all. Their lactobacillus and Lactobacillus kefiri flora were quantitated by Real Time-qPCR (Roche LightCycler Nano). After one month administration, in treatment group the Lactobacillus strain bacterial load of feces of all subjects was 10^4 – 10^7 CFU/g. The Lactobacillus kefiri bacterial load of 17 subjects was of 10^4 – 10^6 CFU/g. The results of this study indicate that after kefir consumption the Lactobacillus quantity in gaita was statistically significant ($p=0.001$). At the same time the patient's quality of

life about disease, monitored by a symptom diary form that includes parameters as stool consistency, abdominal pain, bloating, defecation frequency and feeling good. Patient's with Crohn's disease showed statistically significant differences in terms of all variables after kefir use. There was a significant decrease in ESR and CRP while Crohn's patients showed an increase in HGB after kefir use. For patients with Crohn's disease, the last 2 weeks of bloating were significantly reduced while patients improved ($p = 0.012$). At the same time, the feeling good score improved in the last two weeks and patients' condition improved ($p = 0.032$). No statistically significant difference was found between the first week and the second week in patients with ulcerative colitis in terms of abdominal pain, bloating, number of stools, defecation consistency and feeling good.

There was a significant statistical difference between the Crohn group and the control group in terms of Lactobacillus and HGB amount change. The increase in Lactobacillus and HGB measurements in Crohn's patients was found to be higher than in the Crohn control group in the last measurement ($p = 0.024$, $p = 0.029$).

While there were no significant statistical differences between the groups in terms of other variables, there was a statistically significant difference between the ulcerative colitis and control group in terms of stool consistency in the first two weeks ($p = 0.026$), but no statistically significant difference was found in terms of other variables. Ulcerative colitis group's stool consistency score was higher than control group. While there was a significant statistical difference between Crohn and control group for their abdominal pain and bloating scores ($p = 0.006$, $p = 0.003$) there was no other significant statistical difference in terms of other variables. The decrease of abdominal pain and bloating scores of Crohn group was greater than control group in the last two weeks.

According to data from this study, regular consumption of kefir may improve both symptoms and quality of life in short term especially for the patient's with Crohn Disease.

Key words: *Inflammatory Bowel Disease, Crohn Disease, Ulcerative Colitis, Probiotics, Kefir, Gut Microbiota, Gut Microflora, Lactobacillus, Lactobacillus kefiri*

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Probiyotikler, canlı mikroorganizmalardır ve tüketildiklerinde sağlık açısından faydalar içerirler. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları tedavisinde fayda sağlayabilecek risksiz bir alternatif olabileceği düşünülerek gündeme gelmiş ve araştırılmıştır. Bu fikrin temelinde çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, bağırsak enfeksiyonu veya inflamasyonunun hastalığın patogeneğinde rol alıyor olabileceğinin gösterilmesi vardır. Geleneksel probiyotik bir gıdamız olan kefirin İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarından Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarına probiyotik etkileri şimdiye kadar yurt içi ve yurt dışında araştırılmamış ve hastalar tarafından merak edilen bir konudur. Bu çalışma ile, İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (Ülseratif Kolit veya Crohn) tanısı almış hastalar tarafından tüketilen kefirin, hastalardaki bağırsak mikrobiyotası (bağırsak bakterileri) üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Kefir çok sayıda farklı probiyotik bakteri ve mantar içermesinin yanında, içerdiği kefiran nedeniyle de diğer probiyotiklerden farklılık gösteren mükemmel bir probiyotik karışımdır. Özellikle kefiranın inflamasyonu giderici, immün sistemi güçlendirici etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Crohn ve Ülseratif Kolit hastalığında, hasta olan mukoza bölümünde bakteriler ve ürünlerinin bulunması, mikrofloranın rolünü ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kefir tüketimi ile hastaların mikrobiyotasının pozitif olarak etkilenmesi ve hastalık semptomlarının azalması, kefirin içinde bulunan probiyotik mikroorganizmaların, bağırsak mikrobiyotasının bozulan dengesini pozitif yönde etkilemesi ve bunun mikroflora analizlerine ve hastaların semptomlarına ve hayat kalitesine yansması hedeflenmektedir.

Bu çalışmada ile ayrıca kefirin yararlı etkilerinin hasta bireylere semptomları azaltıcı, yaşam kalitesini ve biyokimyasal parametreleri iyileştirici katkısını kanıtlamanın yansıra hasta bireyler dışında özellikle riskli gruplarda hastalık oluşmadan önce probiyotiklerin koruyucu hekimlikte kullanılması konusunda fayda sağlayacak ve ışık tutacaktır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları remisyon ve alevlenme döngülerine sahip, nedeni tam bilinmeyen fakat genetik faktörlerden de kaynaklanan hastalıklardandır (Koçhan ve ark. 2014). Hastaların iş yaşamı, evlilik yaşamı sosyal ilişkilerini ve dolayısıyla yaşam kalitesini etkileyen İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları 15-35 yaşları arasında en yüksek insidansa sahiptir. Hastaların bu dönemlerde hayatlarında önemli olaylar yaşanmaktadır örneğin evlilik, eğitim ve iş yaşamına atılmak gibi yani bu dönemler yaşamın en aktif dönemdir (Biber 2009). Kolon ve distal ileum bölgelerinde bakteri konsantrasyonunun yüksek olması sebebiyle bu bölgelerde görülen İBH da flora ve hastalık arasında ilişki açısından dikkat çekmektedir. Crohn hastalığında floranın rolü olduğu; hasta olan mukoza bölümünde bakteriler ve ürünlerinin bulunması, antibiyotik kullanıldığı zaman da hastalık aktifliğinin azalması ile klinik düzelmeye olması sebebiyle düşünülmektedir (Özden 2008). Ülseratif kolit(UK) ve Crohn hastalığı(CH) inflamatuvar bağırsak hastalıkları(İBH) çeşididir. Bu hastalıklar son senlerde sıklığı artarak görülmektedir. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı remisyon ve relapslarla seyrederek ve hastaların yaşam kalitesini etkilemektedir (Tanrıseven 2009)

Bu hastalıkların sebebi olarak genetik yatkınlığı bulunan kişilerde bağırsaklardaki antijenlere karşı aşırı agresif immün yanıt gelişimi en yaygın kabul gören hipotezdir İBH etki mekanizmaları bazı preklinik ve klinik çalışmalarda görülmeye çalışılmıştır. Batı toplumları savaşımlardan sonraki gelişimle daha refah yaşamaya başlamışlardır. Ekonomik durum iyileşmiş, hijyene önem verilmeye başlanmıştır. Gıdalarda da daha steril olanları seçilmeye çalışılmıştır. Bu rafine ve steril yaşam sebebiyle zamanla Ülseratif Kolit ve Crohn hastalıklarının daha çok görülmeye başlandığı düşünülmektedir çünkü özellikle kırsal toplumlarda ve hijyenin zayıf olduğu yerlerde bu hastalıkların görülme oranı düşüktür (Özden 2008).

2.1.1 Ülseratif Kolit

Kronik bir hastalıktır. Kalın bağırsak mukozasını tutar. Ülserasyon ve inflamasyonla beraber seyreder. Sebebi belirsizdir ve başlıca semptomu kanlı ve sümüksü ishaldir. Kan kaybı sebebiyle halsizliğe, çabuk yorulmaya ve çarpıntıya sebep olabilir, eklem, cilt, göz ve karaciğer ile ilgili bozukluklar nadir olarak görülebilir. Dışkılama sayısı günde 15-20 kez olabileceği gibi hastalığın derecesine göre günde 1-2 kez olabilir.

2.1.2 Crohn Hastalığı

Dr. Bernard Burill Crohn tarafından tarif edilmiş İnflamatuvar hastalık iltihabi bir hastalıktır. İmmunite temellidir, nedeni bilinmemektedir fakat ciddi bir inflamatuvar hastalıktır. Gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesini etkileyebilir fakat sıklıkla ince bağırsağı ve kalın bağırsağın ilk kısmını etkiler ayrıca diğer organları da etkileyebilir örneğin göz, akciğerler, safra yolları, cilt, eklemler ve karaciğer gibi.

Semptomları ishal, ateş, kramp tarzında karın ağrısı, bazen kanamadır ve yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürür. Çocuklarda gelişme geriliğine neden olabileceği gibi iştahsızlık, kilo kaybı yapabilir. Şikayetler kişiden kişiye değişip artıp azalabilir. Kronik bir hastalık olan Crohn hastalığının tedavisi yoktur fakat remisyonda tutulabilir. Hastanın şikayetlerinin kontrol altına alınması mümkündür. Tedavi ile inflamasyonlu alanlar iyileştirilmeye çalışılır ve oluşan ateş kontrol altına alınmaya çalışılır, karın ağrısı giderilmeye çalışılır, ileri safhalarda cerrahi müdahale yapılabilir.

Bağırsaklarda emilimin bozulması ve ishal besinler, vitaminler ve minerallerin emiliminde sorunlara dolayısıyla eksikliğe sebep olabilir. Hastaların iyi beslenmesi ve tedavileri süresince çok önemlidir.

Crohn hastalarında laktoz intoleransının normal kişilere oranla daha fazla görülmesi sebebiyle süt ve ürünlerinin tüketimi ile karın ağrısı, gaz, ishal veya şişkinlik gibi şikayetler ortaya çıkabilir.

Crohn hastalığında tedavide düzelme oranlarının standart şekilde değerlendirilip, tedavi öncesi hastalık ciddiyetini ve tedavi sonrası yorumlanabilmesi için oluşturulan hastalık aktivite indekslerinden biri CDAI

(Crohn Hastalığı Aktivite İndeksi), diğeri ise Harvey-Bradshaw İndeksidir (HBI) (Oktay 2001).

CDAI <150 remisyon kabul edilirken, HBI<4 remisyon olarak kabul edilmektedir. Dışkılama sıklığı, karın ağrısı, kendini iyi hissetmeme duygusu, sistemik bulgular, karında kitle, hematokrit ve vücut ağırlığı gibi bulgulara CDAI'de bir skor verilmektedir (Oktay 2001).

Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalıkları kronik hastalıklar olarak Batı Avrupa'da yaklaşık 35–55/100 000 insanı etkilmektedir. UC etiyojisi için mevcut önde gelen hipotez, gastrointestinal bağışıklık sisteminin düzensizleşmesine genetik yatkınlığı vurgular. Bununla birlikte, tanımlayıcı epidemiyolojik çalışmalar, yaş, zaman ve coğrafi bölge boyunca UC insidansındaki farklılıkları vurgular ve çevresel faktörlerin bu koşulların ifadesini önemli ölçüde değiştirebileceğini düşündürür (Zocco ve ark. 2006).

Günümüzde tıbbi ve cerrahi tedaviler Crohn hastalığını tamamen ve kalıcı olarak iyileştirdiğini söylemek mümkün değildir. Ancak uygulanan tedavilerin hastanın uzun süreli remisyonda tutulmasını, atakların önlenmesini ve yakınmaların düzelmesi sağlanabilmektedir.

2.2 Probiyotikler

Probiotik kelimesi Yunanca'dan günümüze gelmiştir ve kelime anlamı “yaşam için” demektir. Probiotiklerin gündeme yerleşmesi 1903 yılında Rus biyolog Ellie Mechnikof'un araştırmaları sonucu sağlıklı insanların laktobasillusları içeren gıdaları çok tüketen kişiler olduğunu söylemesi ile ve “yaşlanmada uzun ömürlülük” teorisiyle nobel ödülü kazanması ile gerçekleşmiştir (Ulusoy 2007).

Probiyotikler, canlı mikroorganizmalardır ve tüketildiklerinde sağlık açısından faydalar içerirler şeklinde FAO ve WHO tarafından tanımlanmıştır. Birçok bakteri (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* gibi) ve mantar (*Saccharomyces boulardii*) türleri bu tanıma uymaktadır.

FAO ve WHO tarafından 2002 tarihli rapora göre probiyotik mikroorganizmalar gastrik sulara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalı ve dolayısıyla sindirim sistemi boyunca canlı kalabilmelidir. Hızla gelişebilmeli ve sindirim sisteminde

kolonize olması da gerekmektedir. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmalar güvenli olmalı ve raf ömrü boyunca canlı kalabilmelidirler (Bağdatlı ve Kundakçı, 2013).

Gastrointestinal sistemde, özellikle de kolonda çok sayıda bakteri vardır. İnsan vücudu toplamda 10^{12} ila 10^{14} arasında bakteri içerir. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki probiyotikler, inflamasyona yönelik faydalı etkiler içermektedir (Parkes 2007).

Probiyotiklerin inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanımını desteklemek üzere ülkemizde yapılmış çalışma yoktur.

Probiyotik gıdalar, insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip fonksiyonel gıdalar grubundadır. Son zamanlarda ticari olarak da ilgi görmektedir. GIS'den canlı olarak geçmesi gerekmektedir. Genellikle bir taşıyıcı tarafından taşınarak ki bu bir besindir insan vücudunda aktif hale gelir. Probiyotik içeriğinde canlı olarak minimum 10^6 kob/g mikroorganizma bulundurulmalıdır. Raf ömrü boyunca da canlılığını koruyarak içeriğini kaybetmemelidir.

Lactobacillus, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türler probiyotikler içinde en çok kullanılanlardır (Bağdatlı ve Kundakçı, 2013).

Türk beslenme kültürü dünya üzerindeki zengin gıda kültürleri içerisinde yer almaktadır. Kökeni, Orta Asya'ya kadar dayanmaktadır (Demirbaş ve ark. 2006). Probiyotik gıdalar, binlerce yıldır insanoglu tarafından tüketilmektedir ve yararlı etkileri olduğuna inanılmaktadır. Fakat probiyotik teriminin kullanılması, 15–20 yıl öncesinden öteye gitmemektedir. Probiyotikler bilim dünyasının dikkatini geçtiğimiz yüzyılın başlarında çekmiştir. Bu gıdalara ilgi fermente süt ürünlerinin bolca tüketildiği toplumlarda ömrün uzun olması ile başlamıştır. Böylelikle araştırma ve incelemeler başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001 yılında tanımlama da yapması ile konu daha bilimsel ve objektif bir çerçevede incelenmeye başlanmıştır. Buna göre probiyotikler, uygun miktarlarda tüketildiklerinde, insanlarda sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Birçok bakteri (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* gibi) ve mantar (*Saccharomyces boulardii*) türleri bu tanıma uymaktadır (Parkes 2007; Salminen ve ark. 2006)

Bağırsagın dogal mikroflorası Probiyotiklerin etkilerini anlayabilmek için önemlidir. İnsan vücudunun 10^{12} ila 10^{14} arasında bakteri içeriği kendi hücre sayısının toplamından bile fazladır. Bunun büyük bölümü GIS'de, özellikle de kolonda bulunmaktadır. Gaitanın kuru ağırlığı %30 oranında bakterilerden oluşur. GIS'de bulunan 400'ü aşkın farklı türdeki bakteri, insan vücudundaki tüm hücrelerin 10 katından fazladır. Bağırsak florası kisten kisiye degisiklik gösterir. Doğumda oluşmaya başlayan flora yıllar geçtikçe yasa özgü degisiklikler gösterebilir (Parkes 2007).

Bağırsak mikroflorasını etkileyen faktörler beslenme, ilaçlar / antibiyotikler, inflamatuvar hastalıklar, enfeksiyonlardır. Mikrofloradaki degisiklikler çoğunlukla klinik olarak sessizdir fakat birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Salminen 2006).

Son 50 yıl içinde inflamatuvar bağırsak hastalıkları görülme sıklığı artmıştır. Kolonda patojen bakterilerin artması ve yararlı bakterilerin azalması flora dengesini bozarak hastalıklara davetiye çıkartmaktadır. Beslenme alışkanlıklarımız ve steril yaşam da bu hastalıkların artmasında etkili olmuştur. Bağırsak floramızda *Lactobacilli* ve *Bifidobacteriales* arttırılmalı ve *Clostridia* türleri azaltılmalıdır. Yani bağırsak florasındaki dost bakteri seviyesi arttırılmalıdır (Özden 2008).

Hastalıklar ya bağırsak florasının değişimine yol açmaktadır ya da değişiklikler hastalıklara sebep olmaktadır. Değişen folranın tekrar dengeye getirilmesi düşüncesi probiyotik kullanılmasının temel mantığıdır. Patojen bakterilerin çoğalmasının, epitelyal bağlanma ve invazyonun süpresyonu, intestinal bariyer fonksiyonunun iyileştirilmesi, immun sistemin modülasyonu, ağrı algısının modülasyonu gibi alanlarda etkili olmasıyla probiyotiklerin etkileri açıklanabilir. Klinik çalışmalarda probiyotiklerin yararlı etkilerinin araştırıldığı çalışmalar akut enfeksiyöz diyare, antibiyotik ilişkili diyarenin önlenmesi, ülseratif kolitte relapsların önlenmesi, kolonun divertiküler hastalığı, *Helicobacter pylori* eradikasyonu ve İrritable Bağırsak Sendromu bulunmaktadır (Heczko ve ark. 2006)

500 ve daha fazla tür bakteri sağlıklı bireylerde kolon florasında denge içinde varlıklarını devam ettirirken patojen mikroorganizmalar arasında denge

bozulunca hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki probiyotikler, inflamasyona yönelik faydalı etkiler göstermektedirler. Değişen florada dengenin tekrar elde edilmesi düşüncesi probiyotik tedavilerinin mantığını oluşturan temel düşünce olmuştur. Fakat probiyotiklerin herhangi bir hastalığın tedavisinde rutin kullanımlarının önerilebilmesi için şimdiye kadar yapılan çalışmalar yeterli kanıta sahip değildir (Balfour 2007; Heczko ve ark. 2006).

Çeşitli probiyotik çalışmalarında farklı ve zaman zaman çeliskili sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında veriler ile klinik gözlemlerin uymadığı gözlenmiştir. Hangi probiyotiğin, ne kadar süre ile ve hangi dozda kullanılması gereketiği konularında belirsizlikler mevcuttur (Baran 2006).

2.2.1 Süt Kefiri

Çok eski yıllardan beri özellikle Kafkasya'da yapılan kefir koyu kıvamlı fermente bir içecektir. Kefir kefir tanesi sayesinde mayalanır. Tadı ekşimsidir ve köpüklü bir içecektir. Süt asidi ve alkol fermentasyonu ile oluşur. Güneybatı Asya'da Türk'lerin yaptığı ve tükettiği bir içecek olduğu bilinmektedir. (Adam 1971).

Türk Gıda Kodeksine göre kefir; fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir tanelerinin kullanıldığı fermente süt ürünüdür (TGK 2009).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliğine göre (Tebliğ No: 2009/25) kefirde Toplam Spesifik Mikroorganizma (Kob/G) En Az 10^7 olmalıdır.

Kefir bir süt içeceği olduğu için içeriğinde vitaminler, laktoz şekeri, mineraller ve yağ da bulunur. Kefirin besleme değeri yüksek kolay sindirilir ve emilimi de yüksek bir üründür. Laktoz-intolerant kişiler tarafından da rahatça tüketilebilir çünkü laktoz parçalanmaktadır. (Anonymous, 1998).

Beslenmemizde rafine gıdaların daha çok yer alması ile geleneksel fermente gıdalardak uzaklaşmak (turşu, kefir, boza gibi) vücudumuzun mükemmel

probiyotik dengesini bozduğundan dışarıdan alınan probiyotikler humoral bağışıklık yanıtını artırır ve bağırsakların bağışıklık yeteneğinin gelişimine yardımcı olur ve patojenlere karşı direnci artırır. Oral yolla *Laktobasilli* alımının bağırsaktaki patojenlerin yok edebileceği ve laktik asit bakterilerinin, makrofaj üretimini ve fagositez aktiviteyi arttırabileceği çalışmalarla deney hayvanlarında gösterilmiştir. (Baysal 2002).

Çeşitli kaynaklar Kefirin Kafkasya'ya özgü bir içecektir (İnal 1992). Türkçe'de kendini iyi hissetmek anlamını gelen "Keyif" kelimesinden türemiştir. Kefirde, %83-90 oranında Laktik asit bakterileri, %10-17 oranında maya bulunmaktadır (Seydim ve ark. 2000) Kefirde fermantasyon sonucu çok düşük düzeyde alkol oluşur, bu ürün süte göre daha yoğun kıvamda ve ekşimsidir. (Baran 2008).

Kefir Ortadoğu'da yaygın olarak tüketilmektedir. Kefir üretimi için kullanılan taneler, beyaz, yumusak, jelatinöz kıvamda, protein, lipid ve polisakkaritten oluşan bir matris içerisinde çok sayıda probiyotik bakteri ve mantar içeren biyolojik yapılardır. Kefiran da mikroorganizmaların içerisinde bulunduğu eksopolisakkarit matrise verilen addır ve *Lactobacillus kefiranofaciens* tarafından üretilir (Lopitz-Otsoa ve ark.2006). En çok üreten ve tüketen ülke Rusya'dır (Atasever ve ark. 2001). Fakat iyileştirici etkileri araştırıldıkça giderek büyük tüketici toplulukları tarafından talep edilen bir ürün haline gelmiştir. Günümüzde de artık birçok ülkede üretilmektedir (Konar ve Şahan 1989)

Geleneksel kefirin kendine özgü tat ve aroması kefir kültürü içinde bulunan değişik türde bakteri ve mayalardan kaynaklanmaktadır (Beshkova ve ark.2003). %83-90 oranında Laktik asit bakterileri, %10-17 oranında maya kefirde bulunmaktadır (Ulusoy 2004).

Endüstriyel kefir üretimi için de liyofilize kefir kültürü kefir danesinden elde edilerek ticari olarak üretilip satılmakta ve bu mayalarla ticari kefir üretimi sağlanmaktadır. (Ulusoy 2004).

Pogacic ve arkadaşlarına (2013) göre kefirde izole edilen probiyotik bakteriler ve mantarlar *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefiranofaciens*, *L. cellobiosus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus spp. jugurti* ve *L. lactis*, *L. Lactococcus lactis spp. lactis*, *L. lactis spp. lactis biovar diacetylactis*,

L. lactis spp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *L. filant* ve *Streptococcus durans*, *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* ve *L. Kefiri*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* şeklindedir. Doğal probiyotik karışımı kefirin çeşitli hayvan denemelerinde anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, immün modülatuar ve antitümöral etkileri gösterilmiştir fakat henüz klinik çalışmalarda araştırılmamıştır (Rodrigues ve ark 2005; Chen ve ark 2007)

40'ın üzerinde bakteri ve mantar türü içererek diğer probiyotiklerden farklı olan kefir, yine bu organizmlar tarafından üretilen kefiran adlı eksopolisakkaritler nedeniyle de kendine özgüdür (Vinderola ve ark; Chen ve ark 2007).

Vinderola ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada, kefiranın oral uygulanmasının farelerde ince ve kalın bağırsaktaki IgA sekrete eden B hücrelerini arttırdığı ortaya konmuştur (Vinderola ve ark. 2006)

DeneySEL bir kolitte *Lactobacillus* türlerinin uygulanmasıyla antiinflamatuar etkiler elde edildiği bildirilmiştir (Sengul ve ark. 2006)

Bir hayvan deneyinde kefirin oral alımıyla sistemik olarak da immün sistemi etkileyebileceği gibi bağırsak mukozası ve lümeninde antiinflamatuar etki yaptığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2007)

Kefir koyu kıvamlı, gazlı yumuşak içimli bu içecek inek, keçi, koyun vb. gibi çeşitli sütlerden üretilebilir (Kabak ve Dobson, 2011).

Kefirin bileşiminde çeşitli analizler sonucu %8,88- %16,73 aralığında toplam kuru madde, %3,10-%4,72 aralığında protein, %1,11-%2,77 aralığında yağ bulunmaktadır. Kefir B-vitaminleri bakımından zengindir. İçeriğinde fermantasyon sonucu laktik asit, etanol, karbondioksit ve asetaldehit, diasetil ve aseton gibi diğer aroma bileşikleri de bulunur. Kalsiyum, fosfor kaynağı olarak da değerlidir (Altay ve ark., 2010; Alpkent ve Demir 2012).

2.2.1.1 Kefirden İzole Edilen Mikroorganizmalar

Gajdusek, S., yaptığı çalışmada Danimarka'da streptokokları %70, laktobasilleri %20 ve mayaları %5 olarak bulmuştur bu çalışma kefir tanelerinden izole edilen mikroorganizmalar tanımlamıştır (Gajdusek 2002).

Yunan kefirinde yapılan bir çalışmada *Saccharomyces italicus*, *S. Cerevisiae* ile lactobacilluslar $3,4 \times 10^8$ adet/ml bulunmuş ve *Streptococcus lactis* ve *S. thermophilus*'da az sayıda elde edilmiştir (Georgantas, S., 1970).

Ege Üniversitesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü' tarafından kefir tanesinde *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis* bakterileri ve *Kluyveromyces lactis* mayası izole edilmiştir (Tomar ve ark. 2017).

Bir çalışmada kefir tanelerinden *Lactobacillus kefiri* ile *Lactobacillus kefiranofaciens* izole etmişlerdir (Chen ve ark. 2017).

Kefirin mikroflorası için yapılan bir araştırmada, *St. lactis*, *S. faecalis*, *S. cremoris*, *Leu. cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. kefir*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. caucasicum* bakteri türleri kefirde izole edilmiştir (Tomar ve ark. 2017).

Başka bir çalışmada kefir tanesinden izole edilen *Lactobacillus brevis* ve *L. Buchneri*'nin 90 suşun %40-60'ını oluşturduğu bulunmuştur(Lee ve Kim 1986).

Kefir taneleri ile ilgili bir çalışmada 46 laktik asit bakterisi izole edilmiş ve *L. kefiri* ve *L. fermentum*, *L. casei subsp. tolerans*, *L. casei subsp. pseudoplantarum*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. acidophilus* ve *L. gasseri*, *L. brevis*, *L. viridescens* olarak bulunmuştur (Irigoyen ve ark. 2005).

2.2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri:

Fermente gıdalarda kullanılan laktik asit bakterileri hareketsizdir. Spor oluşturmazlar ve gram-pozitiflerdir. Fakültatif anaerob ve katalaz negatif bakterilerdir (Bulut 2003).

Bu bakteriler; kok, çomak, sekinde olabilir ve gelişme sıcaklıkları açısından mezofil veya termofil olabilirler. Bu bakteriler sıcaklık olarak 10-45 °C arası sıcaklıkları tercih ederler ayrıca asit ortama veya alkali ortama dayanıklıdır ve tuz konsantrasyonları yüksek olsa da üreyebilmektedirler. (Sahin, 2012).

Laktik asit bakterileri, glikoz fermantasyonunu homofermentatif ve heterofermentatif olarak yapabilirler. Laktik asit bakterileri insan ve hayvan bağırsağında doğal olarak süt ve süt ürünlerinde, bitkilerde bulunabilirler.

(Bulut 2003)

2.2.1.3 Laktoz intolerans kişilerde kefir:

Dünyada %15 ile %80 oranında yetişkinlikte bağırsak mukozasında laktozu parçalayan laktaz enzimi azalmaktadır, bu da bazı rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Örneğin gaz, şişkinlik vb. Birçok laboratuvar çalışmasıyla kefir gibi, laktobasil içeren fermente süt ürünleri tüketildiğinde laktozun bağırsaklarda yıkımını artırılabilceği kanıtlanmıştır (De Vrese ve Schrezenmeir 2002).

2.2.1.4 Kefirin antibakteriyel, anti inflamatuvar etkileri:

Kefir antimikrobiyal ve antikonserojen etkisi yarattığı belirtilmektedir. (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003)

Kefirin ağız yolu ile alımında antiinflamatuvar etkiler oluşturması dışında sistemik olarak da immün sistemi etkileyebileceği, hayvan deney modeliyle gösterilmiştir (Lee ve ark. 2007).

Kefir üretimi sırasında asetik asit, H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) gibi antibakteriyel maddeler ile antibiyotikler oluşmaktadır. Bu maddeler *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakterilere antibakteriyel etki yapar, bağırsaktaki bakterilere karşı antibakteriyel etkiyi asetik asit bakterileri göstermektedir (Özden 2008).

Kefirin etkileri hayvan deneylerinde ve in vitro olarak anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, immün modülatuar ve antitümöral etkileri gösterilmiş olan, fakat henüz klinik çalışmalarda araştırılmamıştır veya çalışmalar yetersizdir (Chen ve ark 2007; Rodrigues ve ark 2005).

Ulusoy ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada kefiranın oral uygulanmasının farelerde ince ve kalın bağırsaktaki IgA sekrete eden B hücrelerini arttırdığı ortaya konmuştur.

Kefirin farklı komponentlerinin bağışıklık sistemi hücrelerini uyararak, Th2 ilişkili immün cevabı inhibe ederken, tümörler ve intraselüler patojenlere karşı hücrel yanıtı indüklediği gösterilmiştir (Vinderola ve ark. 2006).

Antiinflamatuvar etkiler deneysel kolit modelinde üreten lactobacillus türlerinin uygulanmasıyla gösterilmiştir (Şengül ve ark 2006).

2.3 İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında probiyotikler

İBH yaşam kalitesini düşüren ve hastayı kontrolü dışında diyare, rektal kanama, karın ağrısı, şişkinlik, gibi semptomlarla aşırı rahatsız eden ve toplumla olan ilişkilerinde sorunlara sebep olan bir hastalıktır. Bu hastalıklarda immün yanıtta mukozada bozukluk ve bağırsak florasına tolerans bozulmasının da rolü olduğu düşünülmektedir. Bağırsak florasının düznelenmesi fikri probiyotikleri kullanmayı gündeme gelmiştir. Bu konuda yapılan kısıtlı çalışmalara göre probiyotikler İBH tedavisinde yararlı olabilmektedir. Probiyotiklerle tedavi, standart tedavisinde zorlukların yaşandığı İBH'ları için bir ümit ışığı olmuştur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki Crohn hastalarında *Lactobacillus ve Bifidobacterium*'un azaldığı bildirilmektedir. UK hastalarında ise *Lactobacillus, Bifidobacterium* azalırken *Bacteroides vulgatus ve Fusobacterium*'da artış görülmektedir (Özden 2012; Frank ve ark 2009).

2.3.1 İnflamatuvar bağırsak hastalığında probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotikler bakteriosin, hidrojen peroksit, asetik asit, laktik asit gibi antimikrobiyal faktörler açığa çıkararak patojen mikropların çoğalmasını baskı altında tutarlar ayrıca patojen mikro organizmalar ile epitele tutunmada yarışa girer ve epitelyal ve “gut-associated lymphoid” hücrelerin immün fonksiyonunu uyarırlar veya düzenlerler. Probiyotikler mukozanın bariyer fonksiyonlarını güçlendirir, lamina propriada T-hücre apoptosis'ini indüklerler. (Özden 2008)

2.3.2 İnflamatuvar bağırsak hastalığında bakteriyel floranın rol oynadığını gösteren veriler

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, gastrointestinal kanalda bakteri konsantrasyonunun en yüksek olduğu bölgelerde görülür. İleostomiden sonra gaitanın doğal seyri saptırılırsa hastalıkta iyileşme görülmektedir. Bu hastalıklara yatkın kişilerde inflamasyonlu bölgelerden alınan bağırsak içeriği inflamasyonsuz bölgeye direkt olarak verilince o bölgede inflamasyon, ülser oluşmaya başlamaktadır, ayrıca geleneksel mikrofloraya karşı genetik olarak belirlenmiş immünolojik toleransın kaybını gösteren veriler mevcuttur. Son yıllarda ortaya konan gen, immunité, bakteri arasındaki etkileşimlerin de bunu kanıtlar niteliktedir (Özden 2008).



3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hastalar:

Çalışmaya Mayıs 2015 ile Aralık 2016 tarihleri arasında, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Genel Dâhiliye ve Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniklerinde tetkik ve tedavi edilen hastalar kabul edilmiştir. Bu hastalar, klinik olarak, endoskopik, radyolojik ve histopatolojik olarak inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) teşhis konulmuş hastalardır. 18-68 yaş aralığında toplam 48 hasta; CH tanısı olan 23 ve ÜK tanısı olan 25 hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve çalışmaya katılan tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş gönüllü oluru alınmıştır. (B.30.2.ULU.0.20.70.02-050.99/440, 25.11.2013).

Çalışma randomize kontrollü çalışma olarak yapılmıştır. İBH hastaları tedavi ve kontrol grubu olarak ikiye ayrılmıştır. (Tedavi için 28, kontrol için 20 hasta toplam 48 hasta) Tedavi grubundaki hastalar, 4 hafta boyunca, sabah akşam, 200ml kefir tüketmiş, kontrol grubu hastaları kefir tüketmemişlerdir.

Hastalardan gönüllü oluru alındıktan sonra Çalışmaya Alınma veya Dışlanma Kriterleri Formu doldurmları istenmiştir.

Çalışmaya Katılma Kriterleri:

Çalışmaya katılmaya gönüllü olanlar

18 yaş üstü eski veya yeni Crohn Hastalığı ve Ülseratif Kolit tanısı almış hastalar

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri:

CDAI (Crohn Hastalığı Aktivite İndeksi) 450'den yüksek olan hastalar,

(Baran ve Karaca 2013)

Ülseratif kolitte Truelove ve Witts kriterlerine göre ağır olan hastalar (Truelove ve Witts 1995)

Alkol kullanımı günde 20 g'dan fazla olan hastalar

Süte allerji veya intoleransı olan hastalar

18 yaş altı hastalar

Çalışmanın başlamasından önceki bir ay içinde veya çalışma sırasında aktif enfeksiyon varlığı

Son bir ay içerisinde antibiyotik kullanma öyküsü,

Çalışmanın başlamasından üç ay öncesine kadar kolon veya bağırsak operasyonu geçirme öyküsü gibi özellikler dikkate alınmıştır.

Hastanın kendi isteği ile çıkmak istemesi ve kefirin kesintisiz olarak 14 günden az içilmiş olması da çalışmadan dışlanma kriteri olarak belirlenmiştir.

Klinik çalışmalarda standardizasyon sağlanması açısından Crohn Hastalığı Aktivite İndeksi -Crohn Disease Activity Indeks (CDAI) olarak tanımlanmış olan bir sistem ile hastalığın aktivite indeksi belirlenmektedir. CDAI toplamının 150 puanın altında olması hastalığın remisyon dönemini, 150-220 puan arasında olması hafif aktiviteyi, 220-450 puan arasında olması orta aktiviteyi, 450 puanın üzerinde olması ise ağır aktiviteyi ve ciddi hastalık varlığını göstermektedir (Baran ve Karaca, 2013)

Ülseratif kolit hastalarında standardizasyon için hastalık aktivitesinin şiddeti Truelove- Witts kriterleri (Truelove ve Witts, 1995) sınıflamasına göre yapılmıştır.

- Remisyon (sakin dönem): günde 3-4 defadan az sayıda dışkılama
- Hafif şiddette: günde en fazla 4 defa kansız veya kanlı dışkılama
- Orta şiddette: günde en 4-6 defa kanlı dışkılama
- Şiddetli: günde 6'dan fazla defa kanlı dışkılama

Crohn ve ülseratif kolit Hastalarına ayrı ayrı verilen Hasta Bilgi Formu'nda ise hastalardan; hastane protokol numarası, ilk başvuru tarihi, cinsiyet, doğum tarihi ve yaşı, adres ve telefon bilgileri ile hastalık şikayetleri kısımlarını

doldurmaları istenmiştir. Tanı yaşı, tanı tarihi, HGB, ESR, CRP ve tutulum yeri bilgileri ise ilgili gastroenteroloji hekimi tarafından doldurulmuştur.

Çizelge 3. 1: Ülseratif Kolit Hastalığı Klinik Aktivitesi için Truelove-Witts kriteri

Kriterler	Hafif	Orta	Şiddetli
Kanlı gaita/gün	<4		>6
Nabız /dk	Normal		>90
Vücut sıcaklığı C	Normal	Hafif ve Şiddetli arası	>37.8
Hemoglobin g/dl	Normal		<10.5
Sedimentasyon mm/sa	Normal		>30

Çizelge 3.2: Tedavi grubundaki hastaların demografik ve hastalık özellikleri

	Ülseratif Kolit(n=15)	Crohn (n=10)	p
Yaş (medyan(min-maks)) yıl	33(19;68)	33(24;65)	0.643
Cinsiyet			
Erkek	9 (%60)	4(%40)	0.428
Kadın	6 (%40)	6(%60)	
Hastalık tutulum yeri			
Kolon	15(%100)	1(%10)	<0.001
İleum	0(%0)	6(%60)	
Kolon+İleum	0(%0)	3(%30)	
Hastalık süresi (medyan(min-maks)) yıl	4(1;12)	2(1;9)	0.129

Kefir Uygulaması:

Mayıs 2015-Aralık 2016 arası Bursa Uludağ Üniversitesi Gastroenteroloji Bölümüne başvuran 15 ülseratif kolit ve 13 crohn tanısı almış hastadan 28 gün 4 hafta boyunca sabah akşam 200 ml kefir içmeleri; içtikleri kefiri “Kefir Tüketimi Günlüğü Formuna” kaydetmeleri istenmiştir. Sabah ve akşam içtikleri miktarı ayrı ayrı not ettikleri formda notlar kısmı da oluşturulmuş, bu kısma kefirin hastalık durumuna olumlu veya olumsuz etkilerini yazmaları istenmiştir. Aynı formun devamında “Semptomlar ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formuna” karın ağrısı / rahatsızlığı, siskinlik, dışkılama sayısı, dışkılama kıvamı (cıvık / sulu veya topak / katı vb.) ile ilgili şikayetlerini ve kendini iyi hissetme skorlarını günlük olarak kaydetmeleri istenmiştir. Kefir tüketiminin bırakılması durumunda yine aynı forma, sebebiyle birlikte kayıt etmeleri hastalara bildirilmiştir.

Kefir üretimi sırasında üretici ile temasa geçilmiş her parti kefirin aynı starter ile yapıldığı hakkında kesin bilgi alınmıştır. Üretimde standart bir işlem kullanılacağı için sonuçların değişken olmayacağı öngörülmüştür. Her hastaya kefir içinde aynı probiyotik bakterilerin ulaşması sağlanmıştır.

Hastalara verilecek kefir **Eker Süt Ürünleri Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.**den temin edilmiş, son kullanma tarihleri, parti ve seri numaraları kayıt altına alınmıştır.

Çalışmaya dâhil olan hastaların ev adreslerine veya kendileri için uygun bir yere 4 hafta boyunca tüketilecekleri kefir şişelenmiş bir şekilde soğuk zinciri bozmadan araştırmacı tarafından ulaştırılmıştır. Hastalar bu sırada antibiyotik ilaç kullanmamış fakat var olan ilaçlarını kullanmaya devam etmişlerdir.

Sabah ve akşam içilmesi gereken kefir için, denekler araştırmacı tarafından çeşitli zamanlarda telefonla aranarak kontrol edilmiş ve deneklerin kefiri düzenli olarak almaları sağlanmıştır.

Tedavi dönemi

Tedavi dönemi boyunca günlük olarak doldurulmak üzere, 4 haftalık kefir kullanımı sonrası kefir tüketimi “Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formu” dağıtılmıştır (Çizelge 4.14).

Tedavi grubundaki hastalar, günde 2 kez 200 cc kefir almıştır. Hastalara kullandıkları içeceğin probiyotik olduğu söylenmiştir.

Hastalardan bu dönemde kefir kullanımını formuna kaç bardak probiyotik içtiklerini not etmeleri istenmiştir. Ayrıca Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formuna karın ağrısı / rahatsızlığı, siskinlik, dışkılama sayısı, dışkılama kıvamı (cıvık / sulu veya topak / katı vb.) ile ilgili şikayetlerini ve kendini iyi hissetme skorlarını günlük olarak kaydetmeleri sağlanmıştır. Hayat kalitesi değişim formundan elde edilen 4 haftalık sonuçlar toplanarak değerlendirilmiştir. Tedavi ile ilgili istenmeyen etkiler olup olmadığı öğrenilmiştir. Ayrıca tedavi bitiminde hastalara, “Şikayetlerinizde tatmin edici iyileşme olduğunu düşünüyor musunuz?” sorusu sorularak, yanıtlar “evet, hayır, fark” yok şeklinde kaydedilmiştir.

Karın ağrısı ve siskinlik şikayetlerinin şiddeti 4 ölçek üzerinden, yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3 olarak puanlandırılmıştır. Hastalar arasındaki olası farklı değerlendirmeleri ortadan kaldırmak için; hafif şiddet “hastanın günlük işlerini yapmasını etkilemeyen ve engellemeyen düzey”, orta şiddet “hastanın günlük işlerini yapmasını etkileyen düzey”, şiddetli ise “hastanın günlük işlerini yapmasını engelleyen düzey” olarak tanımlanmıştır.

Dışkılama kıvamı, cıvık / sulu =0, püre kıvamında=1, orta sulu=2, normal=3, sert gaita=4, çok sert veya topak=5 başlıkları altında günlük olarak puanlanmıştır.

Kendini iyi hissetme skorlaması ise çok kötü=1, kötü=2, orta/ normal=3, iyi=4, çok iyi=5 olarak puanlandırılmıştır.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu hastalarına günlük olarak doldurulmak üzere, 4 haftalık “Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formu” dağıtılmıştır (Çizelge 4.14). Kontrol grubundaki hastalar kefir tüketmeden günlüğü doldürmüşlardır. İlk gün ve 28 gün sonra gaita numuneleri alınarak analizler için saklanmıştır.

Numune Toplama

4 hafta kefir kullanımından önce ve sonra hastalardan ve kontrol grubundan steril gaita tüpüne gaita  rneği istenmiŐ ve alınan gaitalar, analiz için uygun Őartlarda(-20C'de) saklanmıştır.



Şekil 3.1: Hastaların kullandığı steril gaita tüpleri

3.1.2 Mikrobiyolojik Tayinler İçin Gereçler

3.1.2.1  rnek hazırlama ve homojenizasyon

+4 derecede laboratuvara orjinal ambalajında getirilen kefir homojenize edilmiş ve desimal dilüsyonlar halinde hazırlanmıştır.

3.1.2.2 Besiyerleri

Kefir numunesinin mikrobiyolojik tayinleri için MRS Agar, MRS Broth (de Man Rogosa Sharpe agar, Oxoid CM361) ve PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM139) besiyerleri kullanılmıştır. BPW (Buffered Peptone Water) kullanılmıştır.

De Man Rogosa and Sharpe (MRS agar) elde etmek için besiyeri 68,2 g/l olacak Şekilde damıtık su içinde ısıtılıp eritilmiŐ, pH'sı $5,7 \pm 0,2$ olacak Şeklide ayarlanmış ve 121  C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

MRS Broth elde etmek için besiyeri 52,2 g/l olacak Şekilde damıtık suda  z ld kten sonra, pH $5,7 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121  C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM139) hazırlamak için dehidre besiyeri, 39,0 g/l olacak Şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiŐtir, 121  C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petrilere dökülmüştür.

Nutrient Broth elde etmek için besiyeri, 13,0 g/l olacak şekilde damıtık suda çözüldükten sonra, pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Safra tuzu içeren MRS broth elde etmek için brotlara %0,3 oranında safra tuzu, Oxgall (Bile bovine, Sigma- Aldrich, A.B.D.) eklenmiş 7'şer ml tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2,5 ph'da MRS broth elde etmek için brotlara 1 N steril hidroklorik asit (HCL, Sigma Aldrich, A.B.D.) eklenmiş ve 10'ar ml tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.1.2.3 Boyalar

Gram boyama için kullanılacak olan kristal violet etil alkol içerisinde çözüldürüldükten sonra üzerine erlende 20 ml damıtık su içerisinde çözülmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Tamer ve ark. 1989). Safranin alkol içerisinde çözdürüldükten sonra damıtık su ilave edilmiş ve 24 saat sonrasında çözelti filtreden kullanılmıştır (Tamer ve ark. 1989). Lugol Potasyum iyodür 25–30 ml damıtık suda çözülmüş ve üzerine iyot ilave edilmiş ve çözelti damıtık su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Tamer ve ark. 1989).

3.1.2.4 Çözeltiler

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak fizyolojik tuzlu su çözeltisi hazırlamak için sodyum klorür damıtık su içerisinde çözülmüştür. (Tamer ve ark. 1989).

Gliserol hazırlamak için gliserol ve damıtık su karıştırılıp 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır (Akçelik ve ark. 1999).

3.1.2.5 Test bakterileri

İzolatların antimikrobiyal etkilerin tespiti için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *S. Epidermidis* ATCC 12228 test bakterileri kullanılmış ve bakteriler İstanbul Aydın Üniversitesi laboratuvarlarından temin edilmiştir. Test bakterilerinin aktifleştirilmesi 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

MRS agar içeren petrilere 1 ml'lik steril otomatik pipet uçlarıyla 9 mm çapında kuyucuklar açılmış ve 100 µl aktif test bakterileri ilave edilmiştir ve inkübasyon bitiminde (37°C / 24 saat) oluşan zonların çapları milimetrik olarak ölçülmüştür (CLSI 2015; Todorov ve Dicks 2006).

3.1.2.6 Antibiyotik Diskler

Penicillin G (10µg), Ampicillin (10µg), Gentamicin (10µg), Vancomycin (30µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. CLSI 2015'nin önerdiği disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar için zon çapları ölçülmüştür. Çaplara göre dirençli (R), orta dereceli duyarlı (MS) ve duyarlı (S) olmak üzere sonuçlar belirlenmiştir.

3.1.3 Malditoff Ms

Ölçümler MALDI-TOF VITEK® MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Pipet, Öze, Vitek MS hedef slaytı, Kalibrant E coli ATCC 8739, Matrix ve %25 formik asit analiz için kullanılan mazlemelerdir. Datalar otomatik olarak programdan "VITEK®MS Review" ile elde edilmiştir. Her bir petri için 3 bağımsız analiz tekrarlanmıştır.

3.1.4 API 50 CH

İzole edilen suşların idendifikasyonu API 50 CHL Medium (Bio Mérieux La Bali Grottes, France) kullanılarak yapılmıştır.

3.1.5 PCR

Gaitadan DNA izole edilmesi için Stool DNA Isolation Kit (QIAamp DNA Stool Kit) kullanılmış ve üretici talimatlarına göre prosedür takip edilmiştir. Lactobacillus primerlerinin optimizasyonu için Thermal Cycler T-100 (BioRad, Istanbul, Turkey) üzerinden PCR amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Gaita örneklerinden izole edilen DNA örneklerinde *Lactobacilluslar* ve *Lactobacillus kefir* varlığı Roche Lightcycler Nano Software (BioRad, Istanbul, Turkey) Real Time-qPCR cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Lactobacillus geni için pozitif kontrol olarak *Lactobacillus rhamnosus* CECT278-ATCC7469, *Lactobacillus kefir* için ise ATCC35411 kullanılarak standart eğriler elde edilmiştir.

3.2 Yöntem

Kefirin mikrobiyolojik tayinleri yayma plaka yöntemi ve API 50 CH, MALDI-TOF-MS ile, hastalardan alınan gaita numunelerinin analizi moleküler yöntemler kullanılarak rt-qPCR ile ayrıca hastalardan alınan hayat kalitesi formlarının değerlendirilmesi ise SPSS-22 ile yapılmıştır.

3.2.1 Mikrobiyolojik incelemeler

3.2.1.1 Örnek Hazırlama

Çalışmamızda kullanılan kefir örneği + 4 °C'de laboratuvara getirilmiştir. Örnek, 1:9 oranında (10gr. örnek:90ml dilüsyon sıvısı vb) dilüsyon sıvısı ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler manuel olarak homojenize edilmiştir (ISO/TS 11133: 2014, ISO 7218:2007).

1/10'lük hazırlanan seyreltimden direkt ekim yapılmıştır ve yine 1:9 oranında ileri seyreltimleri yapılarak dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyon sıvısı olarak BPW (Buffered Peptone Water) kullanılmıştır.

3.2.1.2 Besiyerlerine Ekim

Analizin yapılacağı ortam sıcaklığı 30°C'yi geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanmış seyreltimlerden 0,1ml örnek alınmış ve uygun agar üzerine steril drigalski çubuğu ile yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37 °C' de etüvlere 48-72 saat süre ile anaerob jarda inkübasyona bırakılmıştır. PDA'da 22°C de 5 gün mayalar için inkübasyona bırakılmıştır (ISO EN ISO 7218). Süre sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.



Şekil 3.2: İzolatların anaerobik ortamda inkübasyonu

3.2.1.3 Toplam canlı bakteri sayımı

İnkübasyonlardan sonra canlı koloniler 30-300 koloni içeren petrilere sayılmıştır ve hesaplamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır. (Tharmaraj ve Shah 2003, Phillips ve 2006).

$Kob/g = [Ortalama\ Koloni\ sayısı \times Seyreltme\ faktörü / Seyreltme\ tüpünden\ petri\ kabına\ aktarılan\ örnek\ hacmi\ (ml)]$.

Seyreltme faktörü = $[1/Seyreltme\ oranı]$



Şekil 3.3: Laboratuvar çalışmaları

3.2.1.4 İzolasyon, İdentifikasyon

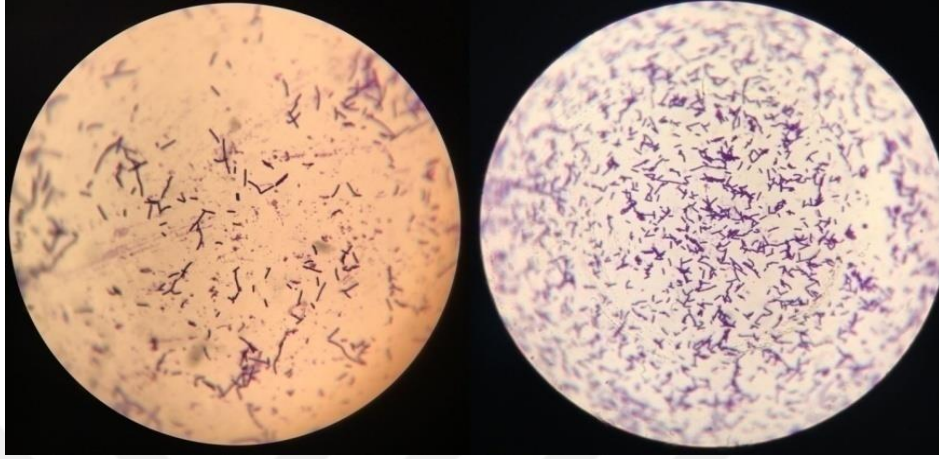
İnkübasyon sonucunda petrilere oluşan kirli beyaz, beyaz ve opak, küçük ve büyük probiyotik bakteri olabilecek koloniler alınmış öze yardımıyla başka petrilere çizgi ekim yöntemi ile aktarılmıştır. İnkübasyon sonucu elde edilen izolatlar saflaştırılncaya kadar işleme devam edilmiştir.

İzolatlar saflaştırılınca Gram boyama yapılarak Gram pozitif, basil ve katalaz negatif bakteriler seçilerek numaralandırılmıştır. (ISO 6887-6:2013, Van de Castele 2006; Halkman 2005; Holt ve ark. 2000).

Saflaştırılan izolatlar – 80 °C’de %20’lik gliserol içerisinde saklanmıştır. Numaralandırılan suşların identifasyonu API 50 CHL Medium (Bio Mérieux La Bali Grottes, France) ve MALDI-TOF Vitek MS VITEK® MS (bioMerieux, Marcy l’Etoile/Fransa) kullanılarak yapılmıştır.

Hücre Morfolojisi

Tek düşen kolonilerin inkübasyonu sonunda gelişen kolonilere kristal violet ile boyama yapılmış ve boyamalar daha sonra mikroskopta incelenmiştir (Arda 2015, Tamer ve ark. 1989; Akçelik ve ark. 1999).



Şekil 3.4: İzolatların mikroskopta incelenmesi ve basil şekilli mikroorganizmalar

Gram Boyama

Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne bası büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde yüzeye öze ile yayılmıştır. Kurutulmuş ve fikslenmiştir. Kristal violet solüsyonla 2-3 dakika boyunca boyanmıştır. Boya dökülmüş ve preparat üzerine lugol solüsyonu konmuştur 1-2 dakika beklenmiş, lugol solüsyonu dökülmüştür. Saf alkolle renk giderilmiştir. Su ile yıkanmıştır. Safranin ile 5-10 saniye boyanmıştır. Suyu yıkanarak boya giderilmiştir. Havada kurutulmuştur. Sedir yağı konarak mikroskopta 100'lük objektifte incelenmiştir. Mor görülen mikroorganizmalar G (+) ve pembe görülenler de G (-) olarak saptanmıştır (Arda 2015, Tamer ve ark. 1989; Akçelik ve ark. 1999).

Katalaz Testi

Aktif bakteri kültürleri üzerine %3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tille 2014, Aksoy 2007; Tamer ve ark. 1989).

İzolatların API 50 CH ile İdentifikasyonu

Suşların idendifikasyonu API 50 CHL Medium (Bio Mérieux, France)kullanılarak yapılmıştır. 50 biyokimyasal testten oluşan bir sistem olan

API 50 CH mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlamaktadır. API 50 CHL Medium *Lactobacillus* ve ilgili türlerin tanımlanması için kullanılmaktadır. API 50 CH stribi, karbonhidrat ailesi ve onun türevlerine ait olan substratların fermantasyonunu kullanan 50 mikro tüp içermektedir. Fermantasyon testleri substratları sulandıran API 50 CHL Medium ile eklenmektedir. İnkübasyon sırasında, fermantasyon asidin anaerobik üretimi ile ve seçilen besiyerinde bulunan pH indikatörü tarafından saptanan tüpte renk değişimi olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.5: Bakteri izolasyonu

İzolatların MALDI-TOF MS (VITEK® MS) ile İdentifikasyonu

MALDI-TOF bakterilerin protein yüklerine bağlı ayrıma giderek identifikasyonu gerçekleştirmektedir. Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) probiyotik gıdalardaki bakterileri tanımlamak için hızlı ve spesifik bir yöntemdir. (Angelakis ve ark 2011)

24-48 saatlik saf bakteri kültürleri kullanılarak MALDI-TOF ile doğrulama analizleri yapılmıştır. Kültürden izole edilmiş mikroorganizmalar direkt hedef plate uygulandı, data analizi referans veritabanına göre yapılmıştır.

İşlem sırasında slaytın ortasındaki kuyucuğa öze dolusu *E.coli* kalibrantı yayılmış ve kurumasını beklemeden 1 µl matrix solüsyonundan eklenmiştir. Sırasıyla 1. kuyucuktan başlayarak (A₁, A₂ ve ...) örnekler kuyucuklara koyulmuştur. Tüm slaytı doldurduktan sonra slaytın barkod numarasını okutulup çalıştığımız örnek bakteri olduğundan bakteri kısmı işaretlenmiş ve kuyucuk

onaylanmıştır, işlem başlatılmıştır. Slayt tepsiye yerleştirdikten sonra tepsi cihaza konulmuş ve sonuçlara belirlenmiştir. (Dubois ve ark. 2012).

3.2.2 İzolatların asit toleranslarının tespiti

Lactobacillus spp. suşları, 1 N HCl ile ayarlanmış 2,5 pH değerlerindeki taze MRS broth besiyerine 0,5 mc farlanda ayarlanarak 0,1 ml inoküle edilmiştir. 7 ml' lik serum fizyolojik içeren tüplere konan 0,-1,-2 dilüsyonlar yapıp 0, 2, 4 saat 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmış ve cfu/ml olarak hesaplanmıştır. (Klingberg ve ark. 2005, Song ve ark.2015).



Şekil 3.6: Asit toleransı tespiti için hazırlanmış 2,5 ph MRS brothlar

3.2.3 İzolatların safra tuzu toleranslarının tespiti

Lactobacillus spp. suşlarının safra tuzlarına karşı dirençlerini belirlemek için saflaştırılmış suşlardan 0,5 mcfarlanda ayarlama yapılmıştır. MRS broth besiyerine %0,3 oxgall (sigma) ilave edilmiş sterilize edilmiştir. 7 ml serum fizyolojik içeren tüplere izolatlardan %1 inokulasyon yapılmış ve karıştırılmıştır. İnkübasyon sonunda her kültürden fizyolojik su içerisinde dilüsyon yapılmıştır.

3.2.4 İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının tespiti

Kefirden izole edilen *Lactobacillus* spp. suşlarının; Penicillin G (10µg), Ampicillin (10µg), Gentamicin (10µg), Vancomycin (30µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları test edilmiştir.

Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 MacFarland standardına göre ayarlanan süspansiyondan Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine steril bir eküvyon

yardımıyla sürüntü ekimi yapılmıştır. Daha sonra her petriye 4 antibiyotik disk petri kenarından 10 mm ve birbirlerinden 15 mm uzaklıkta olacak şekilde konulmuştur. İnkübasyon sonucunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapları kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. Disk difüzyon metodunda ölçülen zon çaplarına göre dirençli (R), orta dereceli duyarlı (MS) ve duyarlı (S) olmak üzere kategorize edilerek verilmiştir. (CLSI 2015).



Şekil 3.7: İzolatların antibiyotik duyarlılıkları testleri

3.2.5 İzolatların antimikrobiyal etkilerin tespiti

Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metoduna göre saptanmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *S. Epidermidis* ATCC 12228 test bakterileri Nutrient broth'ta 37 °C'de 24 saat aktifleştirilmiş ve hücre yoğunlukları 0,5 nolu McFarland standartına göre ayarlanmıştır. Bu yöntem çerçevesinde 15 ml MRS agar içeren petrilere 200 µl 10⁶-10⁷ kob/g aktif kültürler yayılmış, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. MRS agar içeren petrilere 1 ml'lik steril otomatik pipet uçlarıyla 9 mm çapında kuyucuklar açılarak ve 100 µl aktif test bakterileri ilave edilmiş ve inkübasyon bitiminde (37°C / 24 saat) oluşan zonların çapları milimetrik olarak ölçülmüştür (CLSI 2015; Todorov ve Dicks 2006).

3.2.6 Moleküler İncelemeler:

3.2.2.1.1 DNA izolasyonları

Kontrol Bakteri Suşlarından Nükleik Asit İzolasyonu

Tez kapsamında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere *Lactobacillus rhamnosus* suşu, CECT278-ATCC7469 olarak tedarik edilmiştir. *Lactobacillus kefir* için ise ATCC35411 suşu alınmıştır. Bu iki suştan Roche High-Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İşlem basamakları şu şekildedir: Petri kaplarından, her iki bakteri suşu için tekli koloni seçilerek, 200ul steril su bulunan iki ayrı tüp içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözeltilere 10ul Lyzozome eklenerek 37 C'de 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüplere 200ul Binding Buffer ve 40ul Proteinaz K eklenerek, vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Tüplere, 75 C'de 30 dakikalık inkübasyonun ardından 100ul isopropanol eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra, tüp içeriği, filtreli kolonlara aktarılmıştır. Kolonlar 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve filtreden aşağı geçen sıvı atılmıştır. Filtrenin üzerine 500ul Inhibitor Removal Buffer eklenerek yeniden 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt kısımdaki sıvı atılarak, yıkama amaçlı 500ul Wash Buffer filtre üzerine eklenmiş ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt kısımdaki sıvı atılarak, tekrar 500ul Wash Buffer eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Kolonlar, DNA'nın saklanacağı 1.5ml'lik yeni tüplere yerleştirilerek, üzerine 75C'de ısıtılmış 100ul Elution Buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından, 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Hazırlanan DNA'lar sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere -20 C'de muhafaza edilmiştir.

Dışkı Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyon

Hastalardan alınan dışkı örnekleri kefir içiminden önce ve sonra olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her hastaya ait iki adet dışkı örneğinden ve kontrol grubu dışkı örneklerinden ayrı ayrı DNA izolasyonu, QIAamp DNA Stool Kit yardımıyla yapılmıştır. İşlem basamakları şu şekildedir: -20C'de saklanan dışkı örnekleri çözünmeden, 200mg kadar alınarak, 1.4ml ASL Buffer içerisine yerleştirilmiştir. Örneğin tamamı çözülene kadar vorteks yardımıyla karıştırılmıştır (Yaklaşık 3 dakika). Hazırlanan çözelti, 95°C'de 5 dakika, ardından ise 75°C'de 5 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Tüpler 8000g'de 1

dakika santrifüj edilerek, oluşan 1.2ml üst sıvı, çökeltiye dokunulmadan yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üst fazın içerisine 1 adet InhibitEX tablet atılarak, vorteks yardımıyla iyice çözünmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 3 dakikalık inkübasyonun ardından, tüpler 8000g'de 3 dakika santrifüj edilerek, inhibitörlerin çökmesi sağlanmıştır. Oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine 15ul Proteinaz K eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 200ul AL Buffer eklenmiş, vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 70C'de 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyonun ardından 200ul %100 Etanol eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyon, filtrelili kolonlara aktararak 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreden aşağı geçen alt faz atılarak, kolon üzerine 500ul Buffer AW1 eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Alt fazın atılmasının ardından, ikincil yıkama amaçlı, kolon üzerine 500ul AW2 eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon altında bulunan tüpler yenileriyle değiştirilerek 8000g'de 2 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Kolonlar DNA'ların muhafaza edileceği 1.5ml'lik yeni tüplere yerleştirilerek, üzerlerinden 75°C'de ısıtılmış 120ul Elution Buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen 10 dakikalık inkübasyonun ardından 8000g'de 1 dakika santrifüj yapılarak, DNA izolasyonu tamamlanmıştır. Elde edilen DNA'lar sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere -20C'de muhafaza edilmiştir.

Örneklerdeki Lactobacillus varlığının PCR Yöntemi ile Tespit Edilmesi

Örneklerde genel olarak Lactobacillus varlığının tespiti için kullanılan primer çifti ve Lactobacillus kefirii tespiti için kullanılan primer çifti bilgileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.3: Lactobacillus ve Lactobacillus kefiri tespiti için kullanılan primer çifti bilgileri

Primer Adı	Primer Dizisi	Primer Boyu	%GC	Bağlanma Sıcaklığı	Amplikon Boyu	Gen Bankası No
Lacto-F	TGGATGCCTTGGC ACTAGGA	20bp	55	58.6C	89bp	CP016 823.1
Lacto-R	AAATCTCCGGATC AAAGCTTACTTAT	26bp	34.6	54.4C	89bp	CP016 823.1
Kefiri-F	ATTCCTGTGCTCAG GCGTTT	20bp	50	57.3C	124bp	EU688 976.1
Kefiri-R	TGTTATCCCCTACT TCAAGGGCA	20bp	47.8	57.8C	124bp	<u>EU688</u> <u>976.1</u>

Çizelge 3.4: Çalışmada kullanılan PCR içerikleri

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
KCl Buffer	10x	2.5 µl
MgCl ₂	25mM	1.5 µl
dNTP	25nml(herbiri)	1.5 µl
Primer-F	10uM	0.5 µl
Primer-R	10uM	0.5 µl
Taq	5unit/ul	0.3 µl
DNA	-	5 µl
Steril Su	-	13.2 µl
Toplam Hacim	-	25 µl

Çizelge 3.5: PCR işleminde kullanılan Termal Saykır cihaz koşulları

Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
95 °C	5 dakika	-
95 °C	30 saniye	35
55 °C	30 saniye	35
72 °C	60 saniye	35
72 °C	7 dakika	-
4 °C	∞	-

Her iki primer çifti için yukarıdaki karışım ayrı ayrı hazırlanarak örnekler çalışılmıştır. PCR işleminde kullanılan Termal Saykır cihaz koşulları yukarıdaki çizelgede verilmiştir.

PCR ile Çoğaltılan Lactobacillus Amplikonlarının Doğrulanması

PCR yöntemi ile çoğaltılan Lactobacillus amplikonlarının doğruluğunun test edilmesi için, reaksiyonlar jel elektrofez ile yürütülmüştür. Jel elektroforez ile üretilen amplikonların boylarının istenen büyüklükte olduğu ve herhangi bir kirlilik ya da spesifik olmayan çoğalmanın gerçekleşmediği doğrulanmıştır.

Jel elektroforez işlemi için agaroz jelin hazırlanması protokolü: %2'lik agaroz jel hazırlamak amaçlı, 2 gr agar tartılarak bir cam erlenmeyere aktarılmıştır. 50ml 1X TBE agar üzerine eklenerek çalkalanmış ve 3 dakika mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Agarın tamamının çözündüğü görüldüğünde, sürekli çalkalanarak, solüsyonun soğuması sağlanmıştır. Solüsyona 3ul Etidyum Bromür eklenmiş, karıştırarak homojen dağılması sağlanmıştır. Tamamen berrak görünen solüsyon hazırlanan jel dökme tepsisine aktarılmış, taraklar yerleştirilerek, oluşan baloncuklar giderilmiştir. 30 dakika soğumaya bırakılan jel tamamen katılaştıncaya, taraklar çıkartılarak, içerisinde 1X TBE bulunan yürütme tankına yerleştirilmiştir. (Ojdana ve ark. 2014).

Jel elektroforez yöntemi protokolü: PCR'ı tamamlanan örneklerden alınan 10ul, 2ul 6X Loading Dye ile pipetaj yardımı ile steril bir yüzeyde karıştırılmıştır. Jel taraklarına her bir reaksiyon ayrı ayrı yüklenmiştir. Her sıranın başına, amplikon boylarının ayırt edilebilmesini sağlamak için 2.5ul Ladder yüklenmiştir. Jel tankı kapağı oturtularak, yürütme işlemi sabit 90V'da

30 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir. Yürütme sonrasında jel analizi, UV transilluminatör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Jel elektroforez sonucunda beklenen boylarda görülen ampliconların dizileme ile konfirmasyonu gerçekleştirilmiştir. Dizileme işlemi için öncelikle, reaksiyonlar Exo-Sap Saflaştırma yöntemi ile fazla primer ve dNTP'lerden arındırılmıştır. Sonrasında ise Big Dye Termination işlemi ile sentezlenen ampliconlar dizilemeye hazır hale getirilmiştir. Big Dye reaksiyonu sonrası örnekler, clean-up kolonları ile temizlenerek Genetik Analizör cihazında yürütülmüştür.

Çizelge 3.6: Exo-Sap Saflaştırması Reaksiyon İçeriği

İçindekiler	Hacim(µl)
PCR Örneği	5
Exonuclease I	0,5
Alkaline Phosphatase	1
Toplam	6,5

Çizelge 3.7: Exo-Sap Saflaştırma Termal Saykır Cihaz Koşulları:

Sıcaklık	Süre(dk)
37°C	15:00
85°C	15:00

Çizelge 3.8: Big Dye Termination Reaksiyon İçeriği:

İçindekiler	Hacim(µl)
5X Big Dye Buffer	4
Primer	1,5
Örnek	1,5
BigDye	1,5
Su	11,5
Toplam	20

Çizelge 3.9: Big Dye Reaksiyonu için Termal Saykır Cihaz Koşulları:

Sıcaklık	Süre(dk)
96°C	00:10
50°C	00:05
60°C	04:00

35 döngü

Big Dye Sonrası Sekans Clean Up işlemi: 240 µl “Sequencing Buffer” ile 10 µl dizileme örneği karıştırılıp ve kolona aktarılmıştır. Maksimum hızda 30 sn. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Alt sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 300 µl “Washing Buffer” eklenmesinin ardından maksimum hızda 30 sn. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Kolona 20 µl steril su eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon yapılmıştır. Kolonlar yeni 1.5ml’lik tüplere yerleştirilerek maksimum hızda 30 sn. santrifüj işlemi uygulanmıştır.

Örneklerin Genetik Analizöre Yüklenecek Yürütülmesi ve Analizi: Clean-Up yapılan tüplerden 15ul alınarak, genetic analizör plate’ine yüklenmiştir. Örnek yüklenmesi tamamlanan plate analizöre yüklenerek, sekans yürütmesi gerçekleştirilmiştir. Yürütme sonrasında, sonuç dosyaları Sequencing Analysis yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizden elde edilen sonuçlar FASTA formatında alınarak, NCBI BLAST yazılımında veri bankası ile karşılaştırılmıştır.

Örneklerin Real Time Yöntemi ile Çalışılması

Dışkı örneklerinden elde edilen DNA’lar, doğrulanması PCR ve dizileme ile yapılan primer çiftleri ile Real Time yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan Real Time PCR cihazı Roche LightCycler Nano cihazıdır. Örneklerin çalışılması, sybrgreen kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.10: Real Time PCR İçerikleri:

İçindekiler	Konsantrasyon	Miktar
SYBR Mix	2X	10ul
DNA	-	5ul
F Primer	10uM	0.5ul
R Primer	10uM	0.5ul
Water	-	9ul

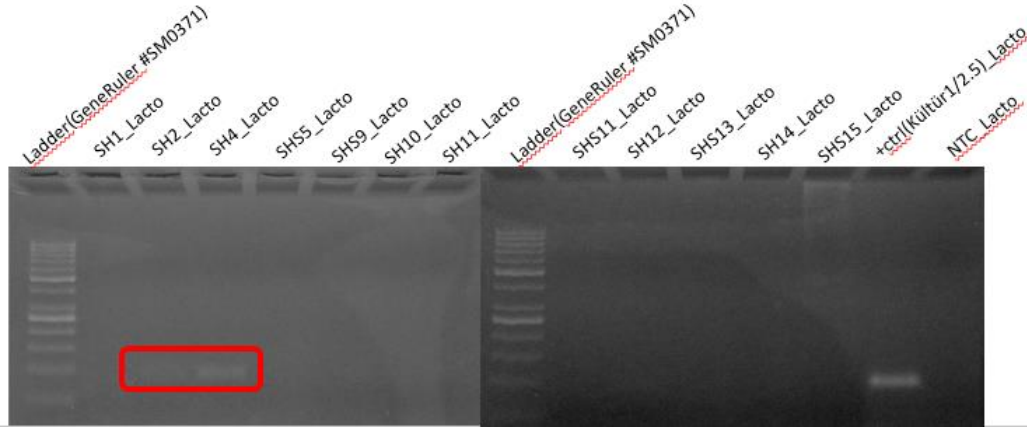
Çizelge 3.11:Melting Curve Koşulları

Temp	Ramp	Hold (sec)
60	4	60
95	0.05	1

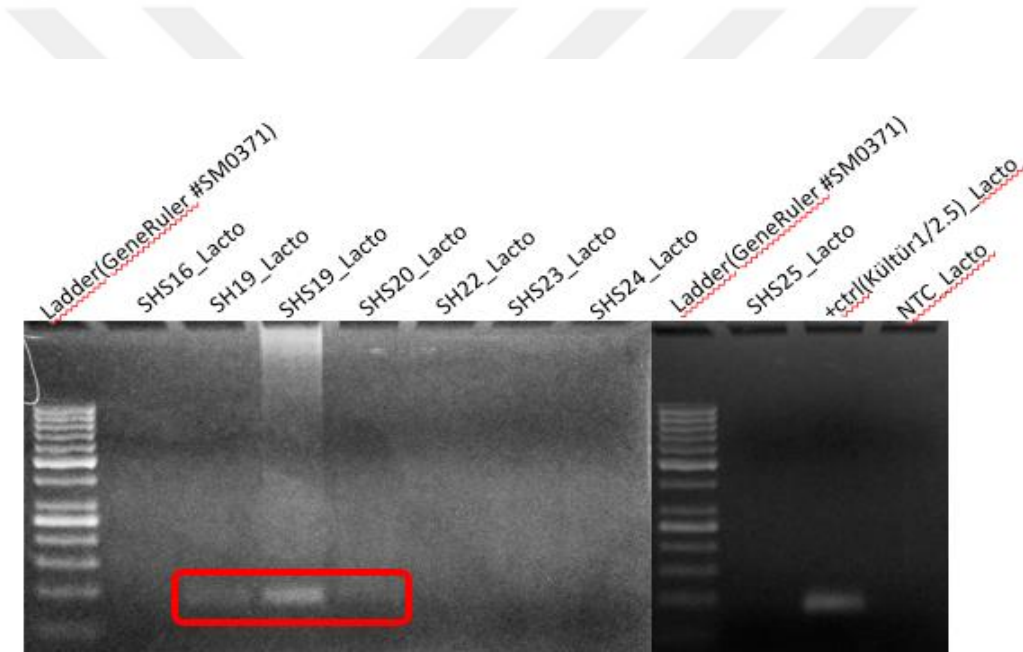
Çizelge 3.12: Real Time PCR Cihaz Ayarları

Adım	Sıcaklık	Süre	Floresan Ölçüm	Tekrar
1	95°C	10 dakika	-	-
2	95°C	30 saniye	-	-40-
2	56°C	30 saniye	-	-40-
2	72°C	1 min	Evet	-40-

Lactobacillus spp.'ye ait primerler Wang ve ark. (2011) koşullara bağlı kalınarak *Lactobacillus kefir*'ye ait primerler ise NCBI'deki nükleotid dizileri referans alınarak düz (F)/ters (R) olacak şekilde Fullgen Ltd. (İstanbul, Türkiye) şirketine tasarlatılmıştır.



Şekil 3.8: Primer spesifitesini kontrol etmek için Lactobacillus PCR amplifikasyonu



Şekil 3.9: Primer spesifitesini kontrol etmek için Lactobacillus PCR amplifikasyonu

3.2.7 İstatistiksel değerlendirmeler

Verinin istatistiksel analizi SPSS23.0 istatistik paket programında yapılmıştır. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılım gösteren veri için iki grup karşılaştırmalarında t-testi 2'den normal dağılmayan veri için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bağımlı örneklemelerin karşılaştırılmasında Wilcoxon İşaret sıra testi kullanılmıştır. Kategorik verinin incelenmesinde Fisher'in Kesin Ki-kare testi

ve Fisher-Freeman-Halton testi kullanılmıştır. Tekrarlı ölçümlerin analizinde başlangıç ölçüme göre yüzde değişim değeri (yüzde değişim= (son ölçüm – ilk ölçüm) / ilk ölçüm) hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0,05$ olarak belirlenmiştir.





4 BULGULAR

Bu araştırmada fermente bir süt ürünü olan kefirin 48 adet UK ve CH hastasının gaitalarında *Lactobacillus* ve *Lactobacillus kefiri* açısından oluşturduğu değişikliğe ve hastaların yaşam kalitesi, semptomları ve biyokimyasal parametrelerine etkileri incelenmiştir.

28 hasta tedavi grubunda 20 hasta kontrol grubunda yer almıştır. Tedavi grubundaki 28 hasta dört hafta sabah akşam kefir tüketmiş, kontrol grubu kefir tketmemiştir.

4.1 Kefir analizleri Mikrobiyolojik Bulguları

Kefirin mikrobiyolojik analizleri sonucu 5×10^7 kob/ml laktik asit bakterileri, $2,1 \times 10^4$ kob/ml maya bulunmuştur.

4.2 *Lactobacillus* suşlarının identifikasyonu bulguları

Kefirden 10 adet gram pozitif, katalaz negatif, basil şekilli izolat elde edilmiştir. Bunlardan LP1, LP 6 ve LP 5b şeklinde kodlananlar *Lactobacillus pentosous*, LB 2, LB 3 şeklinde kodlananlar *Lactobacillus brevis*, LPL 4, LPL 5 şeklinde kodlananlar *Lactobacillus plantarum*, LF 7 şeklinde kodlanan *Lactobacillus fermentum*, LK 9 şeklinde kodlanan *Lactobacillus kefiri*, LL 10 şeklinde kodlanan ise *Lactobacillus lindneri* olarak API 50 CH testi ve Vitek® MS MALDI-TOF mass spektrometresi ile bulunumuştur.

4.3 İzolatların Asit ve Safra Tolerans Bulguları

4.3.1 Asit Tolerans Bulguları

Çizelge 4.1 izolatarın 2,5 pH 0, 2 ve 4 saat sonunda asit dayanımlarını ve hayatta kalma yüzdelerini göstermektedir.

Lactobacillus suşlarının pH 2,5'te hayatta kalma kabiliyeti, 0, 2 ve 4 saatlik aralıklarla canlı hücre sayıları bulunarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan başlangıç *Lactobacillus* suşlarının sayısı 8 log cfu / ml olarak ayarlanmıştır. Suşların hayatta kalma yüzdeleri 2.5 pH değeri için 0 saate karşılık 2 saat ve 4 saat canlı hücre sayısına göre hesaplanmıştır. Üç deneyden elde edilen ortalama değerler, suşların asit toleranlarını göstermek için log₁₀ cfu / ml'ye karşı zaman (saat) şeklinde Çizelge 'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1: *Lactobacillus* izolatlarının asit ve safra ortamında 0, 2 ve 4 saat sonunda canlılık değerleri ve hayatta kalma yüzdeleri (log CFU/ml)

		SÜRE	ASİT TOLERANS		SAFRA TOLERANS	
			log 10 kob/ml	HAYATTA KALMA	log 10 kob/ml	HAYATTA KALMA
1	LP1	0h	6,88		8,28	
		2h	6,78	98,49%	8,26	99,81%
		4h	6	87,16%	8,26	99,81%
2	LB2	0h	6,16		7,53	
		2h	6,1	99%	7,34	97,40%
		4h	6	97,38%	6,92	91,82%
3	LB3	0h	7,24		7,32	
		2h	6,05	83,60%	7,12	97,30%
		4h	ÜY	0,00%	7,08	96,69%
4	LPL4	0h	7,23		8,26	
		2h	5,59	77,25%	7,1	86,04%
		4h	6	82,98%	7,89	95,60%
5	LPL5	0h	7,59		7,22	
		2h	7,1	93,52%	7,21	99,84%
		4h	7,34	96,70%	7,09	98,17%
6	LP5b	0h	7,05		7,92	
		2h	6,85	97,23%	7,68	96,86%
		4h	6,13	87,01%	7,27	91,76%
7	LP6	0h	7,12		7,92	
		2h	6,91	97,02%	7,91	99,89%
		4h	7,09	99,55%	7,85	99,13%
8	LF7	0h	7,31		7,57	
		2h	6,18	84,61%	7,34	96,97%
		4h	7,01	95,91%	7,3	96,41%

Çizelge 4.1: (devam)Lactobacillus izolatlarının asit ve safra ortamında 0, 2 ve 4 saat sonunda canlılık değerleri ve hayatta kalma yüzdeleri (log CFU/ml)

9	LK9	0h	7,59		7,2	
		2h	6,97	91,86%	7,19	99,80%
		4h	7,1	93,63%	7,18	99,61%
10	LL10	0h	7,47		7,26	
		2h	6,97	93,30%	7,22	99,42%
		4h	7,1	95,16%	7,22	99,39%

LP1, LP 6, LP 5: Lactobacillus pentosous; LB 2, LB 3: Lactobacillus brevis; LPL 4, LPL 5: Lactobacillus plantarum; LF 7: Lactobacillus fermentum, LK 9: Lactobacillus kefir; LL 10: Lactobacillus lindneri; Asit Toleransı: 2,5pH, Safra Toleransı: 0,3 % oxgall, Süre: inkübasyon süresi, ÜY = Üreme yok

Kefir izolatları arasında 2 saat sonra maksimum hayatta kalma oranı LB2 türü için %99,2 olarak bulunmuştur. 2,5 pH'da 2 saatlik inkübasyon sonunda sonra, LP1, LP5B, LP6 için hayatta kalma oranları %98,49, %97,23 ve %97,02 olarak gerçekleşmiştir ve yüzde oranları yüksektir.

Hesaplanan en düşük hayatta kalma oranı ise 2 saat inkübasyon sonunda %77,25 ile LPL4 suşuna aittir.

Bütün hayatta kalma oranları %70'den daha yüksektir. LP1, LB2, LB3, LP5b suşları 4 saat inkübasyondan sonra pH 2.5'de düşen hayatta kalma oranlarına sahipken, 4 saatlik inkübasyondan sonra pH 2.5'de LPL4, LPL5, LP6, LF7, LK9, LL10 suşları artan hayatta kalma oranı göstermiştir. Sonuçlara göre, asidik koşullarda 4 saat inkübasyonda sağ kalamayan tek suş LB3 olmuştur. 4 saat inkübasyondan sonra LB2 ve LP6 hariç tüm hayatta kalma oranları düşmüştür.

Tüm hayatta kalma oranları LB3 suşu dışında %70'den daha yüksek olarak bulunmuştur, bu da kefir izolatlarının aside dayanıklı olduklarını ve kolonileşme yeteneklerini koruduklarını göstermektedir (Santos ve ark. 2003).

4.3.2 Safra Tolerans Bulguları

İzolaların %0,3 oxgall ortamında safra dayanımlarını ve 0, 2 ve 4 saat sonunda hayatta kalma yüzdelerini hesaplanmış ve üç deneyden elde edilen

ortalama değerler, suşların safra toleranslarını göstermek için log₁₀ cfu / ml'ye karşı zaman (saat) şeklinde izelge 4.1'de gösterilmektedir.

Lactobacillus suşlarının %0,3 oxgall ortamında hayatta kalma kabiliyeti, 0, 2 ve 4 saatlik aralıklarla canlı hücre sayıları bulunarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan başlangıç *Lactobacillus* suşlarının sayısı 8 log cfu / ml olarak ayarlanmıştır. Suşların hayatta kalma yüzdeleri %0,3 oxgall değeri için 0 saate karşılık 2 saat ve 4 saat canlı hücre sayısına göre hesaplanmıştır. 4 saatlik inkübasyon sonunda LP1 suşu 99,81 % hayatta kalma oranıyla en yüksek oranı göstermiştir.

Kefir izolatları arasında 2 saat inkübasyondan sonra maksimum hayatta kalma oranı, %99,81, %99,84, %99,89, %99,80 ve 99,42 şeklinde sırasıyla LP1, LPL5, LP6, LK9 ve LL10 şusları için bulunmuştur. LB2, LB3, LPL5, LP5b, LP6, LF7, LK9, LL10 suşları, %0,3 (w / v) safra tuzunda 4 saatlik inkübasyondan sonra düşen hayatta kalma oranına sahipseleler de LPL4 suşu artan hayatta kalma oranı göstermiştir. Hesaplanan en düşük hayatta kalma yzdesi%86,04 ile asit toleransındaki gibi safra tuzunda da LPL4 suşuna ait olarak 2 saat inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Tüm hayatta kalma oranları%70'den daha yüksek olarak bulunmuştur, bu da kefir izolatlarının safraya dayanıklı olduklarını ve kolonileşme yeteneklerini koruduklarını göstermektedir (Santos ve ark. 2003).

4.4 İzolatların Antibakteriyel Aktivite Bulguları

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *S. Epidermidis* ATCC 12228 suşları test patojenleri olarak kullanılmış ve test bakterilerine karşı oluşan inhibisyon çaplarının değerlendirilmesi sonucu oluşan veriler izelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2: İzolatların antimikrobiyal etkilerin sonuçları

No	İzolatlar	Test bakterileri (inhibisyon zonu mm)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
1	LP1	++	-	++	+++
2	LB2	+++	++	++	++
3	LB3	++	-	++	-
4	LPL4	-	-	++	-
5	LPL5	++	+++	++	-
6	LP5b	+++	++	-	++
7	LP6	+++	+++	+++	-
8	LF7	+++	++	+++	++
9	LK9	+++	++	+++	++
10	LL10	+++	++	+++	++

Etkisi yoksa

-

İnhibisyon zonu 1mm'den az ise

+

İnhibisyon zonu 2 ve 5mm arasında ise

++

İnhibisyon zonu 5 ve 10 mm arasında ise

+++

Bulgulara göre LPL4 suşu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. Epidermidis* ATCC 12228 patojenlerine karşı zayıf inhibisyon özelliği göstermiştir.

Fakat LK9, LF7 and LL10 suşları tüm patojenlere karşı güçlü inhibisyon özelliği göstermiştir.

LP5b *Enterococcus faecalis* ATCC 19433' e karşı inhibisyon göstermemiştir.

Genel olarak LF7, LK9 ve LL10 indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir.

4.5 İzolatların Antibiyotik Direnci Bulguları

Çizelge 4.3: Seçilen izolatların antibiyotik dirençliliği

	Antibiyotik Konsantrasyonu (µg/disk)	Vancomisin -30	Penisilin -10	Ampisilin -10	Gentamisin -10
1	LP1	R	S	MS	R
2	LB2	R	S	S	R
3	LB3	S	S	MS	R
4	LPL4	S	S	S	R
5	LPL5	R	R	R	R
6	LP5b	R	S	S	R
7	LP6	R	S	S	R
8	LF7	R	S	MS	S
9	LK9	S	S	S	S
10	LL10	S	S	R	R

Dirençli (R), orta dereceli hassas (MS) ve hassas (S) (Charteris ve ark. 1998) LF7 ve LK9 dışındaki 8 suşun tümünün gentamisine duyarlı olduğu bulunmuştur. Yalnızca LPL5 ve LL10, ampisiline karşı direnç göstermiş, diğer tüm suşlar hassas veya orta hassas olarak bulunmuştur. LPL 5 suşunun penisiline dirençli olduğu ancak diğer suşların hepsinin penisiline duyarlı olduğu bulunmuştur. Suşların tümü vankomisine dirençli olmasına rağmen LB3, LPL4, LL10 suşları vankomisine duyarlı olarak bulunmuştur. LK9 suşunun, dört antibiyotiğe de duyarlı olduğu tespit edilmiştir. LPL5 tüm antibiyotiklere dirençlidir ve probiyotik olarak düşünülmemelidir.

Birleşmiş Milletler / Dünya Sağlık Örgütü Gıda ve Tarım Örgütü (FAO / WHO) tarafından oluşturulan kriterlere göre antibiyotik direnci olan ve antibiyotik direnç genlerini aktarabilen bakteriler sağlık açısından güvensiz sayılır ve probiyotik olarak kullanılamazlar (Munoz- Atienza ve ark. 2013)

Sonuç olarak, çalışmamızda sunulan veriler, kefirde izole edilmiş Lactobacillus suşlarının gelecekte dikkate alınması gereken önemli sayıda bazı probiyotik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

4.6 Hastaların gaita örnekleri bulguları

Tedavi grubu hastalarının 28 günlük kefir uygulaması sonrasında her bir izolat için kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dışkılarında laktobasil sayısında belirgin artış gözlemlenmiştir.

Tedavi grubundaki deneklerin bir ay kefir kullanmasından sonra yapılan analizlerinde tüm deneklerin dışkılarındaki *Lactobacillus* miktarı kantitatif olarak 10^5 - 10^7 CFU / g bakteri yükü olarak bulunmuştur. 18 deneğin dışkılarındaki *Lactobacillus* kefiri bakteri yükü ise 10^4 - 10^6 CFU / g olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, kefir tüketiminden sonra hastaların dışkılarındaki *Lactobacillus* miktarı istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p = 0.001$). Bu veriler ışığında, seçilen LK9 *Lactobacillus* kefiri suşlarının hastaların bağırsağında başarıyla kolonize olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.4: gerçek zamanlı PCR ile belirlenen tedavi ve kontrol gruplarının dışkı örneklerinin *Lactobacillus* popülasyonunu göstermektedir.

Çizelge 4.5: gerçek zamanlı PCR ile belirlenen tedavi ve kontrol gruplarının dışkı örneklerinin *Lactobacillus* kefiri popülasyonunu göstermektedir.

Çizelge 4.4: Crohn Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki *Lactobacillus* ve *Lactobacillus* Kefiri Bulguları

No	Microorganizmalar	Crohn Hastalığı Tedavi Grubu (log10)		No	Microorganizmalar	Crohn Hastalığı Kontrol Grubu (log10)	
		0.gün	28.gün			0.gün	28.gün
CDT1	<i>Lactobacillus</i>	4,65	7,95	CDC1	<i>Lactobacillus</i>	0	7,39
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	3,41	5,95		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,88
CDT2	<i>Lactobacillus</i>	0	6,62	CDC2	<i>Lactobacillus</i>	4,69	4,92
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	6,15		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
CDT3	<i>Lactobacillus</i>	0	6,65	CDC3	<i>Lactobacillus</i>	5,47	5,63
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,29	4,20

Çizelge 4.4: (devam) Crohn Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki *Lactobacillus* ve *Lactobacillus Kefiri* Bulguları

CDT4	<i>Lactobacillus</i>	4,2	6,36	CDC4	<i>Lactobacillus</i>	5,37	4,2
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
CDT5	<i>Lactobacillus</i>	0	6,43	CDC5	<i>Lactobacillus</i>	0	0
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,69		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
CDT6	<i>Lactobacillus</i>	0	6,91	CDC6	<i>Lactobacillus</i>	4,71	4,95
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,45		<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,70	0
CDT7	<i>Lactobacillus</i>	4,47	6,63	CDC7	<i>Lactobacillus</i>	6,43	6
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,59		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
CDT8	<i>Lactobacillus</i>	0	6,53	CDC8	<i>Lactobacillus</i>	4,65	4,64
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,04		<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,2	3,95
CDT9	<i>Lactobacillus</i>	0	6,89	CDC9	<i>Lactobacillus</i>	5,89	5,18
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,48		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
CDT10	<i>Lactobacillus</i>	5,99	7,82	CDC10	<i>Lactobacillus</i>	5,83	5,43
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	5,69	5,98		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0

Çizelge 4.5: Ülseratif Kolit Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki *Lactobacillus* ve *Lactobacillus Kefiri* Bulguları

No	Microorganizmalar	Ülseratif Kolit Tedavi Grubu (log10)		No	Microorganizmalar	Ülseratif Kolit Kontrol Grubu (log10)	
		0.gün	28.gün			n	0.gün
UCT1	<i>Lactobacillus</i>	4,93	5,54	UCC1	<i>Lactobacillus</i>	5,91	0
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,83	0
UCT2	<i>Lactobacillus</i>	0	9,17	UCC2	<i>Lactobacillus</i>	3,93	4,31
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,8		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,4
UCT3	<i>Lactobacillus</i>	4,65	5,59	UCC3	<i>Lactobacillus</i>	3,81	6,29
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,95	4,4
UCT4	<i>Lactobacillus</i>	0	6,22	UCC4	<i>Lactobacillus</i>	3,85	4,6
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	4,55		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
UCT5	<i>Lactobacillus</i>	4,6	5,81	UCC5	<i>Lactobacillus</i>	4,92	4,2
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,07	5,04		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
UCT6	<i>Lactobacillus</i>	0	6,11	UCC6	<i>Lactobacillus</i>	4,65	4,07
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,97		<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,80	3,00
UCT7	<i>Lactobacillus</i>	0	6,46	UCC7	<i>Lactobacillus</i>	5,66	5,58
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,82	0
UCT8	<i>Lactobacillus</i>	5,58	5,66	UCC8	<i>Lactobacillus</i>	4,07	5,81
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,85	2,80
UCT9	<i>Lactobacillus</i>	4,68	4,91	UCC9	<i>Lactobacillus</i>	5,47	5,15
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	4,54	4,2		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0

Çizelge 4.5: (devam) Ülseratif Kolit Hastalarının Tedavi ve Kontrol Gruplarındaki *Lactobacillus* ve *Lactobacillus Kefiri* Bulguları

UCT10	<i>Lactobacillus</i>	0	4,71	UCC10	<i>Lactobacillus</i>	4,55	5,39
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0		<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0
UCT11	<i>Lactobacillus</i>	0	5,38				
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,15				
UCT12	<i>Lactobacillus</i>	6,43	6,65				
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,78				
UCT13	<i>Lactobacillus</i>	6,14	6,17				
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,53				
UCT14	<i>Lactobacillus</i>	0	5,18				
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	0				
UCT15	<i>Lactobacillus</i>	0	5,83				
	<i>Lactobacillus kefiri</i>	0	5,15				

Tüm hastaların gaitalardaki *Lactobacillus* miktarları rt-PCR (Roche Light Cycler Nano) ile kantitatif olarak bulunduğu yukarıdaki çizelgelere göre bir aylık kefir tüketimi sonunda, hastaların gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 10^4 – 10^7 CFU/g aralığında bulunmuştur. *Lactobacillus kefiri* için ise 17 hastada 10^4 – 10^6 CFU/g aralığında bulunmuştur.

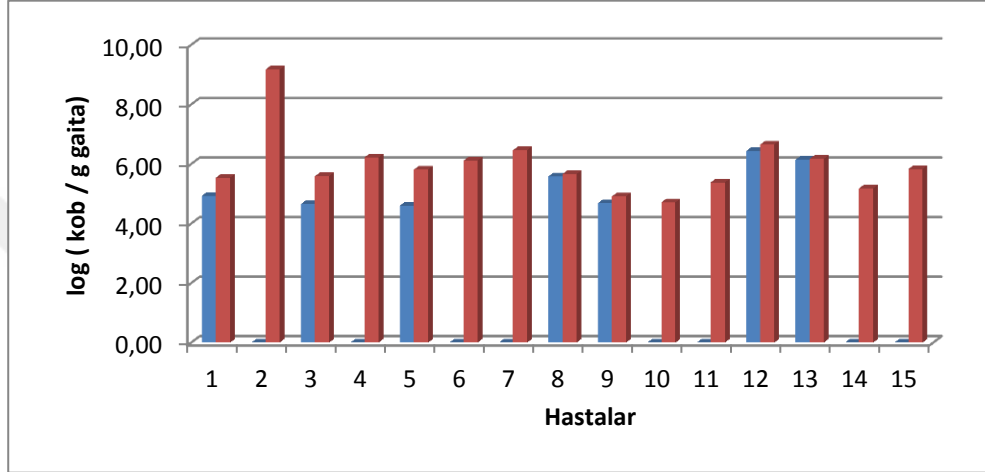
Crohn hastaların tedavi grubunda gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 10^6 – 10^7 CFU/g olarak bulunmuştur. *Lactobacillus kefiri* için ise 0 – 10^6 CFU/g arasında olarak bulunmuştur.

Crohn hastaların kontrol grubunda gaitadaki *Lactobacillus* miktarları 0 – 10^7 CFU/g arasında olarak bulunmuştur. *Lactobacillus kefiri* için 0 – 10^3 CFU/g aralığında bulunmuştur.

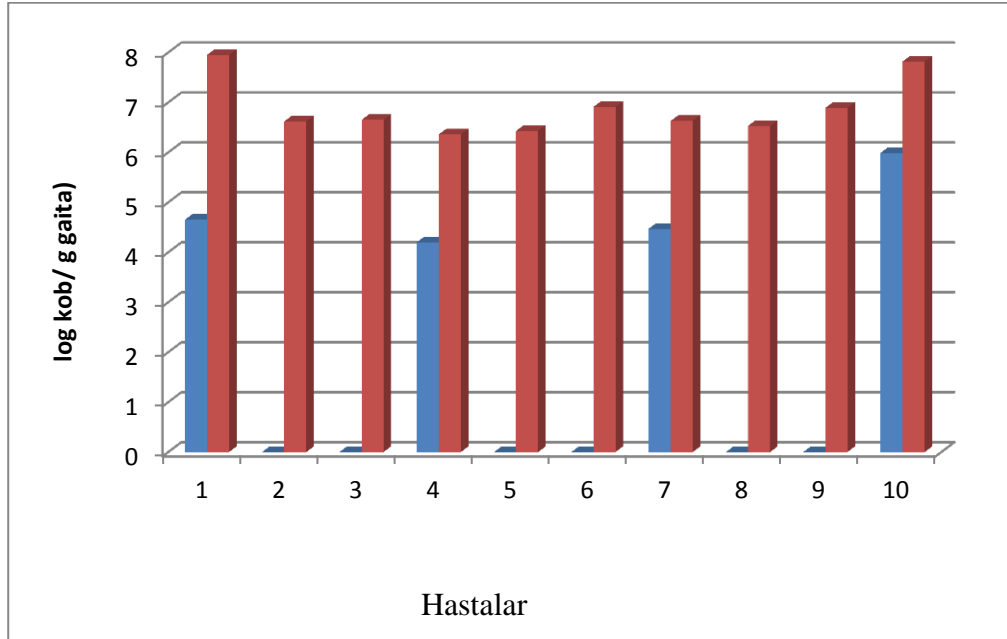
10 hastadan 7' sinde *Lactobacillus kefiri* bulunamamıştır.

Ülseratif Kolit hastaların tedavi grubunda gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 10^4 – 10^9 CFU/g olarak bulunmuştur. *Lactobacillus kefir* için ise 0 – 10^5 CFU/g olarak bulunmuştur.

Ülseratif Kolit hastaların kontrol grubunda gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 0 – 10^5 CFU/g olarak bulunmuştur. *Lactobacillus kefir* için ise 18 hastada 0 – 10^6 CFU/g olarak bulunmuştur. 10 hastadan 6' sinde *Lactobacillus kefir* bulunamamıştır.



Şekil 4.1: Kefir tüketimi öncesi ve sonrası, tedavi grubundaki ülseratif kolit hastalarının gaitalarındaki *Lactobacillus* miktarı (ilk sütun: önce, son sütun: sonra)



Şekil 4.2: Kefir tüketimi öncesi ve sonrası, tedavi grubundaki Crohn hastalarının gaitalarındaki *Lactobacillus* miktarı (ilk sütun: önce, son sütun: sonra)

4.7 Hastaların Semptom Günlüğü ve Biyokimyasal Parametre Bulguları

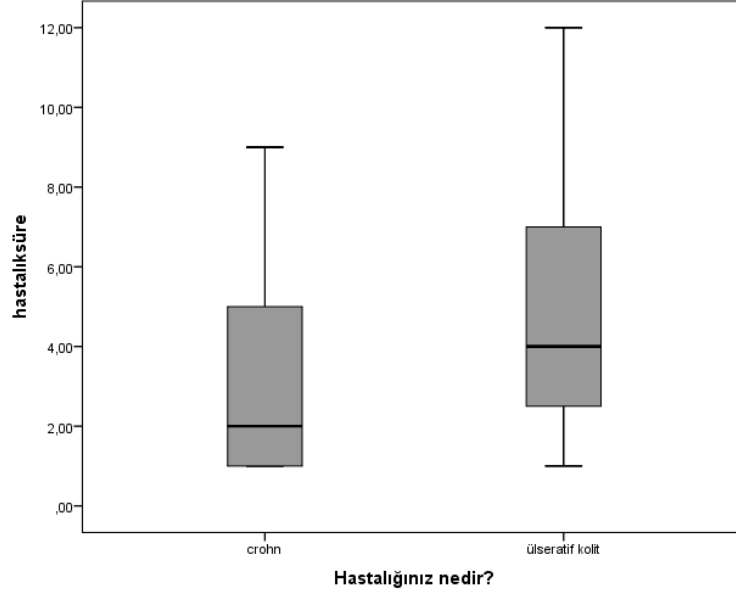
Çalışmaya alınan 28 hastadan 25'i toplam 4 haftalık çalışma süresini tamamlamıştır, 3 hasta çalışmadan kendi isteği ile çıkmıştır. Crohn hastaları 4 erkek, 6 kadın toplam 10 hastadan oluşurken, ülseratif kolit hastaları 9 erkek, 6 kadın toplam 15 hastadan oluşmaktadır. Crohn ve ülseratif kolit hastaları arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.428$). Crohn hastaları için ortanca yaş 33(24;65) iken ülseratif kolit hastaları için 33(19;68) olarak bulunmuş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.643$).

Crohn ve Ülseratif kolit hastaları hastalık tutulum yeri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ülseratif kolit hastalarının %100 hastalık tutulum yeri kolon iken bu oran Crohn hastalarında %10 ile daha düşük bulunmuştur. Ayrıca Crohn hastalarının %60'ında tutulum yeri ileum iken ülseratif kolit hastalarında bu oran %0'dır. İki hasta grubu arasında hastalık süresi ($p=0.129$) ve toplam kefir kullanım miktarı ($p=0.683$) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

HGB, ESR ve CRP açısından Crohn ve ülseratif kolit hastaları karşılaştırıldığında sadece ilk CRP ölçümünde istatistiksel olarak fark bulunurken ($p=0.048$) diğer değişkenler açısından anlamlı fark yoktur. Crohn hastalarının CRP ölçümleri ülseratif kolit hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.6: Tedavi gruplarının demografik ve klinik özellikleri

	Ülseratif Kolit (n=15)	Crohn (n=10)	p
Yaş (medyan(min-maks)) yıl	33(19;68)	33(24;65)	0.643
Cinsiyet			
Erkek	9 (%60)	4(%40)	0.428
Kadın	6 (%40)	6(%60)	
Hastalık tutulum yeri			
Kolon	15(%100)	1(%10)	<0.001
İleum	0(%0)	6(%60)	
Kolon+İleum	0(%0)	3(%30)	
Hastalık süresi (medyan(min-maks)) yıl	4(1;12)	2(1;9)	0.129
Toplam Kefir Kullanımı (medyan(min-maks))	11.2(9.4;11.2)	11.2(9.6;11.2)	.683
Lactobacillus miktarı ilk ölçüm	0(0;271.3)	0(0;99.1)	1.000
Lactobacillus son ölçüm (% değişim)	1.87(0.19;53.4)	3.4(0.44;13.7)	0.914
HGB ilk ölçüm	11.7(10.6;15.8)	12.7(9.3;15.5)	0.723
HGB son ölçüm (% değişim)	0.05(-0.09;0.17)	0.08(- 0.04;0.24)	0.567
ESR ilk ölçüm	25(5;59)	29(12;59)	0.428
ESR son ölçüm (% değişim)	-0.15(-0.71;1.18)	-0.20(- 0.53;0.69)	0.643
CRP ilk ölçüm	0.33(0.3;6)	1.1(0.3;8)	0.048
CRP son ölçüm (% değişim)	-0.06(-0.94;2.52)	-0.60(- 0.96;0.72)	0.103



Şekil 4.3: Hastalık süresinin hasta gruplarına göre dağılımı

Hastalık süresinin hasta gruplarına göre dağılımı Şekil 4.3’ de verilmiştir. Buna göre hastaların hastalık süreleri 1-12 yıl arası değişmektedir.

Çizelge 4.7: Hasta gruplarının biyokimyasal değişkenlerinin grup içi karşılaştırılması

	Ülseratif Kolit (n=15)			Crohn (n=10)		
	İlk ölçüm	Son ölçüm	p	İlk ölçüm	Son ölçüm	p
Lactobacillus miktarı	0(0;271.3)	39.3(3.6;447.4)	0.001	0(0;99.1)	29.3(4.48;664.4)	0.005
HGB	11.7(10.6;15.8)	12.7(9.9;17.2)	0.139	12.7(9.3;15.5)	13.6(10.3;15.7)	0.033
ESR	25(5;59)	18(2;74)	0.263	29(12;59)	20(10;48)	0.032
CRP	0.33(0.3;6)	0.3(0.3;3.52)	0.636	1.1(0.3;8)	0.3(0.3;1.0)	0.015

Çizelge 4.7.'deki sonuçlar, kefir tüketiminden önceki ve sonraki hastaların Lactobacillus DNA sayısı ile biyokimyasal özellikleri arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, kefir tüketiminden sonra Lactobacillus miktarının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuştur ($p = 0.001$).

Crohn hastalığı olan hastalar kefir kullandıktan sonra tüm değişkenler açısından istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir. ESR ve CRP'de belirgin bir düşüş vardır ve Crohn hastaları kefir kullandıktan sonra Hemogloblin değerleri artış göstermiştir.

Crohn hastalığı olan hastalarda, şişkinlik skorları son 2 hafta önemli ölçüde azalmıştır ($p = 0.012$). Aynı zamanda, kendini iyi hissetme skoru son iki haftada yükselmiş ve hastaların durumunda düzelme olmuştur ($p = 0.032$).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalarının kefir kullanım öncesi ve sonrası lactobacillus miktarı, HGB, ESR ve CRP değişkenleri karşılaştırıldığında ülseratif kolit hastalarında kefir kullanım sonrası sadece lactobacillus miktarında istatistiksel anlamlı bir artış görülürken ($p=0.001$) diğer değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Crohn hastalarında tüm değişkenler açısından kefir kullanım sonrasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermiştir.

Özellike Crohn hastalarında kefir kullanım sonrasında lactobacillus miktarı ve HGB'de artış görülürken, ESR ve CRP'de anlamlı düşüş gözlenmiştir.

İstenmeyen etkiler: Kefir kullanan hastalar içinde 3 tanesi şişkinlikten şikayetçi olurken hastalar tarafından bildirilen herhangi bir başka rahatsızlık olmamıştır.

4.8 Semptom Günlüğü Sonuçları

Crohn ve Ülseratif kolit hastalarının ilk 2 hafta ile son iki hafta semptom günlüğü verileri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.8). Ülseratif kolit hastalarında ilk hafta ile ikinci hafta arasında karın ağrısı, şişkinlik, dışkılama sayısı, dışkılama kıvamı ve kendini iyi hissetme değişkenleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Çizelge 4.8: Hasta gruplarının semptom günlüğü değişkenlerinin grup içi karşılaştırılması

	Ülseratif Kolit (n=15)			Crohn (n=10)		
	İlk 2 hafta	Son 2 hafta	p	İlk 2 hafta	Son 2 hafta	p
Karın ağrısı†	0.7(0;1.2)	0.7(0;1.6)	0.476	0.2(0;2.1)	0.1(0;1.4)	0.058
Şişkinlik‡	0.6(0;1.6)	0.29(0;2)	0.638	0.7(0.2;2.3)	0.3(0;2)	0.012
Dışkılama sayısı	2(0.4;4.1)	2(0.43;3.6)	0.139	2.4(0.8;8.7)	2.3(0.7;7.1)	0.066
Dışkılama kıvamı‡	2.9(0.4;4.4)	2.85(1.4;3.6)	0.888	2.2(1.1;3.3)	2.8(1.3;3)	0.359
Kendini iyi hissetme*	3.3(2.7;5)	3.1(2.7;5)	0.944	3.5(2.6;4.4)	4(3;4.9)	0.032

†: Karın ağrısı ve şişkinlik skorları 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli şeklindedir

‡: Dışkılama kıvamı için skor 0: cıvık sulu, 1: püre kıvamında, 2: orta sulu gaita, 3: normal, 4: sert gaita, 5: çok sert gaita şeklindedir.

*Kendini iyi hissetme skoru 1: çok kötü, 2: kötü, 3: orta/ normal, 4: iyi, 5: çok iyi şeklindedir

Crohn hastalarının ilk 2 hafta ile son iki hafta semptom günlüğü verileri incelendiğinde ise karın ağrısı, dışkılama sayısı ve dışkılama kıvamı değişkenleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak şişkinlik ve kendi iyi hissetme açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Crohn hastaları için son 2 hafta şişkinlik skorları anlamlı derecede düşerken hastaların durumunda düzelme görülmüştür (p=0.012). Aynı zamanda kendini iyi hissetme skoru son iki haftada yükselerek hastaların durumunda düzelme görülmüştür (p=0.032).

Çizelge 4.9: Hasta gruplarının arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması

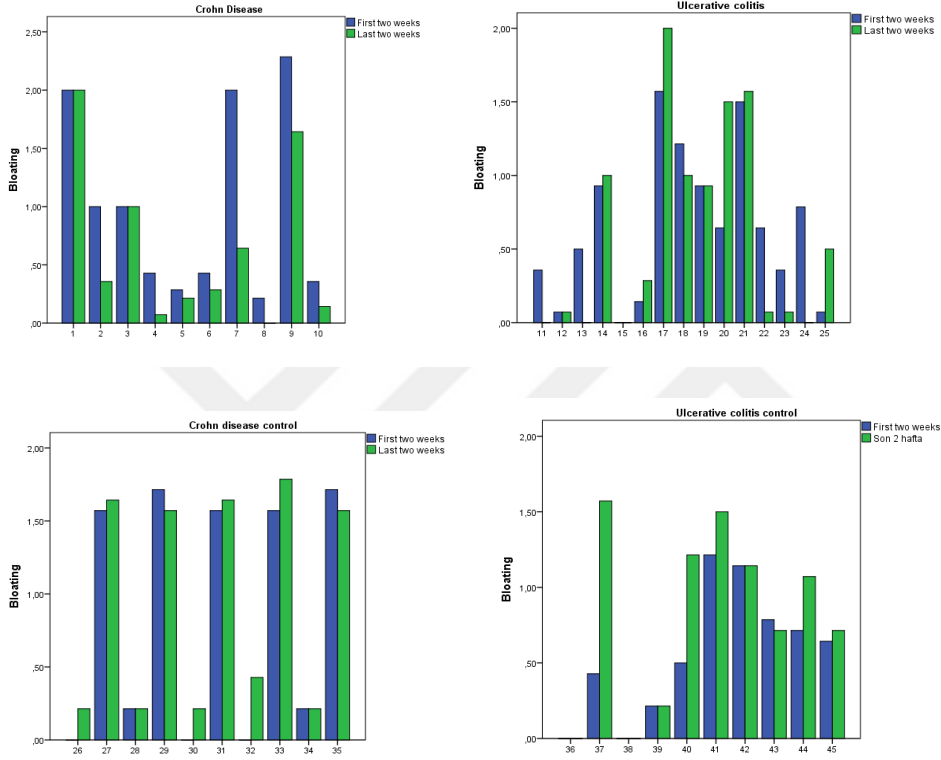
	Ülseratif Kolit (n=15)	Crohn (n=10)	p
Karın ağrısı ilk 2 hafta†	0.7(0;1.2)	0.2(0;2.1)	0.261
Karın ağrısı son 2 haftadaki değişim	-0.2(-1;1.2)	-0.7(-1;3)	0.049
Şişkinlik ilk 2 hafta†	0.6(0;1.6)	0.7(0.2;2.3)	0.311
Şişkinlik son 2 haftadaki değişim	0(-1;6)	-0.5(-1;0)	0.235
Dışkılama sayısı ilk 2 hafta	2(0.4;4.1)	2.4(0.8;8.7)	0.643
Dışkılama sayısı son 2 haftadaki değişim	-0.1(-0.4;0.4)	-0.1(-0.2;0.3)	0.495
Dışkılama kıvamı ilk 2 hafta‡	2.9(0.4;4.4)	2.2(1.1;3.3)	0.177
Dışkılama kıvamı son 2 haftadaki değişim	0(-0.1;2)	0.2(-0.4;0.6)	0.285
Kendini iyi hissetme ilk 2 hafta*	3.3(2.7;5)	3.5(2.6;4.4)	0.892
Kendini iyi hissetme son 2 haftadaki değişim	0(-0.1;0.2)	0.1(-0.1;0.4)	0.019

†: Karın ağrısı ve şişkinlik skorları 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli şeklindedir

‡: Dışkılama kıvamı için skor 0: cıvık sulu, 1: püre kıvamında, 2: orta sulu gaita, 3: normal, 4: sert gaita, 5: çok sert gaita şeklindedir.

*Kendini iyi hissetme skoru 1: çok kötü, 2: kötü, 3: orta/ normal, 4: iyi, 5: çok iyi şeklindedir

Crohn ve Ülseratif kolit hastaları arasında semptom günlüğü verileri karşılaştırıldığında son iki haftadaki karın ağrısı skoru ($p=0.049$) ve kendini iyi hissetme skoru ($p=0.019$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken diğer değişkenler açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Buna göre Crohn hastalarında son iki haftada karın ağrısı skoru ülseratif kolit hastalarına göre daha fazla azalma gösterirken kendini iyi hissetme skoru Crohn hastalarında daha fazla artış göstermiştir.



Şekil 4.4: Tedavi ve kontrol gruplarındaki UK ve CH hastalarının birinci ve ikinci iki haftada kefir tüketimi sonrası şişkinlik skorları değişimi

Çizelge 4.10: Crohn hastalığı tedavi ve kontrol gruplarının demografik ve klinik özellikleri

	Crohn (n=10)	Crohn kontrol (n=10)	p
Yaş (medyan(min-maks)) yıl	33(24;65)	42(21;66)	0.529
Cinsiyet			
Erkek	4(%40)	6(%60)	0.656
Kadın	6(%60)	4(%40)	
Hastalık tutulum yeri			
Kolon	1(%10)	0(%0)	0.628
İleum	6(%60)	10(%100)	
Kolon+İleum	3(%30)	0(%0)	
Hastalık süresi (ortalama±s. sapma) (yıl)	2(1;9)	2(1;10)	0.971
Toplam Kefir Kullanımı (medyan(min-maks))	11.2(9.6;11.2)	-	-
Lactobacillus miktarı ilk ölçüm	0(0;99.1)	14.26(0;271.3)	0.143
Lactobacillus son ölçüm (% değişim)	3.4(0.44;13.7)	-0.6(-0.93;0.74)	0.024
HGB ilk ölçüm	12.7(9.3;15.5)	13.2(10.6;15.9)	0.481
HGB son ölçüm (% değişim)	0.08(-0.04;0.24)	-0.01(-0.13;0.15)	0.029
ESR ilk ölçüm	29(12;59)	20.5(3;89)	0.353
ESR son ölçüm (% değişim)	-0.20(-0.53;0.69)	-0.09(-0.77;0.67)	0.393
CRP ilk ölçüm	1.1(0.3;8)	0.40(0.31;10.80)	0.481
CRP son ölçüm (% değişim)	-0.60(-0.96;0.72)	-0.18(-0.97;4.48)	0.190

Crohn ve kontrol grubu arasında *Lactobacillus* ve HGB son ölçümlerindeki değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Crohn hastalarında son ölçümdeki *Lactobacillus* ve HGB ölçümlerindeki artış Crohn kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Diğer değişkenler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.11: Ülseratif Kolit tedavi ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri

	Ülseratif Kolit (n=15)	Ülseratif Kolit kontrol (n=10)	p
Yaş (medyan(min-maks)) yıl	33(19;68)	43.5(29;76)	0.041
Cinsiyet			
Erkek	9 (%60)	4(%40)	0.428
Kadın	6 (%40)	6(%60)	
Hastalık tutulum yeri			
Kolon	15(%100)	10(%100)	-
İleum	0(%0)	0(%0)	
Kolon+İleum	0(%0)	0(%0)	
Hastalık süresi (ortalama±s. sapma) (yıl)	4(1;12)		
Toplam Kefir Kullanımı (medyan(min-maks))	11.2(9.4;11.2)	-	-
Lactobacillus miktarı ilk ölçüm	0(0;271.3)	4.04(0.65;81.3)	0.048
Lactobacillus son ölçüm (% değişim)	1.87(0.19;53.4)	0.62(-1;299.02)	0.428
HGB ilk ölçüm	11.7(10.6;15.8)	12.35(8.5;15)	0.531
HGB son ölçüm (% değişim)	0.05(-0.09;0.17)	0.02(-0.06;0.49)	0.807
ESR ilk ölçüm	25(5;59)	25.5(17;64)	0.367
ESR son ölçüm (% değişim)	-0.15 (-0.71;1.18)	-0.19 (-0.6;0.88)	1.000
CRP ilk ölçüm	0.33(0.3;6)	0.78(0.31;18.70)	0.461
CRP son ölçüm (% değişim)	-0.06 (-0.94;2.52)	-0.44 (-0.93;5.48)	0.531

Ülseratif Kolit ve kontrol grubu arasında yaş ve Lactobacillus ilk ölçüm değişkenleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Kontrol grubundakilerin yaşı ve Lactobacillus ilk ölçüm değerleri ülseratif kolit hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.12: Ülseratif Kolit ve kontrol grubu arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması

	Ülseratif Kolit (n=15)	Ülseratif Kolit kontrol (n=10)	p
Karın ağrısı ilk 2 hafta†	0.7(0;1.2)	0.04(0;0.86)	0.683
Karın ağrısı son 2 haftadaki değişim	-0.2(-1;12)	-0.58(-0.67;25)	0.724
Şişkinlik ilk 2 hafta†	0.6(0;1.6)	0.57(0;1.21)	0.723
Şişkinlik son 2 haftadaki değişim	0(-1;6)	0.17(-0.09;2.67)	0.165
Dışkılama sayısı ilk 2 hafta	2(0.4;4.1)	3.04(1.43;4.71)	0.071
Dışkılama sayısı son 2 haftadaki değişim	-0.1(-0.4;0.4)	-0.01(-0.45;0.67)	0.892
Dışkılama kıvamı ilk 2 hafta‡	2.9(0.4;4.4)	2.07(1.07;3.07)	0.026
Dışkılama kıvamı son 2 haftadaki değişim	0(-0.1;2)	0.03(-0.29;0.87)	0.765
Kendini iyi hissetme ilk 2 hafta*	3.3(2.7;5)	3.75(2.79;4)	0.567
Kendini iyi hissetme son 2 haftadaki değişim	0(-0.1;0.2)	-0.01(-0.25;0.26)	0.605

†: Karın ağrısı ve şişkinlik skorları 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli şeklindedir

‡: Dışkılama kıvamı için skor 0: cıvık sulu, 1: püre kıvamında, 2: orta sulu gaita, 3: normal, 4: sert gaita, 5: çok sert gaita şeklindedir.

Ülseratif Kolit ve kontrol grubu arasında ilk iki haftadaki dışkılama kıvamı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p=0.026) diğer değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Ülseratif Kolit grubunun dışkılama kıvamı skoru kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.13: Crohn ve kontrol grubu arasında semptom günlüğü değişkenlerinin karşılaştırılması

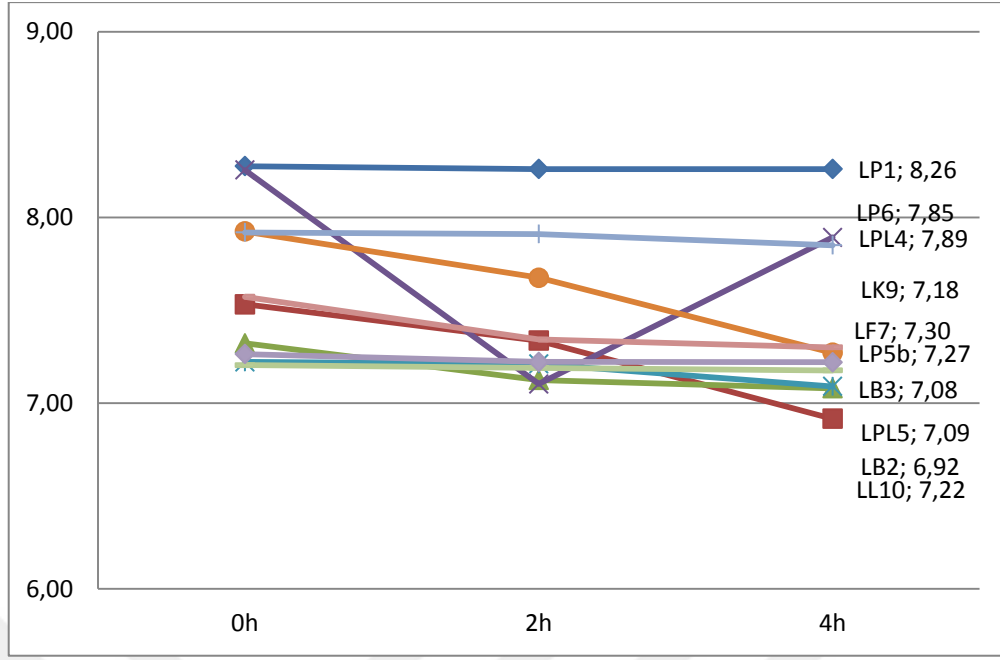
	Crohn (n=10)	Crohn kontrol (n=10)	p
Karın ağrısı ilk 2 hafta†	0.2(0;2.1)	1.46(1.36;1.86)	0.075
Karın ağrısı son 2 haftadaki değişim	-0.7(-1;3)	-0.07(-0.16;0.05)	0.006
Şişkinlik ilk 2 hafta†	0.7(0.2;2.3)	0.89(0;1.71)	0.315
Şişkinlik son 2 haftadaki değişim	-0.5(-1;0)	0(-0.08;0.14)	0.003
Dışkılama sayısı ilk 2 hafta	2.4(0.8;8.7)	2.60(2.07;2.93)	0.853
Dışkılama sayısı son 2 haftadaki değişim	-0.1(-0.2;0.3)	-0.18(-0.42;0.02)	0.481
Dışkılama kıvamı ilk 2 hafta‡	2.2(1.1;3.3)	1.96(1;3)	0.280
Dışkılama kıvamı son 2 haftadaki değişim	0.2(-0.4;0.6)	0.12(-0.02;0.43)	0.971
Kendini iyi hissetme ilk 2 hafta*	3.5(2.6;4.4)	3.07(2.79;3.57)	0.247
Kendini iyi hissetme son 2 haftadaki değişim	0.1(-0.1;0.4)	0.05(-0.04;0.11)	0.218

†: Karın ağrısı ve şişkinlik skorları 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli şeklindedir

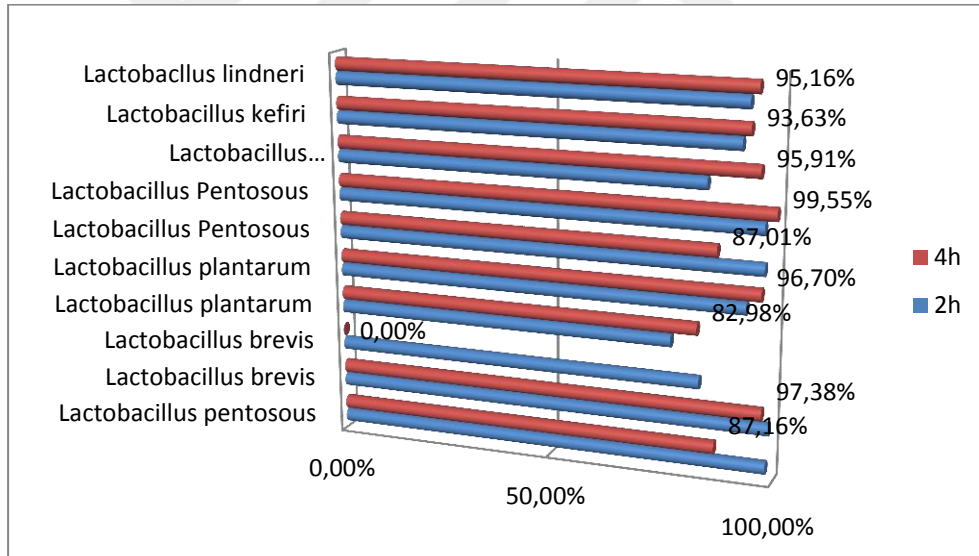
‡: Dışkılama kıvamı için skor 0: cıvık sulu, 1: püre kıvamında, 2: orta sulu gaita, 3: normal, 4: sert gaita, 5: çok sert gaita şeklindedir.

*Kendini iyi hissetme skoru 1: çok kötü, 2: kötü, 3: orta/ normal, 4: iyi, 5: çok iyi şeklindedir

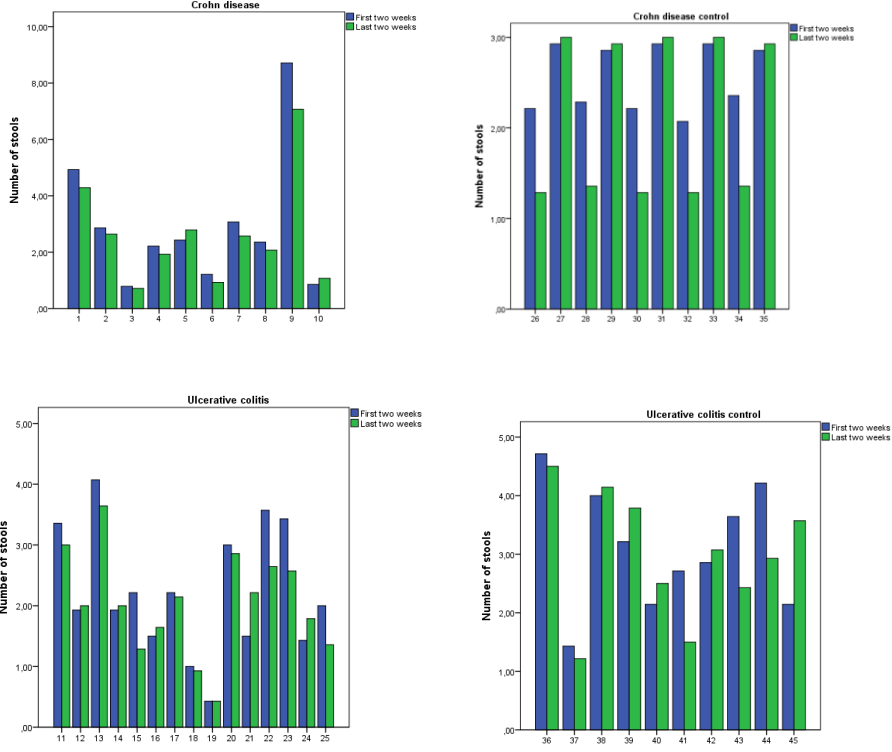
Crohn tedavi ve kontrol grubu arasında son iki haftadaki karın ağrısı ve şişkinlik skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken ($p=0.006$; $p=0.003$) diğer değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Crohn grubunun son iki haftadaki karın ağrısı ve şişkinlik skorlarındaki azalış miktarı kontrol grubundakilerden daha yüksektir. Çalışmamızda ayrıca, Crohn hastalığı olan hastaların 28 günlük kefir tüketiminden sonra C reaktif protein düzeyleri de azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.015$).



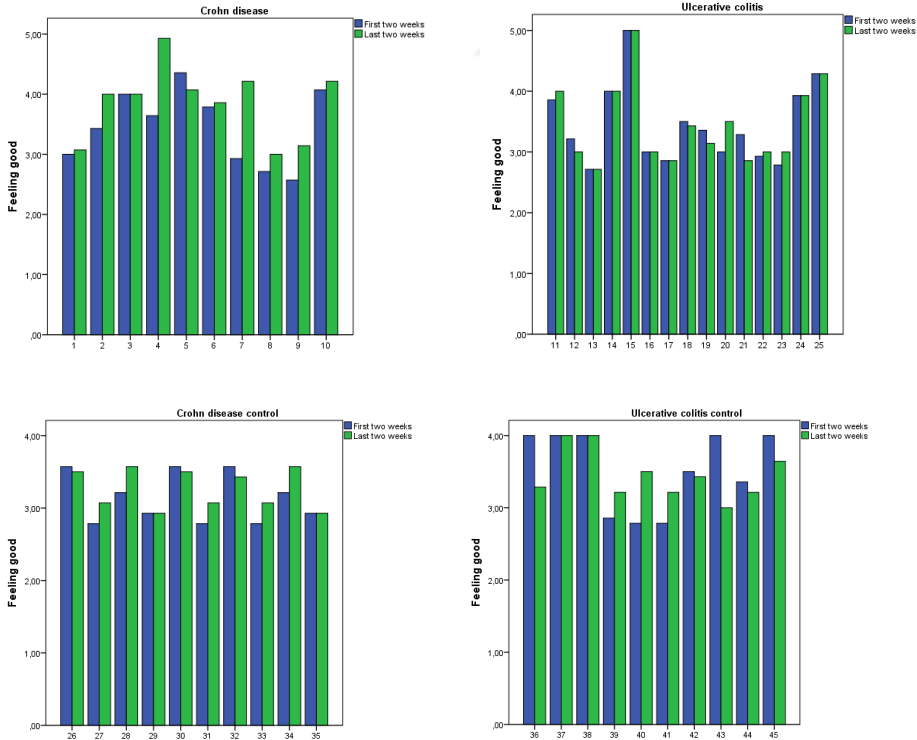
Şekil 4.5: Kefir izolatlarının %0,3 oxgall konsantrasyondaki safra toleransları



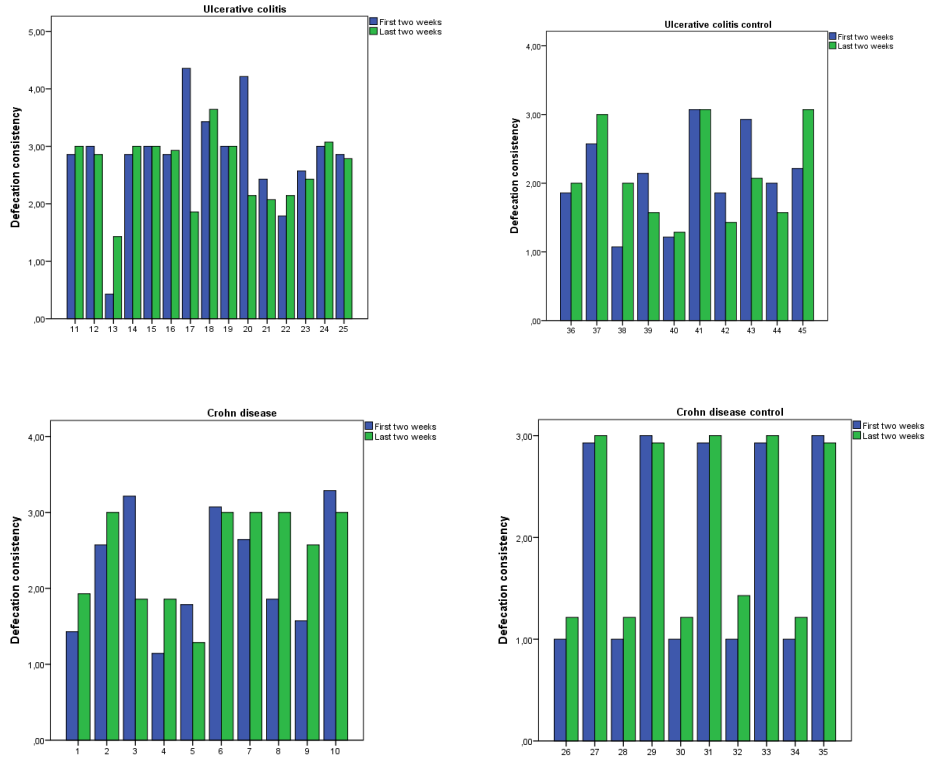
Şekil 4.6: İzolatların 2 ve 4.saatlerde asit ortamında hayatta kalma oranları



Şekil 4.7: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının dışkılama sıklığı değişimi grafikleri



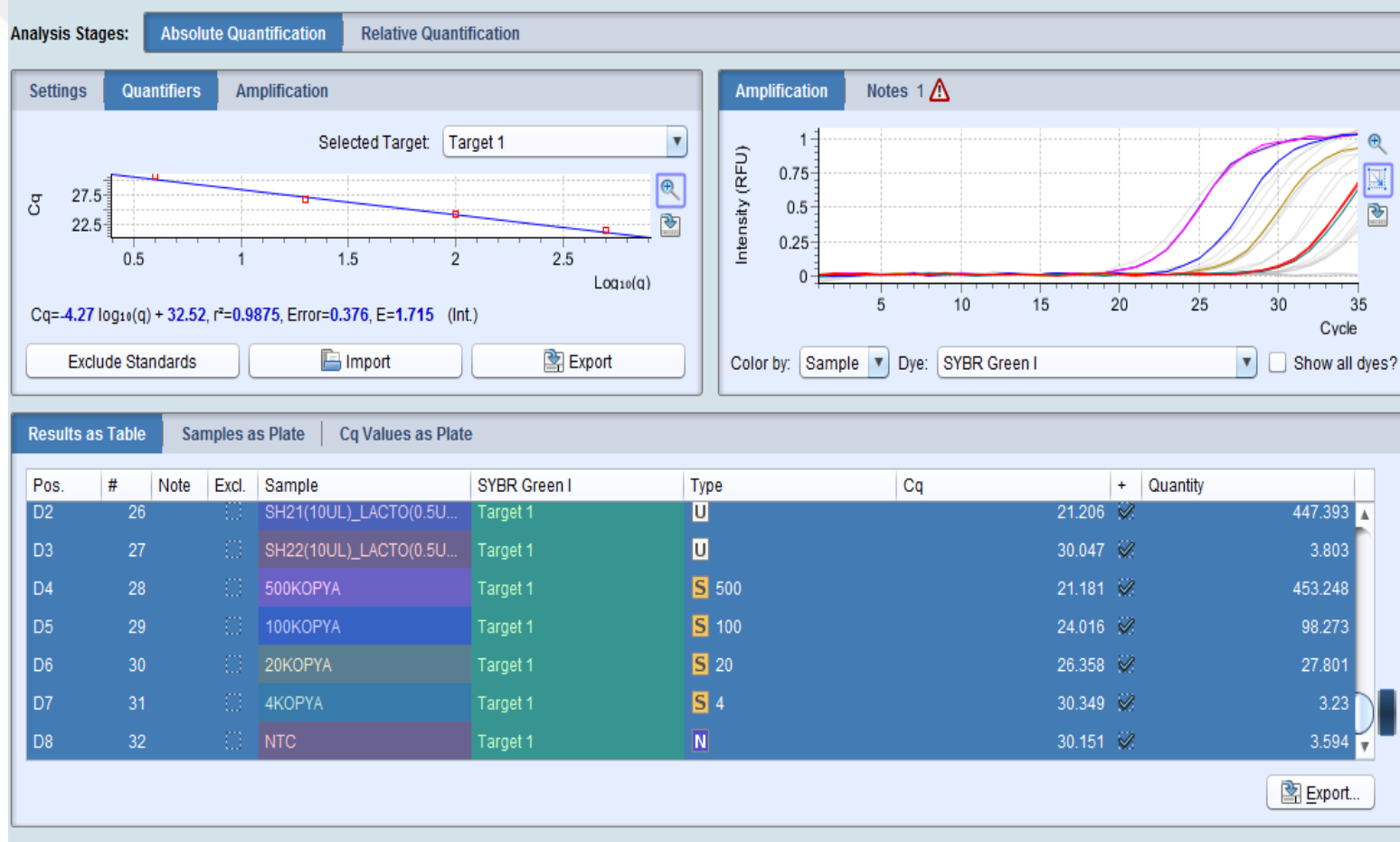
Şekil 4.8: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının kendini iyi hissetme değişimi grafikleri



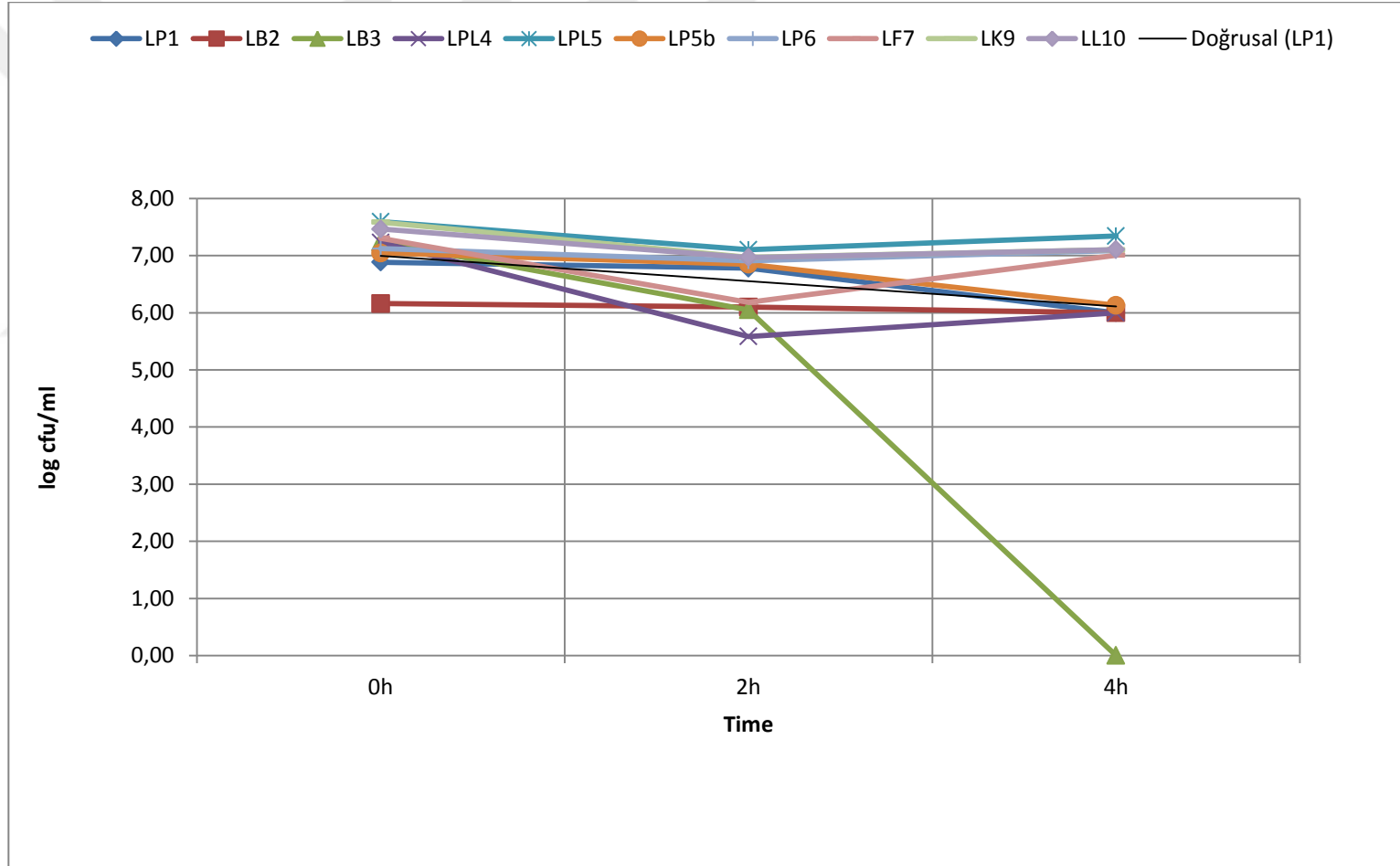
Şekil 4.9: İki haftalık ve dört haftalık kefir tüketiminden sonra UK ve CH hastalarının dışkılama kıvamı değişimi grafikleri



Şekil 4.10: Kontrol ve hasta numunelerinde *Lactobacillus kefir* gerçek zamanlı PCR görüntüsü



Şekil 4.11: Kontrol ve hasta numunelerinde *Lactobacillus spp.* gerçek zamanlı PCR görüntüsü



Şekil 4.12: Üç deneyden elde edilen ortalama değerlerden oluşan 0,2 ve 4. saatlerde 2,5 ph değerinde suşların aside toleranslarını gösteren grafik (log 10 cfu / ml değerine karşı zaman (saat))

Çizelge 4.14: Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formu

AD
SOYAD:

TARİH

SEMPTOMLAR VE HAYAT KALİTESİ DEĞİŞİMİNİN KONTROL FORMU:

	GÜ N	KARIN AĞRISI	ŞİŞKİNLİ K	DIŞKILAMA SAYISI	DIŞKILAMA KIVAMI	KENDİNİ İYİ HİSSETME	
1.haft a	1						KARIN AĞRISI SKORLAMASI
	2						0 YOK
	3						1 HAFİF
	4						2 ORTA
	5						3 ŞİDDET Lİ
	6						
	7						
2.haft a	1						ŞİŞKİNLİK SKORLAMASI
	2						0 YOK
	3						1 HAFİF
	4						2 ORTA
	5						3 ŞİDDET Lİ
	6						
	7						

Çizelge 4.14: (devam): Semptomlar Ve Hayat Kalitesi Değişiminin Kontrol Formu

3.hafta	1						DIŞKILAMA KIVAMI SKORLAMASI
	2						0 CIVIK SULU
	3						1 PÜRE KIVAMINDA
	4						2 ORTA SULU GAİTA
	5						3 NORMAL
	6						4 SERT GAİTA
	7						5 ÇOK SERT GAİTA
4.hafta	1						KENDİNİ İYİ HİSSETME SKORLAMASI
	2						1 ÇOK KÖTÜ
	3						2 KÖTÜ
	4						3 ORTA/ NORMAL
	5						4 İYİ
	6						5 ÇOK İYİ
	7						

HAFİF Hastanın günlük işlerini yapmasını engellemeyen

ORTA Hastanın günlük işlerini yapmasını etkileyen

ŞİDDETLİ Hastanın günlük işlerini yapmasını engelleyen

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Kefir analizleri Mikrobiyolojik Bulguları

Çalıştığımız kefir örneğinde 5.0×10^7 kob / ml laktik asit bakterisi bulunmuştur. Benzer şeklide Irigoyen ve ark., Fontan ve ark., Witthuhn ve ark.'da kefir numunelerinde sırasıyla 8 log kob / ml, 7.2 log kob / ml ve 1.2×10^7 cfu / ml laktik asit bakterisi bulmuşlardır (Irigoyen ve ark. 2005; Fontan ve ark. 2006; Witthuhn ve ark.2005)

5.2 Lactobacillus suşlarının identifikasyonu bulguları

Çalışmamızda 6 değişik lactobacillus suşu tespit edilmiştir bunlar; *Lactobacillus pentosous*, *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefiri*; *Lactobacillus lindneri*'dir.

Bosch ve ark., (2006), kefirden *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* türlerini izole etmişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda kefirden izole edilen en yaygın *Lactobacillus* türleri şu şekildedir:

Lactobacillus brevis, *L. casei*, *L. kefir*; *L. acidophilus*, *L. plantarum* *L. kefiranofaciens* *L. kefirgranum* ve *L.parakefir*'dir (Bosch ve ark. 2005).

Çalışmamızda bulduğumuz kefirden izole edilen bakteri türleri ile aynı türleri bulan benzer çalışmalar da mevcuttur ve bunlar şu şekildedir. *L.fermentum* Witthuhn ve ark. Tarafından, *Lb.kefiri* Garrote ve ark. Tarafından, Kesmen ve Kacmaz tarafından, Magalhaes ve ark. Tarafından, *Lb. plantarum* Garrote ve ark. Tarafından ve Witthuhn tarafından , *Lb. brevis* Simova ve ark. Ve Witthuhn tarafından kefirden izole edilmiştir (Witthuhn ve ark. 2005; Garrote ve ark. 2001; Magalhaes ve ark. 2011; Simova ve ark. 2002, Kesmen ve Kacmaz 2011)

5.3 Asit toleransı

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında, tüm kefir *Lactobacillus* izolatları, Santos ve diğerlerine göre "asit toleranslı" olarak tanımlanmaktadır. (2003) ve dolayısıyla LB3 hariç diğer bütün suşlar potansiyel probiyotik olarak değerlendirilebilir (Santos 2003).

Zheng ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, 3 suş, *Lactobacillus acidophilus* LA15, *Lactobacillus plantarum* B23 and *Lactobacillus kefir* D17; pH 2 asit ortamda 3 saatte ve 0.3% safra tuzlarına direnç göstermişlerdir (Zheng ve ark.2013).

Probiyotik karakterizasyon için %0,3 (w / v) safra tuzu konsantrasyonunda 90 dakikalık inkübasyon ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile Santos ve arkadaşlarına göre tüm kefir izolatları "safra toleransı" olarak tanımlanmıştır ve potansiyel probiyotik olarak değerlendirilmişlerdir (Santos ve ark S. D. 2015)

Papamanoli ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada Ovgall konsantrasyonu için %0,1- 2,0 aralıkları seçilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu kültürlerin canlılıklarını sürdürebilmeleri için %0,3 konsantrasyonun en uygun konsantrasyon olduğu bulunmuştur. Bu yüzde yoğunluk ayırt edici olarak probiyotik bakteri testlerinde kullanılabilir kritik değer olduğunu belirtilmiştir.

5.4 Safra tuzu toleransı

Probiyotikler için gerekli özelliklerden biri de üst gastrointestinal sistemde hayatta kalma yetenekleridir. Bağırsak sisteminin distal kısmına ulaşmadan ve probiyotik etki göstermeden önce, bu bakteriler mide ve bağırsak sisteminin üst kısmı boyunca geçişten hayatta kalmalıdır (Bao ve ark. 2010).

Lactobacillus acidophilus LA15, *Lactobacillus plantarum* B23 ve *Lactobacillus kefir* D17 ile yapılan çalışmada, bu üç suş, 3 saatlik %0,3 safra tuzuna ve pH 2'ye karşı direnç göstermiştir (Zheng ve ark. 2013).

Probiyotik bakterilerin safra toleransı, bağırsaktaki durumu simüle etmek için en az 90 dakika boyunca safra tuzlarının %0,3 (w / v) konsantrasyonunda tespit edilmelidir (Zheng ve ark. 2013).

Sonuç olarak, bu çalışmada kefir içindeki yedi adet *Lactobacillus* suşunun uygun probiyotik adayı olduğu söylenebilir. En iyi probiyotik özelliklerin 2,5 pH değerlerine ve safra asitlerine karşı çok iyi direnç gösteren ve test patojenik bakterilerini inhibe eden *L. kefiri* olarak değerlendirilebilir.

5.5 Antibiyotik duyarlılığı

Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü'nün ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün kriterlerine göre antibiyotiklere dirençli ve antibiyotik dirençli genleri transfer edebilen bakteriler; sağlık açısından güvenli olmadığı düşünülür ve probiyotik olarak kullanılmayacak olarak değerlendirilir (Munoz ve ark. 2013).

Bao ve ark. tarafından 2010'da yapılan çalışmaya göre *Lactobacillus acidophilus LA15*, *Lactobacillus plantarum B23* ve *Lactobacillus kefiri D17* gentamisine, eritromisin ve kloramfenikole duyarlı, ancak vankomisine dirençli olarak bulunmuştur. Çalışmamızda iki suşun gentamisine duyarlı olduğu saptanmış, diğer tüm suşların gentamisine dirençli olduğu bulunmuştur.

Sadece LPL5 suşunun, penisilin'e dirençli olduğu diğer tüm suşların penisiline duyarlı olduğu bulunmuştur. Bir çalışmada *Lactobacillus* suşlarından safraya en dirençli suşlar *L. fermentum ZYN17* ve *L. delbrueckii ssp. BAZ32*, en duyarlı suş ise *L. acidophilus BAZ59* olarak tanımlanmıştır (Şahin 2012). Doğan ve Özpınar'a (2017) göre kefirde izole edilen 3 *Lactobacillus plantarum* suşu probiyotik özellik göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda sunulan veriler, kefirde izole edilen *Lactobacillus* suşlarının gelecekte dikkate alınması gereken önemli sayıda iyi probiyotik kaliteye sahip olduğunu göstermektedir.

5.6 Antimikrobiyal etki

Antimikrobiyal etki bir bakterinin probiyotik olabilmesi için gerekli bir kriterdir. Antimikrobiyal madde üretimi ile üretilen bileşikler gıdalarda aynı zamanda koruyucu özellik göstererek gıdanın mikrobiyolojik dengesini korumaktadır. Çünkü gıda kaynaklı patojenlerin de gelişmesi önlenmektedir (Yoon ve ark. 2008).

E. coli ve diğerk gram (-) bakteriler karşı etkili probiyotikler tarafından üretilen bileşikler koruyucu etki göstermektedir (Okereke ve ark. 2012).

Probiyotiklerin ürettiği bakteriyosinler özellikle gıda kökenli patojen bakteriler inhibe edilebilmektir *Lactobacillus plantarum*'un laktolin gibi antibiyotik maddeler üretebilmektedirler (Messaoudi ve ark. 2013).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre LPL4 suşları *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. Epidermidis* ATCC 12228'in zayıf inhibisyona sahiptir. LF7 ve LL10 ile tüm patojenlere karşı iyi inhibisyon göstermiştir. *S. aureus*, LPL4 dışındaki tüm 9 suş tarafından inhibe edilmiştir. LP5b'nin *Enterococcus faecalis* ATCC 19433'e karşı hiçbir inhibisyonu göstermemiştir. Genel olarak LF7, LK9 ve LL10, test edilen indikatörün organizmalarının çoğuna karşı antimikrobiale aktivite göstermiştir.

Doğan ve Özpınar (2017) tarafından yapılan çalışmada kefir numunesinden izole edilen; probiyotik özellik gösteren *Lactobacillus plantarum* 44 C ve *Lactobacillus plantarum* 74 C suşları patojen test bakterinin tümüne (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*) antimikrobiyal etki göstermiştir.

5.7 Kefirin hastalıklar üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar

Kefir'in biyolojik aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma, kefirin anti-inflamatuar aktiviteye, immün modüle edici aktiviteye, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve fonksiyonel bir gıda türü olduğunu ortaya koymuştur (Zheng ve ark. 2013).

Düzenli olarak kefir tüketimi laktoz sindirimi ve toleransı, antibakteriyel etki, hipo kolesterolemik etki, plazma glikozunun kontrolü, anti-hipertansif etki, anti-inflamatuar etki, antioksidan aktivite, anti-kanserojenik aktivite, anti-allerjenik aktivite ve iyileştirici etkiler ile ilişkilendirilir. Bu bulguları destekleyen çalışmaların büyük bir kısmı in vitro veya hayvan modellerinde yapılmıştır (Shen ve ark. 2014).

Purchiaroni ve ark. 2013 göre probiyotikler, hayvan modellerinde ve bazı klinik araştırmalarda değerlendirilmiştir. Probiyotiklerin VSL # 3'ün oral uygulamasının İmflamtuvar Bağırsak hastalığı sahibi farelerde IL-10 bariyer

fonksiyonunu normalleştirdiği gösterilmiştir. VSL # 3, sekiz farklı gram pozitif organizmadan oluşan probiyotik bir kokteyldir.

Diğer çalışmalar, probiyotik bakterilerin, enfeksiyonlar veya enflamatuar durumlar sırasında intestinal epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantıların bütünlüğünü arttırabileceğini doğrulamıştır. Bu nedenle, probiyotik bakterilerle kolonizasyon, IBD'yi tahrik ettiğine inanılan bakteriyel antijenlere bağışıklık hücrelerinin maruz kalmasına neden olabilir. Deneysel kolitin bir dekstran sülfat sodyum modelinde probiyotik mikroorganizmaların (VSL # 3) koruyucu etkilerinin, mukozal TLR9 reseptörü tarafından tanınan DNA tarafından aracılık edildiğini gösterdi. Bu etkileşim daha sonra bakteriyel sağ kalımı düzenleyen β -defensin ve antibakteriyel peptidlerin artan endojen üretimine yol açmıştır. Ek olarak, VSL # 3 ile kültürlenmiş intestinal epitelyal hücrelerin tedavisinin, transepitelyal elektrik direncinde bir artışa yol açtığı, azaltılmış geçirgenlik ile ilişkili bir değişiklik olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada intestinal epitelyal hücrelerin bu probiyotik konsorsiyumla inkübasyonu aynı zamanda çeşitli münlerin ekspresyonunu indükleyerek, mikroorganizmaların ve bileşenlerinin epitelyal yüzeye yapışmalarının azalmasına neden olmuştur. (Purchiaroni ve ark. 2013).

Probiyotikler ülseratif kolitte remisyonu etkili bir şekilde koruyabilirler, ancak remisyonu indüklenme yetenekleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Hafif-orta UK'li erişkin hastalar, 12 hafta boyunca günde iki kez 3.6×10^{12} CFU VSL # 3 (n = 77) alacak şekilde ve plasebo (n = 70) şeklinde rastgele ayrılmıştır. Ülseratif Kolit Hastalığı Aktivite İndeksinde (UCDAI) 6 haftada%50 oranına azalma gerçekleşmiştir. UCDAI, dışkı sıklığı, rektal kanama, mukozal görünüm ve hekimin hastalık aktivitesi derecesini gösteren bir ölçektir. 6. haftada, UCDAI skorunda%50'den büyük bir iyileşme olan hastaların yüzdesi, VSL # 3 verilen grupta (%25; %32,5) plasebo verilen gruba göre (%10; .001). 12. haftada, remisyona giren VSL # 3 (%42,9) verilen 33 hasta, plasebo verilen 11 hasta (%15,7) ile karşılaştırıldı (P <.001). Ayrıca, VSL # 3 (%40; %51,9) verilen hasta sayısının, UCDAI'de 3 puandan fazla, plasebo verilenlerle karşılaştırıldığında (13; %18,6) bir azalma sağladığı görülmüştür (P <.001). VSL # 3 grubu, UCDAI skorlarında ve 6. ve 12. haftalarda semptomlarda, plasebo grubuna kıyasla anlamlı olarak daha büyük düşüş görülmüştür (Sood ve

ark.2009). Çalışmamızda iki haftalık kefir tüketimleri ve dört haftalık tüketimlerden sonra dışkı UK ve Crohn hastalarının dışkılama sıklığı azaldı

Her ne kadar CD'nin etiyolojisi belirsiz olsa da kanıtlar bağırsak bakterilerinin tutulumunu düşündürmektedir ve çalışmalar CD hastalarının daha yüksek konsantrasyonlarda bakteroidler, fusobakteriler, enterokoklar, E. coli ve daha az sayıda bifidobakteri, laktobasil, öbakteriler, Clostridium coccoides, Clostridium leptum olduğunu göstermiştir. Sağlıklı kişilerden Faecalibacterium prausnitzii ve remisyonda, fekal bakterilerin popülasyonları değişmiştir (Steed ve ark.2010)

Probiyotikler meta analizlerde UC remisyonunu uyarmada terapötik fayda göstermiştir. Probiyotik bakteriler, optimal doz, uygulama şekli ve tedavi süresini seçmek için, probiyotiklerle IBD remisyonunu korumak, rekürrens azaltmak ve 5-ASA kadar etkili olmak için verilmiştir (Shen ve ark.2014).

Lactobacillus kefiri ülseratif kolitli hastalarda remisyonu korumak için etkili ve güvenli gibi görünmektedir ve bu hasta grubunda relapsın önlenmesi için iyi bir tedavi seçeneği olabilir. *L. kefiri LKF01*, bağırsak mikrobiyota bileşimini modüle etme konusunda güçlüdür, bu da doğrudan pro-inflamatuar yanıtın ve gastrointestinal hastalıkların başlangıcında birkaç bakteriyel jenerasyonun önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır (Toscano ve ark. 201).

Lactobacillus, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus spp.* insanda geniş bir aralıktaki bağırsak patojenlerinin büyümesi için inhibitör olduğu bilinmektedir. Bağırsak mikroflorasının dengesizliğinden kaynaklanan hastalığa karşı olumlu etkilere ilave olarak birkaç deneysel gözlem, kolon tümörlerinin gelişmesine karşı probiyotik bakterilerin potansiyel koruyucu etkisini göstermiştir [Şengül 2006].

Fekal bir mikrobiyal analiz kefir tedavi gruplarında kontrol grubununkine kıyasla belirgin derecede daha yüksek fekal laktobacilli sayımı gösterdi. Bu durum in vitro deneylerde olduğu gibi düşük pH ve yüksek safra konsantrasyonunda hayatta kalma yeteneklerine atfedilmiştir. Bağırsak mukozasını kolonize eden bu tür potansiyel olarak probiyotik bakteriler, çeşitli mekanizmalar, besinler için rekabet ve antimikrobiyallerin üretimi yoluyla patojenlere karşı bir bariyer etkisi sağlar.

5.8 Crohn hastalığı tedavisinde probiyotiklerin tartışılması

Crohn hastalarında probiyotik olarak *Lactobacillus salivarius* UCC118 ve *Lactobacillus GG* ve ile yapılan denemeler vardır. Bu hastalarda elde edilen sonuçlar yeterli olmamıştır ancak ileriki çalışmaları için gelecek vaad etmektedir.

Saccharomyces boulardii'nin etkisi de Crohn hastalarına etkisi bir çalışmada araştırılmıştır. Crohn hastalarından remisyona girmiş olanlarına remisyonda tutmak için idame tedavisi uygulanmıştır. Bu tedavide mesalamin 3x1g/gün bir grup hastaya verilmiştir. Diğer gruba *Saccharomyces boulardii* 6 ay boyuca 1 gram olmak üzere ve 2x1g/gün mesalamin verilmiştir. Sadece mesalamin verilen grupta remiyon oranı %38 olarak gerçekleşmiştir. Mesalamin ve *Saccharomyces boulardii*'yi verilen grupta remiyon oranı %94'tür (Guslandi ve ark. 2000).

Rahimi ve ark yaptığı bir meta-analizde probiyotikler Crohn hastalığında remiyonu korumada ve klinik ve endoskopik nüksü önlemede başarısız olmuştur fakat makaleye göre *E. coli* veya *Saccharomyces* olan *Lactobacillus* bir karışımını içeren probiyotik preparatları kullanımı önerilmektedir (Rahimi ve ark 2008).

Gupta ve arkadaşlarının yaptığı pilot bir çalışmada hafif, orta derecede aktif Crohn hastalığı olan çocuklarda *Lactobacillus GG*'nin bağırsak bariyer fonksiyonunu artırabilir olduğunu gösterilmiştir (Gupta ve ark. 2000).

Escherichia coli Nissle 1917 ve placebo etkisi remisyona giren hastalarda Malchow ve ark 1997.tarafından araştırılmıştır. Bir yıl *E. coli Nissle 1917* kullanan hastalardan %70'i remisyonda kalırken bir yıl placebo alanların %30'u remisyonda kalmıştır.

Bousvaros ve ark. 2005 Tarafından yapılan çift kör, randomize, kontrollü olarak yapılan bir araştırmada *Lactobacillus GG*'nin Crohn hastalığı olan çocuklarda nüks zamanını uzatmadığı bulunmuştur.

Remiyon durumunun sürdürülmesi için mesalazinle *Saccharomyces boulardii*, kullanıldığında yalnızca mesalazin verilen gruptan rekürrens onlemede etkili olarak bulunmuştur (Guslandi ve ark. 2000).

Steed ve ark. 2010 Tarafından yapılan incelemede aktif Crohn hastalarına *B. longum* içeren bir sinbiyotik verilmiş ve plaseboyla karşılaştırıldığında etkili bulunmuştur.

Crohn hastalığının tedavisinde probiyotiklerin etkisini kanıtlayabilecek randomize, kontrollü çalışmalar yapılmıştır fakat yeterli değildir. Yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.9 Ülseratif Kolit hastalığı tedavisinde denenmiş probiyotiklerin tartışılması

100 mililitrede 1×10^{10} cfu *Bifidobacteria breve*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* içeren fermente sütün kullanıldığı plasebo kontrollü bir çalışmada remisyonda olan ülseratif kolitli hastalara 12 ay her gün 100 ml bu süttten verilmiştir. Süre sonunda plasebo grubunda %10 remisyonda iken fermente süt içen grupta %73 remisyonda kalmıştır ve klinik remisyonda anlamlı fark belirlenmiştir fakat kolonoskopik bulgularda bir yıl sonunda fark saptanmamıştır (Ishikawa ve ark. 2003).

Aktif UK hastalarında yapılan küçük bir açık etiketli çalışmada yapılmıştır. Canlı *L. plantarum* 299v verilen inaktif bakterilerle tedavi edilen 10 hasta ile karşılaştırıldığında, 9 hastanın 6'sı, remisyona ulaşmıştır (Kordecki ve ark. 2001)

Hafif ve orta şiddetli ülseratif kolite sahip nüks görülen hastalarda 3x250 mg/gün 4 hafta probiyotik *Saccharomyces boulardi* vererek %68 remisyonda kalmaları sağlanmıştır (Guslandi ve ark. 2003)

Tursi ve ark. (2010) göre VSL # 3 takviyesi güvenlidir ve 5-ASA ve / veya immünosupresanlarla tedavi edilen hafif-orta UC'den etkilenen hastalarda UCDAI skorlarını azaltabilir. Ayrıca, VSL # 3 rektal kanamayı iyileştirir ve 8 haftalık tedaviden sonra tekrarlayan UC hastalarında remisyonu yeniden canlandırırabilir. Ancak bu parametreler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamaktadır.

Bir çalışmada da hafif ve orta şiddetteki ülseratif koliti hastalarına mesalamine verilmiş fakat yanıt vermemişlerdir. VSL#3 ile verilince başarılı sonuçlar bildirmiştir (Fedorak ve ark. 2004).

Ülseratif kolitis tedavilerine kortikosteroid, immunsupresiv, 5 ASA tedavisi uygulanır. Bu tedaviye cevap vermeyen 6 hastaya fekal bakteriyoterapi yani sağlıklı kişilerden gaita aktarılması olarak yapılan bir çalışmada 4-6 hafta sonra hastaların ilaç kullanımını tamamen bıraktıkları belirlenmiştir. İleri yıllardaki takiplerde de endoskopik, histolojik, klinik ülseratif kolit nüksünü gösteren bir bulgu bulunmamıştır ve idame tedavisi kullanılmamıştır (Borody ve ark.2003).

Gaita transplantasyonu ile gut florasının değiştirilmesi hakkında için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda da kefir tüketimi sonrası dışkıda *Lactobacillus* miktarının anlamlı düzeyde arttığı ($p=0,001$) tespit edilmiştir. Crohn hastalarında tüm değişkenler açısından kefir kullanım sonrasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermiştir. HGB’de artış görülürken, ESR ve CRP’de anlamlı düşüş gözlenmiştir. Crohn hastaları için son 2 hafta şişkinlik skorları anlamlı derecede düşerken hastaların durumunda düzelme görülmüştür ($p=0.012$). Aynı zamanda kendini iyi hissetme skoru son iki haftada yükselerek hastaların durumunda düzelme görülmüştür ($p=0.032$). Crohn hastalarında HGB ölçümlerindeki artış Crohn kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. ($p=0,024$, $p=0,029$).

Yukarıda belirtilen tüm çalışmalarla muhtemelen sınırlı sayılarından dolayı, mevcut klinik çalışmaların istatistiksel güce sahip olmamasına rağmen, gelecekte probiyotiklerin İBH yönetiminde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bakteriyel ve konakçı karşılıklı etkileşimlerin daha iyi anlaşılması ve farklı klinik alt kümelerde mikrobiyota modifikasyonunu iyi bir şekilde tanımlayabilen yeni tekniklerin bulunması, İBH hastalarında etkili probiyotik tedavisinin başarısının anahtarı olabilecektir. (Purchiaroni ve ark. 2013)

5.10 Moleküler Tekniklerle Mikrobiota Analizlerinin Değerlendirilmesi

Bağırsağın genel bileşimi, İBH’nın etiyolojisinde ve patogenezinde en alakalı olarak düşünülmektedir. Fakat mikrobiyota analizler uzun ve emek yoğun çalışmalardır ve bu çalışmalar sonucunda da ancak kültür edilebilir bakterileri sadece mikrobiyotanın %20-30’unu belirleyebilmektedir. Karmaşık anaerobik ortam gereksinimleri yüzünden kalan kısmı kültüre edilememektedir.

Bu yüzden, mikrobiyota analizlerinde moleküler yaklaşımlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Andoh ve ark. 2011).

IBH bağırsak mikrobiyotasını analizi için Gophna ve ark tarafından yapılan bir çalışmada 16S r DNA-kolon kütüphanesi dizin metodu kullanılmıştır. Sonuçlarda Crohn hastalarında *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* türlerinde artışa karşılık Clostridium ailesinde azalma tespit edilmiştir (Gophna ve ark. 2006).

Manichanh ve ark. (2006) DNA macroarray-based analiz metodu kullanarak Crohn hastalarında Clostridium ailesinde belirgin düşüş saptamışlardır, fakat Bacteroides ailesinde önemli bir değişiklik saptanmamıştır.

Bir çalışma kültürden bağımsız bir PCR protokolü ile kültür temelli teknikler veya DNA izolasyonu ve saflaştırma prosedürleri haricinde, insan dışkıları içinde *S. thermophilus*'u doğrudan saptamak için yapılmıştır. VS.-3 veya yoğurt verilen 10 sağlıklı bireyin dışkılarında *S. thermophilus*'un bağırsakda kalıcılığı araştırılmıştır. 3 günlük uygulama sonrasında aranan bakteri saptanmış ve tedavi süspansiyonundan 6 gün sonra da bulunmaya devam etmiştir.

İnflamatuvar bağırsak hastası 10 hasta üzerinde yapılan bir denemede hastalara iki ay boyunca VSL-3 probiyotik karışımı verilmiş ve gaitaları PCR ile analiz edilmiştir. Sonuçta *S. thermophilus*, *B. infantis* Y1 and *B. breve* Y8 suşlarının kolonizasyonları sağlıklı bireylerinki gibi bulunmuştur (Brigidi ve ark. 2003).

UK ve Crohn hastalarının fekal mikrobiyotasının sağlıklı bireylerden farklı olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada T-RFLP analizini kullanarak yapılan çalışmalar farklılığı gösterilmiştir. Ancak inaktif UK hastalarının bağırsak mikrobiyotası sağlıklı bireylerinkine benzer özellikler göstermektedir. Bu hastaların bağırsak mekanizmalarının belirlenmesi ve mikrobiyota yapısında değişiklik, UK ve Crohn hastaları için yeni bir tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. (Andoh ve ark. 2011).

Çalışmamız da kültür yöntemi ile değil kantitatif moleküler yöntemle Real Time-qPCR cihazı kullanılarak bulunan kefir tüketimi sonrası dışkıda *Lactobacillus* miktarı anlamlı düzeyde artış ($p=0,001$) göstermiştir.

5.11 Kefirin Gastrointestinal Rahatsızlıklar Üzerine Etkilerinin Tartışılması

Sürekli içildiğinde kefirde yer alan laktobasiller bağırsaklara yerleşir ve patojen bakterilere karşı buradaki mikroflorayı düzeltir asit bileşenleri üreterek hastalık yapan bakterilerin ortadan kalkmasını sağlayabilmektedir. (Anonymous, 2001). Salmonella, Shigella gibi patojen bakteriler süte kefir starteriyle birlikte katılırsa da bu patojenlerin gelişme göstermedikleri bulunmuştur. (Medici ve ark, 2005). Ayrıca mikroflorasında bulunan laktik asit bakterileri ve mayalar kefir bağırsak mikroorganizmalarına engelleyici etki gösterir. (Wszoleka ve ark., 2001). Kefir dışkının kolayca atılmasını sağlayarak transit time süresini düşürür. Antibiyotik tedavisi uygulandığında bozulan bağırsak florasının yeniden düzenlenmesini sağlar. (Anonymous, 2001).

Kefir içerdiği antimikrobiyal bileşiklerle patojen mikroorganizmaların gelişimini önler. Gastrik salgı kefirin bu özelliği sayesinde artmaktadır. Salgının artmasının *Salmonella typhimurium*'a etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 1 saatte inhibasyonun olduğu kefirin etkili olduğu bulunmuştur (Zubillaga ve ark., 2001).

Kefirin ishale etkileri de araştırılmıştır buna göre ishale sebep olabilen patojenlerden *E. coli* ve Salmonella ile yapılan denemelerde kefir antimikrobiyal etki göstererek bu bakterilerin inhibasyonunu sağlamıştır (Tomar ve ark. 2017).

Süt ürünleri Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarında gaz ve şişkinliğe sebep olabilmektedir. Süt ürünlerini tüketmekte imtina eden Crohn ve Ülseratif Kolit hastaları fermente bir süt ürünü olan kefir rahat tüketebilmekte ve rahatsızlık hissetmeyerek kalsiyum kaynağından uzak kalmak zorunda kalmamaktadırlar. Laktoz intoleransına sebep bağırsakta β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesinin düşük olmasıdır. Laktoz intoleransı olan kişilerde laktozun bağırsakta ilerlemesi ile ozmotik etki oluşur ve enzim eksikliği sebebiyle sindirilemeyen laktoz fermantasyona uğrar ve metan, hidrojen ve organik asitler ortaya çıkar bu durum da rahatsızlıkların ortaya çıkmasına sebep olur. Kefirdeki lactobacilluslar laktozu bağırsakta hidrolize ederek laktoz intolerans kişilerde rahatlamaya sebep olabilmektedir (Vinderola ve ark., 2005).

Kefirin antibakteriyel aktivitesi gram pozitif kok ve basillerle Staphylococcus türlerine karşı oluşmaktadır ve danelerdeki antibakteriyel aktivite dah yüksek bulunmuştur. Zubillaga ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada deneklerden bir gruba kefir diğer bir gruba düşük yağlı süt verilmiştir. Denekler laktoz intoleransına sahiptir. Süt verilen grupta ishal ve karında ağrı görülmüş fakat kefir verilen grupta bu etkiler görülmemiştir. Kefir mide kaslarını çalıştırarak sağladığı için *Helicobacter pylori* enfeksiyonu olan hastalara da tavsiye edilebilmektedir çünkü midenin boşalma süresini kısaltır (Zubillaga ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalarda kefirin kanser hücrelerinin hızlı çoğalmasını ve tümörlerin büyümesini önleyen ya da engelleyen etkilerinin olduğu da belirlenmiştir.

Kefirin *E. coli 0-157*' etkisi üzerine yapılan bir çalışmada bu enfeksiyonunun kefir sayesinde önlenebileceği bulunmuştur. Kefirdeki laktik asit bakterilerinin bağırsakta kolonize olması ile *E. coli 0-157* tarafından üretilen toksinler (verotoksin 1 (VT1) ve verotoksin 2 (VT2)) engellenebilmektedir (Daş ve ark, 2012).

Bazı organlarda oluşan enfeksiyonlar viral kaynaklı ya da fungal veya bakteri kaynaklı olabilir. Kefir ağızdan alındığında bu enfeksiyonlar kefirin içindeki bazı şuşlar tarafından engellenebilir bu etki özellikle immun sisteme etki ile oluşur veya tamamen engellenir ya da yavaşlayabilir (De Vrese ve Schrezenmeir, 2002).

İnflamatuar bağırsak hastalığında da (Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı) bağırsak mikroflorasıyla az sayıda Lactobacilli ve Bifidobakteri ve yüksek sayıda koklok ve anaerobik bakteri bulunur. Probiyotikler hastaya remisyon dönemini devam ettirmede yardımcı olur. Probiyotikler hastalığı tedavi etmezler, ancak hastalardaki remisyon süresini uzatabilir, hastaların yaşam kalitesini arttırabilir (Özden 2008).

5.12 Gaita sonuçları, semptom günlüğü verileri ve biyokimyasal parametrelerin tartışılması

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında, hastalığı bitirici tedaviler olmadığı için hayat kalitesini arttırmak semptomlara göre tedaviyi yönlendirmek

gerekmektedir. Bu çalışmada daha önce inflamatuvar bağırsak hastalıkları olan insanlar üzerinde etkileri araştırılmamış, probiyotik bir gıda olan kefirin hastaların bağırsak mikrofloralarına ve dolayısıyla yaşam kaliteleri üzerindeki etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

Yapılan randomize plasebo kontrollü bir çalışmaya klinik ve endoskopik remisyondaki 40 hasta katıldı. VSL # 3, 6 g / gün 9 ay hastalara verildi. Fekal örnekler, tedavi öncesi ve sonrasında taplandıktan sonra laktobasillus, bifidobakteriler ve *S. thermophilus*'un fekal konsantrasyonu, sadece VSL # 3 ile tedavi edilen grupta bazal seviyelerden anlamlı şekilde artmıştır (P <0.01) (Gionchetti ve ark. 2000) Biz de çalışmamızda bir aylık kefir tüketimi sonunda (içerdği probiyotik mikroorganizmalar LP1, LP 6, LP 5: *Lactobacillus pentosus*; LB 2, LB 3: *Lactobacillus brevis*; LPL 4, LPL 5: *Lactobacillus plantarum*; LF 7: *Lactobacillus fermentum*, LK 9: *Lactobacillus kefir*; LL 10: *Lactobacillus lindneri*) hastaların gaitadaki *Lactobacillus* miktarı bütün denekler için 10^5 – 10^7 CFU/g olarak bulunmuştur. *Lactobacillus kefir* için ise 18 hastada 10^4 – 10^6 CFU/g olarak bulunmuştur ve lactobacillus miktarındaki değişim de anlamlıdır.

Çalışmamızda kefir kullanmaya başlayan ülseratif kolit ve crohn hastalarının ilk haftalara göre kefir probiyotiklerinin kolonize olduğu ve bağırsaktaki pozitif dengeyi sağlamaya başladığı son iki hafta hastalık belirtileri ve hayat kalitesinde önemli ölçüde düzelmeye yol açtığı görülmüştür. Literatürdeki sonuçların çoğunlukla farklı semptom değerlendirme yöntemleriyle yapıldığı için, çalışmamızın verileriyle doğrudan karşılaştırma yapılamamıştır.

Ayrıca literatürdeki İBH çalışma verileri, hayat kalitesi değişimleri ile ilgili kesin sonuçlara varmak için yetersizdir. Çalışmamızda kısa süreli kefir tüketimi ile hayat kalitesindeki değişiklikler, hastalar tarafından fark edilemeyebileceğinden ortaya konamamış da olabilir. Hasta sayısındaki yetersizlikler ise değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlılık kazanmasına engel olabilir.

Elde ettiğimiz verilere göre, kefir kullanan hastalarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bazı kriterlerde karın ağrısı, şişkinlik ve hayat kalitesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düzelmeye ulaşılmıştır. Crohn

hastalarında son iki haftada karın ağrısı skoru ülseratif kolit hastalarına göre daha fazla azalma gösterirken kendini iyi hissetme skoru Crohn hastalarında daha fazla artış göstermiştir. Crohn hastalarının ilk 2 hafta ile son iki hafta semptom günlüğü verileri incelendiğinde şişkinlik ve kendi iyi hissetme açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur.

Çalışmamızda inflamatuvar bağırsak hastalıklarında kontrol grubuna göre karın ağrısı ve şişkinlik skorlarındaki düşüş Nagendra ve Shah (2007) tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak bulunmuştur.

Kefir kullanımının defekasyon sayısını anlamlı şekilde etkilememiştir fakat hastalarda gaita kıvamında iyileşme sağlamıştır. Sonuç olarak kefir, İBH hastalarının hayat kalitesini iyileştirmede bir seçenek olarak düşünülebilir. Ancak tekrarlanan, uzun süreli ve daha geniş hasta popülasyonları üzerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Crohn hastalığı olan hastalara *L. lactis*'in kullanıldığı bir çalışmada, bir haftalık tedaviden sonra CDAI'de ortalama bir azalma olmuş, yumuşak dışkıdaki azalma bunun oluşmasında önemli bir faktördür ve C-reaktif protein düzeylerinde eşzamanlı bir düşüş olmuştur (Baat ve ark.2006). Çalışmamızda, Crohn hastalığı olan hastaların 28 günlük kefir tüketiminden sonra C reaktif protein düzeyleri de azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.015$).

5.13 Gıda Bilimi açısından bulguların önemi ve öneriler

Bu araştırmada öne çıkan başlıca sonuçlar ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

- Kefir, çok sayıda faydalı mikroorganizma içeren ve fonksiyonel bir gıda olarak büyük potansiyelli bir üründür. Güvenlidir, düşük bir üretim maliyeti vardır ve diyetle kolayca birleştirilebilir. İçeriğindeki mikroorganizmaların çoğu probiyotik özellik göstermektedir.
- Şüphesiz ki kefir Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarında potansiyel yararlı etkilerinin kalıcılığını değerlendirmek hastaları takip etmek de dahil olmak üzere, kefirin en iyi doz-yanıt etkisini değerlendirmek için ileri çalışmalar gerekmektedir.
- Ne yazık ki, kefir ile yapılan sayısız insan araştırması çoğu zaman zayıf tasarlanmış çalışmalardır. Deneyin örnek boyutu ve süresi, çalışma hedefleri ve

metabolik parametrelerdeki değişiklikleri doğrulamak için yapılan analizler tutarlı değildir. Bu nedenle, kefir kullanımı ile ilgili deneysel ve klinik araştırmaların farklı çalışma dizaynları ile net sonuçların ulaşılmasında güçlük çekilmektedir.

- Bir diyetin parçası olarak kefirin fizyolojik etkilerini daha iyi değerlendirmek ve anlamak için belirli etki mekanizmalarını hedef alan iyi klinik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Örneklemenin boyutu ve süresi, genellikle, çalışma hedefleri ve metabolik değişiklikleri doğrulamak için yapılan analizlerle tutarlı olmalıdır.
- Kefir tkretimini net etkisini gösteren ve hastalık riskinin azaltıldığını gösteren daha fazla insan çalışması gerçekleştirilmelidir.
- Halk sağlığı açısından probiyotikler ve kefir koruyucu hekimlikte daha fazla yer bulmalıdır.
- Gıdaların sağlığa etkilerinin araştırıldığı sağlık ve yaşam bilimleri ile disiplinlerarası lisansüstü çalışmalarının teşvik edilmesi gerekliliği görülmüştür.
- Gıda bilimi açısından uzun süren ve uğraştırıcı kültür yöntemleri yerine hızlı genotipik (moleküler) yöntemler geliştirilmeli ve kullanımı yaygınlaştırılmalıdır.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz verilere göre düzenli kefir kullanımı gaitada *lactobacillus* oranında artışa sebep olabilmekte ve özellikle Crohn hastalarında, semptomlar ve hayat kalitesinde kısa dönemde düzelmeye yol açabilmektedir fakat bu etkilerin kesin şekilde ispatlanması için denemeler daha yüksek hasta popülasyonları üzerinde devam etmelidir. Bununla birlikte, probiyotiklerin bağırsak ekolojisini etkilemeye yönelik gerçek etkileri araştırılmalı ve mikrobiyal suşlara yönelik özelleştirilmiş çalışmalar ile hastalıklara özgü gıda ürünü formülasyonları üzerinde ileri teknikli çalışmalar yapılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Akçelik, M., Ayhan, K., Gürgün, V. ve Tunail, N.** (1999): Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara.
- Aksoy, M.A.** (2007): Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Altay F., Karbancıoğlu Güler F., Daskaya-Dikmen C., Heperkan D.,** (2010): A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics, *Int J Food Microbiol*, Vol. 1, No. 167
- Andoh A., Imaeda H., Aomatsu T., Inatomi O., Bamba S., Sasaki M., Saito Y., Tsujikawa T., Fujiyama Y.,** (2010): Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis, *Aliment Pharmacol Ther.* ;29(1):75-82.
- Angula, L., Lopez, E. and Lema, C.,** (1993): Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain), *J. Dairy Research*, 60, 263-267
- Anonim,** (2001): Muhafaza Süresince Kefirin Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Niteliklerindeki Değişmeler. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Dergisi, Sayı:137.
- Arda, M.** (2015): Boyalar ve Boyama Metotları, Temel Mikrobiyoloji 1, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
- Atasever, M., Uçar, G., Köse, Z.** (2001). Muhafaza süresince kefirin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyusal niteliklerinde değişiklikler. *Tarım ve Köy Dergisi*, 137
- Bağdatlı A.B., Kundakçı A.,** (2013): Fermente et ürünlerinde probiyotik mikroorganizmaların kullanımı, *C.B.Ü. Fen Bil. Dergisi* 2013, 31 –37
- Bao Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, et al.** (2010): Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21: 695–701
- Baran B, Karaca C.,**(2013): Practical medical management of Crohn's disease, *Gastroenterol.*
- Baysal, A.** (2002) Beslenme. 9 Baskı, Ankara: Hatipoğlu Yayınevi,363- 370.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., Dimitrov, Z. H. P.** (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal.* 13, 529–535)
- Biber M.,** (2009) : Ülseratif Kolit Ve Crohn Hastalarında Yaşam Kalitesi Anksiyete Ve Depresyon, (Doktora Tezi), İstanbul,
- Borody TJ, Warren EF, Leis S et al.** (2003) Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterology*; 37: 42-7.
- Bosch, A., Golowczyc, A., Abraham, G., Garrote, L., De Antoni, L., Yantorno, O.,** (2005): Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. 111

- Bousvaros A,** (2005) : A randomized, double-blind trial of Lactobacillus GG versus placebo in addition to Standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Dis.*, 11:833Y9
- Braat, H., Rottiers, P., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J.-P., van Deventer, S., Neiryck, S., Peppelenbosch, P., Steidler, S., Hommes, W.,** (2006): IL-10 Producing Lactococcus lactis for the Treatment of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* S26–S27
- Brigidi P, Swennen E, Vitali B, Rossi M, Matteuzzi D.,** (2003): PCR detection of Bifidobacterium strains and Streptococcus thermophilus in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption, *Int J Food Microbiol.*, 25;81(3):203-9
- Bulut Ç.** (2003): Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cheese. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 112s, İzmir
- Candelli M., Novı M., Rıgante D., Cazzato I. A., Ojetti V., Armuzzi A., Gasbarrını G., Gasbarrını A.,** (2006): Efficacy of lactobacillus gg in maintaining remission of ulcerative colitis, *Aliment Pharmacol Ther.*, 1;23(11):1567-74. s.
- Chen C, Chan HM, Kubow S.** (2007) Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells. *J Med Food.*, 10:416-422.).
- Chen H.S., Wang S.Y., Chen M.J.** (2008) Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 25: 492-501.
- Chen M.J., Tang H.Y., Chiang M.L.,** (2017): Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated Probiotic Lactobacillus kefirifaciens M1, *Food Microbiology*, 66, 20-27
- CLSI.** 2015-2016 Catalog,2015. Erişim: <http://clsi.org/wp-content/uploads/sites/14/2013/07/CLSI-2015-Catalog.pdf>
- Daş G., Ataşoğlu C., Akbağ H.I , Tölü C., Yurtman İ.Y., Savaş T.,** (2012): Effects of kefir on coccidial oocysts excretion and performance of dairy goat kids following weaning, *Trop Anim Health Prod.* 2012 Jun; 44(5): 1049–1055.
- De Vrese, M. ve Schrezenmeir, J.,** (2002): Probiotics and Non-Intestinal Infectious Conditions. *British Journal of Nutrition*, 88, 59-66.
- Demirbas N., Oktay D., Tosun D.,** (2006): AB sürecindeki Türkiye'de gıda güvenliği açısından geleneksel gıdaların üretim ve pazarlaması. *Hr.Ü.Z.F. Dergisi*, 10 (3/4):47-55 ,
- Doğan, M., Ozpınar, H.,** (2017): Bazı Gıda Ürünlerinden İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi.
- Dubois, D., Grare, M., Prere, M. F., Segonds, C., Marty, N., & Oswald, E.** (2012): Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2568-2576
- Emmanouil Angelakis, Matthieu Million, Mireille Henry, and Didier Raoult,** (2011): Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and

- Yoghurts by MALDI-TOF MassSpectrometry, JournalofFoodScience Vol.76, Nr.8,
- Ergüllü, E. ve Üçüncü, M.**, (1983): Kefir mikroflorası üzerine bir araştırma, Gıda, 8(1), 3-10.),
- Etöz D.**, (2006.): Kefirden izole edilen maya ve bakterilerin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri EnstitüsünBiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 91 s, Ankara
- Fedorak RN, Madsen KC.** (2004): Probiotics and management of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10; 3: 286-98
- Fontan MCG, Martinez S, Franco I, Carballo J** (2006): Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cow's milk, using a commercial starter culture. *Int Dairy J*, 16, 762-767.
- Gajdusek, S.**, (2002): Significance of proteolytic bacteria for the ripening of kefir, *Sborn. Vysoke Skoly Chem. v Praze., Potravin. Tech.*, 6(3), 331,
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L.**, (2001): Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of Dairy Research* 68, 639–652.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A**, (2000): Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 119:305–309.
- Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ.** (2006): Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol.* 44:4136–41
- Gupta P**,(2000): Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 31:453Y7.
- Guslandi M, Giollo P, Testoni PA.** (2000): A pilot trial of *Saccharomyces boulardii*, *Dig Dis Sci*;45(7):1462-4.
- Guslandi M, Giollo P, Testoni PA.** (2003): A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 15: 697-8.
- Halkman, A.K.** (2005): Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. Ankara, 73-89, 250.
- Heczko PB, Strus M, Kochan P.** (2006): Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J Physiol Pharmacol.*, 57:5-12.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T.** (2000): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez FC** (2005): Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chem*, 90, 613-620.
- Ishikawa H et al.** (2003): Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr*; 22: 5663.
- ISO 6887-6:** (2013):Microbiology of food and animal feed -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

- ISO 7218:2007:** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., (2011):** An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 248-260. A19.
- Kesmen, Z., Kacmaz, N., (2011):** Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science* 76, 276–283.
- Klingberg T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. ve Budde, B.B. (2005):** Identification of potential probiotic cultures for Scandinavia-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 419-431.
- Koçhan F., Erdem E., Babacan B., Paker P., Gökden Y., Saltürk A.D., Özer S., Koçak F., Gönen C., (2014):** İnflamatuvar barsak hastalıklarının aktivite tayininde endoskopik aktivite indeksleri ile laboratuvar parametreleri arasındaki ilişki Correlation between clinical and endoscopic activity indices and laboratory parameters in determining the activity of inflammatory bowel disease Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği Dergisi, (13), 101 – 106
- Konar, A., Şahan, N. (1989).** İnek, koyun ve keçi sütünden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu kefiirlere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerine araştırma, Bursa 1. Uluslararası Gıda Sempozyumu, p. 187-197
- Kordecki HJ, Niedzielin K. (2001):** May the enrichment of colon microflora with *Lactobacillus plantarum* improve the results of treatment of irritable bowel syndrome and/or ulcerative colitis? *Gut*;49(suppl III):2880
- Lee MY, Ahn KS, Kwon OK, (2007):** Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*.212:647-654.)
- Lee, K.S. and Kim, D.S., (1986):** Microbiological characteristics of kefir cultures, *Korean J. Dairy Scien.*, 8(4), 266-274,
- Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. (2002):** Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*.23:67-74.
- Wszoleka A.Y. Tamimeb* D.D. Muirc† M.N.I. Barclayb, (2001):** Properties of Kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with Different Starter Cultures **Volume 34, Issue 4, June 2001, Pages 251-261**
- Magalhaes, K.T., Pereira, G.V.M., Campos, C.R., Dragone, G., Schwan, R.F., (2011):** Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 693–702.
- Malchow HA. (1997):** Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol.*, 25: 653-8.
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. (2006):** Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.*, 55:205–11.
- Medici M, Vinderola CG, Weill R, Perdigon G., (2005):** Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice, *J Dairy Res.* 72(2):243-9.

- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J. M., & Dousset, X.** (2013): Lactobacillus salivarius: bacteriocin and probiotic activity. *Food microbiology*, 36(2), 296-304.
- Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo, C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, Cintas LM:** (2013): ,Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol*, 13, 15.
- Nagendra P. Shah. Ā.,** (2007): Review. Functional cultures and health benefits.. *International Dairy Journal* 17 1262–1277
- Okereke, H. C., Achi, O. K., Ekwenye, U. N., & Orji, F. A.** (2012): Antimicrobial properties of probiotic bacteria from various sources. *African Journal of Biotechnology*, 11(39), 9416-9421.
- Oktay E.,** (2001): İnflamatuvar Barsak Hastalıkları: Etyopatogenez Semptomatoloji, Tanı ve Komplikasyonları. İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, İstanbul, pp: 199-206
- Özden A.,** (2008): Diğer Fermente Süt Ürünleri, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi* 169-181
- Özden A.,** (2012), Probiyotik “Sağlıklı Yaşam İçin Yararlı Dost Bakteriler”, *Türk Gastroentoloji Vakfı Yayınları, Eskişehir* pp:286
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P.** (2003): Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry-Fermented Sausage in Respect of Their Technological and Probiotic Properties. *Meat Science*, 65: 859-867.
- Parkes GC.** (2007): An overview of probiotics and prebiotics. *Nurs Stand.* 24–30; 2:43-47
- Phillips, M., Kailasapathy, K. and Tran, L.** (2006): Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2): 276-280.
- Pintado, E., Da Silva, L., Fernandes, B., Malcata, X., Hogg, A.,** (1996), Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology* 31, 15–26.
- Pogacic T, Sinko S, Zamberlin S, Samarzjia D.,** (2013): Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 63(1): 3-14
- Purchiaroni F., Tortora A., Gabrielli M., Bertucci F., Gigantef G., Ianiro G., Ojetti V., Scarpellini E., Gasbarrini A.** (2013): The role of intestinal microbiota and the immune system, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17,323-333
- R Balfour Sartor.**(2007): Probiotics for gastrointestinal disease. In: *UpToDate*, Rose BD. (Ed), *UpToDate*, Waltham, MA,
- Rahimi R, Nikfar S, Rahimi F, Elahi B, Derakhshani S, Vafaie M, Abdollahi M.A** (2013): Meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. *53(9):2524-31.*
- Rembacken BJ, Snelling AM et al** (1999): Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis. *Lancet*; 354: 635-9.

- Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM** (2005): .Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents*. 25:404-408.
- Sahin Ş.**, (1995): Endüstriyel Mikrobiyoloji. Uludag Üniversitesi Ziraat Fakültesi,151s, Bursa.
- Salminen S, Benno Y, de Vos W.** (2006); Intestinal colonisation, microbiota and future probiotics? *Asia Pac J Clin Nutr.*, 15:558-562.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D.** (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437
- Santos, K. M. O. D., Vieira, A. D. S., Salles, H. O., Oliveira, J. D. S., Rocha, C. R. C., Borges, M. D. F., ... & Todorov, S. D.** (2015): Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 237-249.
- Sengul N, Aslim B, Ucar G,** (2006): Effects of exopolysaccharideproducing probiotic strains on experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum*, 49:250-258.).
- Seydim, G.Z., Seydim, A.C. Greene, A.K.** (2000): Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*. 83, 275-277.
- Shen J, Zuo ZX, Mao AP,** (2014): Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis* ;20:21–35.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts, Frengova, G., Spasov, Z.,** (2002): Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 1–6.
- Song M., Yun B., Moon J.H., Park D.J., Lim K., Oh S.,** (2015): Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics, *Korean J Food Sci Anim Resour*, 35(4): 551–556.
- Sood A, Midha V, Makharia GK,** (2009): The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.*; 7:1202–1209.
- Steed H, Mafarlane GT, Blackett KL, Bahrami B, Reynolds N, Walsh SV,** (2010): Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption, a randomized double blind placebo controlled study inactive Crohn's disease. *Aliment Pharma col Ther*;32(7):872-83
- Şahin, N.,** (2012): Hayvan Kaynaklı *Lactobacillus* Türlerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, Ş., Bursahoğlu, M. ve Oğultekin, R.** (1989): 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tan E.** (2004): Türkiye geleneksel gıda ürünleri projesi. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül, Van.).
- Tharmaraj, N. and Shah, N.P.** (2003): Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Sreptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*, *Journal Dairy Science*, 86: 2288-2296.

- Tille PM** (Ed.). (2014): Overview of bacterial identification methods and strategies in Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 13th ed., p. 193-231
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T.** (2006): Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41(1), 11-19
- Tomar O., Çağlar A., Akarca G.** (2017): Kefir ve Sağlık Açısından Önemi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 834-853
- Toscano, M., De Grandi, R., Miniello, L., Mattina, R., Drago, L.,** (2017): Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals.
- Truelove SC, Witts LJ.** (1995): Cortisone in ulcerative colitis. Final report on therapeutic trial. *Br Med J*, 2:1041-1048.
- Tursi A., Brandimarte G., Papa A.,** (2010): Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis With the Probiotic VSL#3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study, *Am J Gastroenterol.* 105(10): 2218–2227.
- Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25)
- Ulusoy B.H., Hilal Ç., Hampikyan H., Erkan M.E.,** (2007): Kefirin gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkisi üzerine bir in-vitro çalışma, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 37 (2): 103-107
- Ulusoy, B.H.,** (2007). Kefir Starter Kültürüyle Fermente Sucuk Üretimi, İstanbul Üniversitesi doktora tezi, T515-21102004, İ. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri s:22
- Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., & Huys, G.** (2006): Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, 16(12), 1470-1476.
- Vinderola C.G., Duarte J., Thangave D., Perdigo G., Farnworth E., Matar C.,** (2005): Immunomodulating capacity of kefir, *Journal of Dairy Research*, 72 195–202
- Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Thangavel D, Farnworth E, Matar C.** (2006): .Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*; 211:149-156., 56
- Wang K., Lai H.C., Yu C.Y. Chang C.T., Kuo H.L., Yang Y.F., Lin C.C., Lin H.H., Liu Y.L.,** (2011): Real-Time PCR Analysis of the Intestinal Microbiotas in Peritoneal Dialysis Patient, *Applied and Environmental Microbiology*, 1107-1112
- Witthuhn, R.C., Schoeman, T., Britz, T.J.,** (2005): Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal* 15, 383–389
- Yoon, M. Y., Kim, Y. J., & Hwang, H. J.** (2008): Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 925-933.
- Yüksekdağ Z. N.,** (2005): Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal plazmid DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 179s, Ankara.

- Yüksekdağ Z.N., Beyathı Y., (2003):** Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri, 01(02), Sayfa: 49-69
- Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., Huang, Y., (2013):** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. 8.
- Zocco M. A., Zileri Dal Verme L., Cremonini F., Piscaglia A. C., Nista E. C., Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. Ve Boccio, J. (2001):** Effect of Probiotics and Functional Foods and Their use in Different Diseases. Nutrition Research, **21**, 569-579.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : İlkay YILMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 24 Ocak 1977; Sakarya
E-posta : ilkayilmaz001@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Doktora:** 2012-2018, İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 34295-İstanbul-TÜRKİYE.
- **Yüksek Lisans:** 2000-2003, Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 16020-Bursa-TÜRKİYE.
- **Lisans:** 1994-1999, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35200-İzmir-TÜRKİYE.

İlkay YILMAZ lisans derecesini Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalından 1999 yılında aldı. Ardından Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Gıda Mühendisliği yüksek lisansını 2003 yılında tamamladı. 2012 yılında İstanbul Aydın Üniversitesi'nde Gıda Mühendisliği doktora programına başladı. Türk ve uluslararası şirketlerde sırasıyla teknik müdürlük, planlama yöneticiliği, proje müdürlüğü, kalite ve üretim müdürlüğü, iş güvenliği uzmanlığı, insan kaynakları ve satınalma müdürlüğü gibi farklı pozisyonlarda çalıştı.

İyi seviyede İngilizce bilen İlkay YILMAZ, evli ve bir kız çocuğu sahibidir.

TEZLER:

Yüksek Lisans Tezi

Şehitoğlu, İ., Göçmen D., “Ülkemizde Üretilen Makarnaların Bileşimi ve Pişirme Kaliteleri Üzerinde Araştırmalar”, Uludağ Üniversitesi, 2003.

Lisans Tezi

Şehitoğlu, İ., Sukan S., “Selülozik Atıkların Enzimatik Hidrolizi”, Ege Üniversitesi, 1999

SERTİFİKALAR:

Bilirkişilik Sertifikası

C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı (2012 Kasım)

A Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı (2015 Ocak)

ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Baş Denetçi

ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Baş Denetçi

ISO 14001:2015 Çevre Yönetim Sistemi Baş Denetçi

OHSAS 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Baş Denetçi