

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

BESİNLER VE GASTROİNTESTİNAL SİSTEM SALGILARININ

DENEYSEL SIÇAN MODELİNDE

İNTESTİNAL BÜTÜNLÜK ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Ömer CENNET

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2018

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

BESİNLER VE GASTROİNTESTİNAL SİSTEM SALGILARININ

DENEYSEL SIÇAN MODELİNDE

İNTESTİNAL BÜTÜNLÜK ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Ömer CENNET

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Osman ABBASOĞLU

ANKARA

2018

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasından tamamlanmasına kadar geçen süreçte, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Osman Abbasoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın patoloji örneklerinin incelenmesinde katkıları olan Prof. Dr. Cenk Sökmensüer'e ve Dr. Akbar Hajiyev'e, istatistiksel değerlendirilmesine destek veren Prof. Dr. Mutlu Hayran ve Uzm. Dr. Deniz Yüce'ye, tezimin finansmanının sağlanmasında destek olan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Beni bu günlere en iyi şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Dr. Ömer Cennet

ÖZET

CENNET O, Besinler ve Gastrointestinal Sistem Salgılarının Deneysel Sıçan Modelinde İntestinal Bütünlük Üzerine Etkileri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.

Giriş: Hücreler arası bağırsak geçirgenliği, başlıca ‘tight junction’ (TJ) proteinleri tarafından sürdürülmektedir. TJ’lerin ve bağırsak epitelinin morfolojik bozulması ile bakteriler ve bakteri bileşenleri sistemik dolaşıma geçebilir. Bozulmuş bağırsak bariyer işlevi birçok hastalık ile ilişkilidir. Bağırsak epiteli ve TJ’ler çeşitli etkenler tarafından kontrol edilmektedir.

Amaç: Bu çalışmada safra ve pankreas salgısı ile gıdaların, sıçan jejunumunda bağırsak morfolojisi ve mikroflorası üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Metod: Otuz adet erkek sprague-dawley cinsi sıçan her bir grupta 10 tane olacak şekilde üç gruba bölündü: Kontrol grubu, biliyopankreatik (BP) grup, jejunal ‘by pass’ (JP) grubu. Gruplara yapılan işlemler sonucunda safra ve pankreas salgısının geçmediği, gıdanın geçmediği veya her ikisinin birden geçmediği jejunal segmentler ve kontrol segmentleri oluşturuldu. Sıçanların üçüncü haftanın sonunda kan ve bağırsak örnekleri alındı. Portal veninden lipopolisakkarit (LPS) ve sitrulin ölçümleri için kan alındı. Her bir jejunum segmentinde aerobik kültür sonrası koloni sayımı ‘log10(CFU/mg)’ olarak ifade edildi. Bağırsak morfolojisindeki değişiklikler (villus/kript oranı, intraepitelyal lenfosit sayımı) ve TJ proteinlerinin (okludin, klaudin-1, Zonula okludens-3 (ZO-3)) dağılım ve ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: Villus/kript oranı safra ve gıdanın birlikte geçmediği segmentlerde diğerlerine göre daha düşüktü (p:0.007). İntraepitelyal lenfosit sayısı safra ve gıda olmayan segmentlerde en yüksekti (p<0.001). Klaudin-1 immunohistokimyasal boyama dağılımı, eğer o segmentte gıda yoksa belirgin bir şekilde zayıf boyanmıştı(p:0.035). Okludin boyanma şiddeti gıda varlığı ile anlamlı olarak artmıştı(0.016). Jejunal aerobik bakteriyel popülasyon kontrol grubu (log10(CFU/mg):-0.3±0.6) ile karşılaştırıldığında, safra ve gıdanın beraber var olmadığı segmentlerde (log10(CFU/mg):-1.32±0.61) azalmış, safra yokluğunda (log10(CFU/mg):0.1±1.08) ise artmıştı (p:0.043). Plazma sitrulin ve lipopolisakkarit düzeyleri, gruplar arasında anlamlı olarak farklı değildi.

Sonuçlar: Besinler ve gastrointestinal salgılarının bağırsak morfolojisi ve bütünlük belirteçleri üzerine önemli etkileri mevcuttur. Bizim çalışmamızda; safra ve pankreas salgısı ile gıdanın varlığı veya yokluğu, jejunum morfolojisini, intraepitelyal lenfosit sayısını ve bazı TJ proteinlerinin (okludin, klaudin-1) ekspresyon paternini değiştirmiştir. Bu etkiler gıda varlığı veya yokluğu durumunda daha belirgindir. Ayrıca mikrobiyolojik çevrede bu değişimlerden etkilenmektedir. Bizim sonuçlarımız gastrointestinal sistem yapısı ve bütünlüğü üzerine oral gıdaların önemli etkisi olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Tight junction, klaudin, okludin, zonula okludens, intestinal bütünlük, sıçan, immunohistokimya, lipopolisakkarit, sitrulin*

ABSTRACT

CENNET O, Effects of Food and Gastrointestinal Secretions on Intestinal Integrity in an Experimental Rat Model Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis of General Surgery, Ankara, 2018.

Introduction: Paracellular intestinal permeability is mediated by mainly tight junction proteins. Deterioration of tight junction (TJ) proteins and morphological structure of intestinal epithelium may permit translocation of bacterial end-products (lipopolysaccharides) into the serum. Impaired gut barrier function is related to several disease states. Intestinal epithelium and tight junction proteins are regulated by many factors.

Aim: The aim of this study was to investigate effect of biliopancreatic secretions and foods on intestinal morphology and microbial flora of rat jejunum

Methods: Thirty sprague-dawley male rats were randomly divided into three groups. (10 per groups): Control, biliopancreatic (BP) and jejunal by-pass (JP) group. By these operations biliopancreatic juice deficient (bile(-)), food deficient (food(-)) and both of them deficient (bile(-)/food(-)) jejunal segments and corresponding control segments were obtained. Animals were sacrificed at the end of week 3. We obtained blood from portal vein for lipopolysaccharides(LPS) and citrulline levels. Each jejunal segment samples were cultured quantitatively (log10(cfu/mg)). We observed the changes in the intestinal morphology (villus/crypt ratio, intraepithelial lymphocytes) and expression and distribution of tight junction proteins (occludin, claudin-1, Zonula Occludens-3) by using immunohistochemistry

Results: Villus height to crypt depth ratio was lower in the bile and food deficient segment than others(p:0.007). Intraepithelial lymphocytes were significantly highest in the bile and food deficient segment(p:<0.001). Immunohistochemical staining pattern of claudin-1 was weaker when there was no food(p:0.035). Occludin expression increased if the segment contained food(0.016). Jejunal aerobic bacterial count decreased in bile and food deficient segment(log10(CFU/mg):-1.32±0.61) and increased in bile deficient segment(log10(CFU/mg):0.1±1.08) when compared with control segment(log10(CFU/mg):-0.3±0.6)(p:0.043). There were no statistically significant difference in plasma lipopolysaccharides and citrulline levels between the groups.

Conclusions: There are significant effects of foods and gastrointestinal secretions on intestinal morphology and integrity markers. In our study; the presence or absence of bile and pancreatic secretions altered the expression pattern of jejunum morphology, the number of intraepithelial lymphocytes, and the expression of some TJ proteins (occludin, claudin-1). These effects were more prominent in the presence or absence of food. The microbiological environment also affected by these changes. Our results implicate the importance of oral food on the structure and integrity of the gastrointestinal tract which may play role on some diseases.

Key Words: *Tight junction, claudin, occludin, zonula occludens, intestinal integrity, rat, immunohistochemistry, lipopolysaccharides, citrullin*

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İNTESTİNAL BARİYER	5
2.1.1. Luminal Kısım	5
2.1.2. Hücresel Kısım	5
2.2. İNTESTİNAL EPİTEL	6
2.2.1. İntestinal Epitelin İşlevleri	6
2.3. 'TIGHT JUNCTIONLARIN' (TJ) MOLEKÜLER YAPISI	8
2.3.1. Okludin	9
2.3.2. Klaudinler	10
2.3.2.1. Klaudin-1	10
2.3.3. 'junctional' Adezyon Molekülü	12
2.3.4. Trisellulin	12
2.3.5. Zonula Okludens	12
2.4. BAĞIRSAK PERMEABİLİTESİNİN ÖNEMİ	12
2.5. İNTESTİNAL PERMEABİLİTEYİ DEĞERLENDİRMEK İÇİN DENEYSEL MODELLER	14
2.5.1. 'Caco-2' Hücre Modeli	14
2.5.2. Transepitelyal Elektrik Direncinin Ölçümü (TEER)	15
2.5.3. Paraselüler Madde Geçiş Kitleri	15
2.5.4. 'Tight Junction' (TJ) Proteinlerinin Değerlendirilmesi	15
2.5.5. İntestinal Eksplant Model	16
2.5.6. Bariyer İşlevini Değerlendiren Ek Belirteçler	16
2.6. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON VE KLİNİK ÖNEMİ	17
2.7. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON BELİRTEÇLERİ	18

2.7.1. <i>Lipopolisakkarit (LPS), Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein (LBP) ve Çözünür CD14 (sCD14)</i>	18
2.7.2. <i>Bakteriyel DNA</i>	19
2.8. <i>SİÇANLARIN CERRAHİ GASTROİNTESTİNAL SİSTEM ANATOMİSİ</i>	19
2.8.1. <i>Mide Anatomisi</i>	19
2.8.2. <i>Karaciğer Anatomisi</i>	19
2.8.3. <i>Bağırsak Anatomisi</i>	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. <i>DENEY GRUPLARI</i>	21
3.2. <i>CERRAHİ İŞLEM AYRINTILARI</i>	21
3.3. <i>JEJUNUM ÖRNEKLERİNİN ALINMASI</i>	27
3.4. <i>JEJUNAL DOKULARIN HİSTOLOJİK SKORLAMASI</i>	29
3.4.1. <i>OKLUDİN, KLAUDİN-1 VE ZONULA OKLUDENS-3 (ZO-3) İÇİN İMMUNOHİSTOKİMYA</i>	29
3.5. <i>JEJUNAL AEROBİK BAKTERİYEL POPÜLASYON</i>	30
3.6. <i>LİPOLİSAKKARİT VE SİTRULİN ÖLÇÜMLERİ</i>	31
3.7. <i>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</i>	31
BULGULAR	32
3.8. <i>MAKROSKOPİK BULGULAR</i>	32
3.9. <i>HAYVAN AĞIRLIK ÖLÇÜMLERİ</i>	33
3.10. <i>JEJUNUM ÖRNEKLERİNİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ</i>	35
3.10.1. <i>'Villus/Kript' Oranı</i>	35
3.10.2. <i>İntraepitelyal lenfosit sayımı (İEL)</i>	38
3.11. <i>İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER</i>	39
3.11.1. <i>ZO-3 Boyanma Şiddeti</i>	39
3.11.2. <i>Okludin Boyanma Şiddeti</i>	40
3.11.3. <i>Klaudin-1 Boyanma Bölgesi</i>	42
3.12. <i>JEJUNAL AEROBİK BAKTERİYEL POPÜLASYON</i>	44
3.13. <i>LİPOLİSAKKARİT VE SİTRULİN ÖLÇÜMLERİ</i>	45
4. SONUÇLAR	51
5. KAYNAKÇA	52

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

TJ	'Tight Junction'
ZO	Zonula okludens
İEH	İntestinal Epitel Hücresi
GİS	Gastrointestinal Sistem
CCK	Kolesistokinin
TLR	'Toll like' reseptör
LPS	Lipopolisakkarit
JAM	'Junctional' Adezyon Molekülü
kDa	Kilodalton
İBH	İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları
SIRS	Sistemik İnflamatuar Cevap Sendromu
Ig	İmmunglobulin
MOF	Çoklu Organ Yetmezliği
TEER	Transepitelyal Elektrik Direnci Ölçümü
FITC	Floresan izotiyosiyanat
CRP	C-reaktif Protein
LBP	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
PDS	Polidioksanon
HE	Hematoksilen Eosin
İEL	İntraepitelyal Lenfosit
S1	Birinci segment
S2	İkinci segment
S3	Üçüncü segment
TPN	Total Parenteral Nütrisyon

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4. 1 Grupların günlere göre ağırlıkları 34

Tablo 4. 2 Grupların aerobik bakteri popülasyonunun $\log_{10}(\text{CFU/mg})$ değerleri
..... 45

Tablo 4. 3 Gruplar arasında lipopolisakkarit ve sitrulin düzeyleri dağılımı 46



RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Paraselüler geçirgenliği etkileyen faktörler	4
Şekil 2. 2 'Tight Junction' (TJ) proteinlerinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2. 3 Geçirgenliği etkileyen faktörler Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 3. 1 Deney alanı.....	22
Şekil 3. 2 Orta hat laparotomisi.....	22
Şekil 3. 3 Kontrol grubunun şematik çizimi	23
Şekil 3. 4 Biliyopankreatik (BP) grubun şematik çizimi.....	24
Şekil 3. 5 Tamamlanmış gastrojejunostomi	24
Şekil 3. 6 Tamamlanmış uç-yan jejunajejunostomi.....	25
Şekil 3. 7 Jejunal 'by-pass' grubunun şematik çizimi.....	25
Şekil 3. 8 Portal ven örneklemesi	26
Şekil 3. 9 Tüm gruplardan alınan örneklerin şematik gösterimi	28
Şekil 4. 1 İyileşmiş anastomoz (uç-yan jejunajejunostomi)	32
Şekil 4. 2 Gıda ve biliyopankreatik sıvının 'by-pass' edildiği segmentte izlenen gros atrofi	33
Şekil 4. 3 Sıçanların günlere göre ağırlık değişimi	34
Şekil 4. 4 Ölen sıçanların günlere göre ağırlık değişimi	35

Şekil 4. 5 Tüm grupların birinci segmentlerinde (S1) villus/kript oranının yüzdesinin dağılımı	36
Şekil 4. 6 Grupların bağırsak kesitlerinin örnek mikroskopik fotoğrafları.....	37
Şekil 4. 7 Tüm grupların ikinci segmentlerinde (S2) villus/kript oranının yüzdesinin dağılımı	37
Şekil 4. 8 İntestinal mukozadaki intraepitelyal lenfosit değişimi	38
Şekil 4. 9 Grupların intraepitelyal lenfosit (İEL) sayımındaki değişimleri	39
Şekil 4. 10 Gruplar arasında ZO-3 boyanma şiddetinin dağılımı	40
Şekil 4. 11 Farklı jejunum segmentleri arasında okludin immunohistokimyasal ekspresyonu	41
Şekil 4. 12 Gruplar arasında okludin boyanma şiddetinin dağılımı	42
Şekil 4. 13 Jejunal segmentler arasında klaudin-1'in immunohistokimyasal dağılım paterni	43
Şekil 4. 14 Gruplar arasında klaudin-1 boyanma paterninin dağılımı	44
Şekil 4. 15 Jejunal aerobik bakteriyel popülasyon (log10(CFU/mg)).....	45
Şekil 4. 16 Plazma sitrulin dağılımı	46

1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistem, alt özefagus sfinkterinden anüse kadar birbiriyle bağlantılı hücrelerden oluşarak, vücut ile dış çevreyi birbirinden ayıran bir bariyer olarak görev yapmaktadır. Bu bariyer çevresel zararlı ajanların vücuda girişini engellemesi açısından önemli bir role sahiptir.

İnce bağırsak geçirgenliği, paraselüler (hücreler arası) ve transelüler (hücreler yoluyla) geçirgenlik olarak iki kısımdır. Paraselüler geçirgenlik, “tight junction” (TJ) proteinleri ile sürdürülmektedir. TJ yapısı hücre zarının intraselüler ve ekstraselüler kısımlarında yerleşmiş bulunan ‘klaudinler’, ‘okludinler’ ve ‘zonula okludensler’ (ZO) gibi bir takım karmaşık protein yapılarından oluşmaktadır. Bu yapılardaki bozulmalar sonucu bir takım hastalıklar karşımıza çıkmaktadır. Örneğin *Clostridium perfringens* isimli bakterinin enterotoksini klaudin proteinlerini hedef alarak TJ geçirgenliğini arttırmaktadır[1].

Epitelyal TJ’ler çok çeşitli uyarılar ile açılıp kapanabilmektedir. Bu uyarılar; nutrisyonel durum, humoral ve nöronal bir takım sinyaller ve çok çeşitli hücresel yollar gibi karmaşık bazı süreçlerden oluşmaktadır. Anormal geçirgenlik ile ilişkilendirilen birçok hastalık bulunmaktadır. Bunların başlıcalarını, diyabet, Crohn hastalığı, multipl skleroz, irritabl bağırsak sendromu gibi hastalıklar oluşturmaktadır. Ayrıca ciddi akut pankreatitli hastalarda, kritik yoğun bakım hastalarında olası enfeksiyöz komplikasyonlar vb. istenmeyen durumları azaltmak için, bozulmuş bağırsak bariyerini düzeltmeye yönelik girişimler denenmiştir[2]. Bu girişimlerin başında enteral beslenme ile bağırsak bütünlüğünün sağlanması yer almaktadır.

Safra ve pankreas salgısı, diyetteki besinlerin ve özellikle yağların bağırsak lümeninden emilimine yarar ve kolesterol homeostazına katkıda bulunur. Özellikle son zamanlarda safra tuzlarının glukoz ve lipid metabolizmasını değişik yönlerden etkileyerek intestinal bariyer işlevine katkı sağladığı bildirilmiştir[3]. Ayrıca safra tuzları çeşitli yollarda görev alarak enterosit proliferasyonu ve apoptozunda görev aldığı düşünülmektedir.

İnce bağırsak bütünlüğünün bozulması bakteriyel lipopolisakkaritlerin translokasyonuna izin vererek endotoksemi ve sonuç olarak inflamatuvar süreçlerin başlamasına sebep olabilir. Bozulmuş bağırsak bütünlüğü steatohepatitis, yağlı karaciğer hastalığı gibi bazı durumlarla ilişkilidir. Obezlerde, düşük seviye inflamatuvar durumun tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olduğu bildirilmiştir[4].

Paraselüler permeabilitenin değerlendirilmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler in vivo veya in vitro ölçümleri içermektedir. Ölçüm yöntemleri temel olarak bazı prensiplere bağlı çalışmaktadır. Bir bariyerin iki yüzü arasındaki konsantrasyon farkını ölçme, epitel yüzey alanını değerlendirme, belirli maddelerin geçiş süresini değerlendirme ve bariyere ait yapıların değerlendirilmesi gibi bazı temel prensipler ile çalışan bu yöntemlerle permeabilite çalışmaları yapılabilmektedir. Gastrointestinal geçirgenliğin ve bunun neticesindeki bakteriyel translokasyonun değerlendirilmesi amacıyla dokular, TJ proteinlerine karşı geliştirilen antikorlarla immunohistokimyasal olarak boyanarak epitelyal bariyerin bütünlüğü ve devamlılığı gözlemlenmektedir. TJ, yapısında bulunan klaudin ve okludin ailesi ve zonula okludenslerin (ZO) birbiriyle koordineli bir şekilde ilişkileri sonucu oluşmaktadır[5].

Sitrulin temel olarak ince bağırsak enterositleri tarafından sentezlenen bir aminoasittir. Plazma sitrulin konsantrasyonu, metabolik olarak aktif enterosit kitlesini yansıtan kantitatif bir biyobelirteçtir. Bu sayede absorbtif enterosit kitlesi kan sitrulin düzeyleri sayesinde değerlendirilebilir[6].

Bakteriyel bir ürün olan lipopolisakkarit (bakteriyel dış hücre membranının ana bileşeni) ölçümü birçok çalışmalarda özellikle sepsisli hastalarda başarılı bir şekilde endotoksemiye göstermiştir. Bozulmuş bağırsak bütünlüğü sonucu artmış lipopolisakkarit düzeyleri bağırsak duvarından bakteriyel translokasyonun göstergesi olabilir[7].

Son zamanlarda bağırsak mikroflorasının konakçının bağışıklığı ve metabolizması ile olan etkileşiminin bazı metabolik hastalıklar ile olan etkisinin anlaşılması ile çeşitli görüşler öne sürülmüştür[8]. Birçok mekanizma ile bağırsak mikroflorası kronik düşük seviyeli inflamasyonu indükleyerek çeşitli metabolik hastalıklara yol açtığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada; sadece ağızdan alınan besinlerin geçtiği jejunum segmenti, sadece biliyopankreatik sıvının geçtiği jejunum segmenti, her ikisinin geçtiği jejunum segmenti ve hiçbir salgı ve besinin geçmediği jejunum segmenti oluşturulup bu segmentlerden alınan örnekler histopatolojik olarak geçirgenlik belirteçleri ile incelenmiş, mikrobiyolojik olarak bu farklı segmentlerin mikrobiyal florası incelenmiş, bu grupların portal veninden alınan kan örneklerinden endotoksemi belirteci olan lipopolisakkarit ve bağırsak bütünlüğü belirteci olan sitrulin düzeyleri ölçülmüştür.

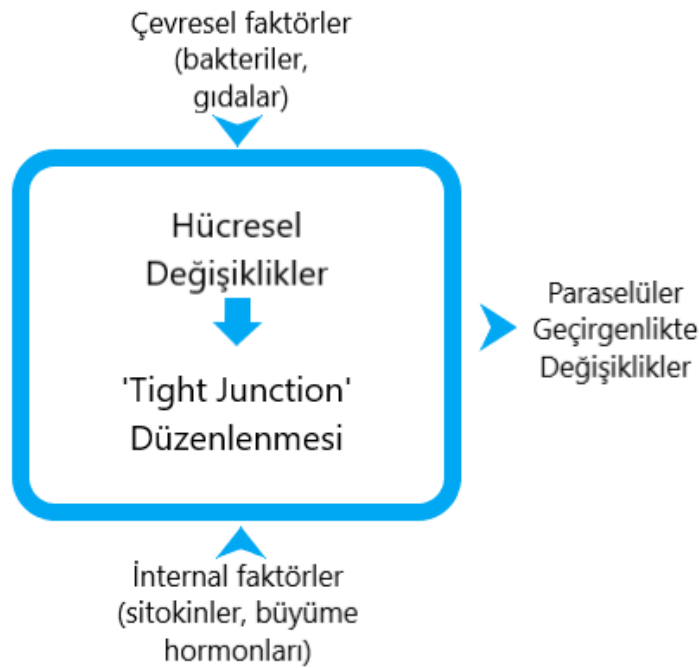
Oluşturulan deneysel modelde bakılan bazı parametrelerle besinlerin, safra ve pankreas salgılarının varlığının/yokluğunun etkilerinin sonuçlarını değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu sayede elde edilen sonuçlar ile ince bağırsak geçirgenliği/bütünlüğü ve mikrobiyolojik değişiklikler ile; nütrisyon, safra ve pankreas salgıları arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Nütrisyon bilindiği üzere insan hayatının devamı için vazgeçilmez öğedir. Son yıllarda bu konu daha da iyi anlaşılmaktadır. Bu çalışma sayesinde oluşturulmuş sıçan modeliyle nütrisyon ile safra ve pankreas salgılarının, ince bağırsak üzerindeki etkilerinin sonuçları in vivo olarak ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Gastrointestinal mukoza dış çevreyle en çok temas halinde olan vücut yüzeyidir ve patojenlerin vücuda olası en önemli giriş yolları arasındadır. Bu nedenle insan sağlığı için; luminal antijen maruziyetini engellerken besin emilimini sağlamak son derece gereklidir. Bu karmaşık görevi sağlamak için, intestinal mukoza, besinlerin aktif ve pasif transportunu sağlayıp, potansiyel zararlı maddelerin girişini engelleyerek dinamik yarı geçirgen bariyer görevini üstlenmektedir. Bu süreç nöro hormonal ve immün bileşenlerce sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. İntestinal bariyer birçok anatomik ve fonksiyonel elementlerden oluşmaktadır.

Klinik çalışmalar; intestinal bariyer işlevinin, diyet, stres, bakteri ve ilaç tüketimi gibi birçok faktör tarafından etkilendiğini göstermiştir[9](Şekil 2.1). Eğer bu değişiklikler kontrol altına alınamayıp kalıcı hale gelirse hastalığa dönüşebilmektedir. Özellikle olarak artmış permeabilite çölyak hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak sendromu ve besin alerjisi gibi sindirim sistemi ile ilgili hastalıklar veya şizofreni, diyabet veya sepsis gibi sindirim sistemi dışı hastalıklar ile yakından ilgilidir[10]. Bütün bunlar mukozal bariyerin insan sağlığı için önemini göstermektedir.



Şekil 2. 1 Paraselüler geçirgenliği etkileyen faktörler

2.1. İntestinal Bariyer

İntestinal bariyer, hücresel ve ekstraselüler elemanlardan oluşan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri olan karmaşık bir savunma yapısına sahiptir. Temel olarak 2 kısımdan oluşmaktadır.

2.1.1. Luminal Kısım

Bu kısım çevresel etkenlere karşı ilk savunma mekanizmasını sunmaktadır. Düşük pH, aktif enzimler içeren mide, pankreas ve safra salgıları birçok mikroorganizmaya karşı toksik etki göstermektedir.

Luminal mikrobiyata, antimikrobiyel salgıları ve luminal pH'yı değiştirerek patojenlerin kolonizasyonunu engellemektedir. Mikrobiyata vücudun bariyer elemanları arasında yer almaktadır ve intestinal epitel hücreleri, immun sistem ve sinir sistemi ile yakından ilişki halindedir[11].

Visköz mukus tabakası, intestinal epitel değişimi/dönüşümü, sekresyonları ve peristaltizmi, vücudun zararlı madde ve mikroorganizmalara maruziyetini kısıtlamaktadır. İntrinsik ve ekstrinsik sinir sistemi ile lümen arasındaki hassas ilişki, tam ve koordineli bir şekilde intestinal motilite ve sekresyonlarını düzenleyerek patojenlerin temizlenmesine yardımcı olur[12].

2.1.2. Hücresel Kısım

İntestinal epitel fiziksel olarak dış çevreyle iç çevreyi birbirinden ayırır. Tek tabaka özelleşmiş epitel hücrelerinden oluşur. Bu hücrelerin büyük kısmı (%80) enterositlerden oluşmuştur. Bu enterositler bariyer görevi gören, sindirim, metabolik ve immun faaliyetleri sürdüren çok işlevli hücrelerdir. Diğer başlıca epitel hücreleri ise mukus üretimi ve sekresyonunu sağlayan goblet hücreleri, hormon ve nöropeptit salgılayan enterokromofin hücreler, luminal antijenleri alıp lenfoid agregatlara sunan M hücreleri gibi bir takım hücrelerdir[13].

Etkili bir mühürleme sistemi sağlamak için, hücreler, hücre adezyon proteinleri vasıtasıyla birbirine tutunmuştur. Böylece, intestinal epitel hücreleri; iç ve dış çevre arasında elektrolit gradiyentini sürdüren sürekli polarize tabaka oluştururlar. Bu tabaka mukozal bariyerin sürdürülmesi için anahtar role sahiptir.

Ayrıca epitel hücrelerine komşu olarak bağ dokusu; çeşitli immun hücreleri, nöronları, damarları ve fibroblastları barındırarak bu sisteme katkıda bulunmaktadır.

2.2. İntestinal epitel

İntestinal epitel hücresi tek tabaka halinde hücresel adezyon proteinlerince birbirine tutunmuş, polariteyi oluşturan, hücresel iletişime izin veren ve fiziksel bütünlüğü sürdüren temel yapıtaşıdır. Tek tabakalı epitel hücresi, hücreler arası adezyon proteinleri tarafından mühürlenmiştir. Böylece polarite oluşturup, hücre iletişimine izin verilerek epitelin fiziksel bütünlüğü sürdürülmektedir.

Hücreler arası kavşakların en yüzeyel kısmında TJ bulunmaktadır. Bu proteinler apikal ve bazolateral plazma membranı arasındaki sınırı oluşturmaktadır. Küçük suda çözülebilir moleküllerin hücrelerarası geçişini düzenlerler[14].

Bu yapısal ve düzenleyici proteinlerdeki değişiklikler, bariyer disfonksiyonu ve intestinal hastalıklarla ilişkilidir. Antijen translokasyonundaki kısıtlayıcı rolü ve kompartmanlar arasındaki polaritenin sürdürülmesi gibi önemli rolü nedeniyle TJ'ler yoğun çalışma kaynağı olmuşlardır. TJ'ler bariyer işlevi dışında, epitel hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve kanser gelişiminde rol almaktadır.

2.2.1. İntestinal Epitelin İşlevleri

Çalışmalar İntestinal epitel hücrelerinin (İEH) 3 major işlevi olduğunu göstermiştir:

Birinci işlevi absorpsiyondur. İEH'lerin apikal hücre membranı; glukozu, aminoasitleri, peptitleri, karboksilik asitleri, vitamin ve mineralleri ve bazen besin olmayan maddeleri transport eden çok sayıda taşıyıcıya sahiptir. Besinler bu

taşıyıcılar tarafından İEH'lerin içine alınırlar. Daha sonra dolaşıma bazolateral membranda yer alan aynı veya farklı taşıyıcılar vasıtasıyla salınırlar.

'Paraselüler transport'; İEH'lerin arasında bulunan boşluk veya aralıkları kullanarak pasif difüzyon sistemidir[15]. Bu, küçük moleküler bileşikler için farklı bir emilim mekanizmasıdır. Paraselüler transport TJ'lerin permeabilitesi ile düzenlenmektedir ve özellikle mineral absorpsiyonu ile ilgili olarak önemli olduğu düşünülmektedir.

Hidrofobik maddeler genellikle 'transelüler pasif difüzyon' ile taşınmaktadır. Bunun nedeni bu maddeler kolaylıkla hücre membranını geçebilmeleridir.

Transsitoz olarak adlandırılan 'intraselüler vezikül bağlantılı transport sistemi' proteinler gibi yüksek moleküler yapıli bileşiklerin taşınmasında kullanılmaktadır. Böylece İEH'leri farklı yapısal, fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan besin ve besin dışı öğelerin transportu için çok değişik mekanizmalara sahiptir.

İkinci işlevi bariyer sağlanmasıdır. Bu işlev fiziksel ve biyolojik bariyer işlevi olarak sınıflandırılabilir. Bahsi geçen bu fiziksel bariyer işlevi İEH'lerin bütünlüğü için gerekli olan epitelyal TJ bariyerini içerir. TJ'ler suda çözünen küçük moleküler bileşiklerin geçmesini sağlayan küçük boşluklar ve porlar içermesine karşın mikrop ve alerjenler gibi büyük maddelerin geçişini engelleyen önemli fiziksel bariyer rolüne sahiptir. Diğer taraftan biyolojik bariyer detoksifikasyon enzimleri (sitokrom p450(CYP) vb.) tarafından kurulan sistemleri içerir. Çeşitli patojenlere karşı salınan İmoglobulin A (İgA) sekresyonu ve antimikrobiyel peptitlerin üretimi de İEH'lerin biyolojik bariyer işlevleri arasında yer alır[16, 17].

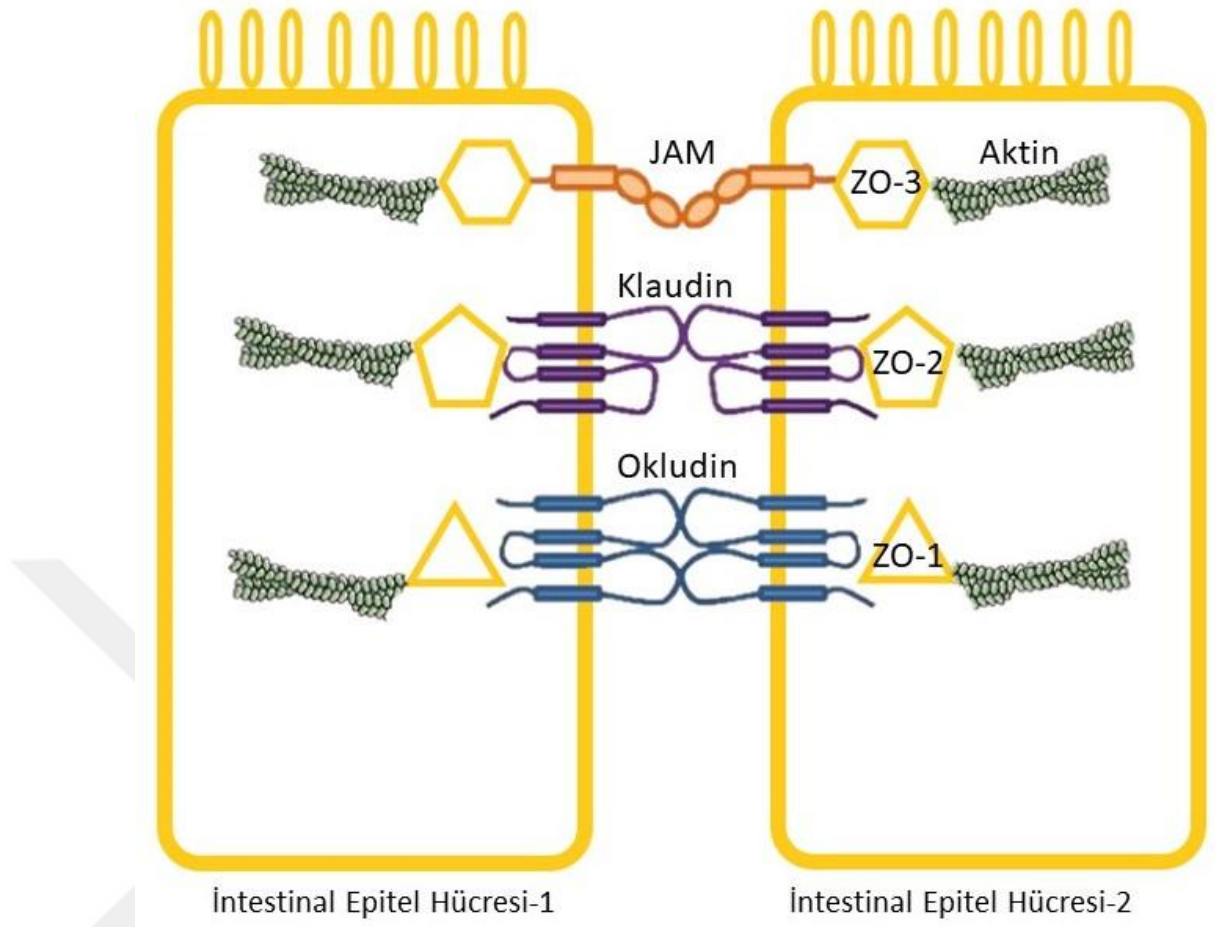
İEH'lerin üçüncü işlevi sinyal tanınması ve iletimidir. Enteroendokrin hücreler; bazı reseptörler vasıtasıyla bağırsak lümenine ulaşmış olan besin türevlerini tanıdığı bilinmektedir. Böylece bazolateral membran tarafından gastrointestinal sistem (GİS) hormonları salınır(örn. kolesistokinin(CCK)). İEH'lerin büyük kısmını oluşturan absorbtif hücreler çeşitli 'Toll like reseptörler' (TLR) eksprese etmektedir. Lipopolisakkaritler (LPS), peptidoglikanlar gibi bakteriyel bileşenler bu TLR tarafından

tanınmaktadır. Böylece çok çeşitli sitokinlerin salınımı değişik sinyal yollarını başlatmaktadır. Diğer bir deyişle İEH'ler yiyecek sinyallerini iç sinyallere çevirerek dönüştürücü rolü üstlenmektedir[18, 19].

2.3. 'Tight Junctionların' (TJ) Moleküler Yapısı

TJ'ler İEH'lerin lateral membranlarının apikal ucunda yerleşmiş olan çoklu protein kompleksleridir. İyon, çözelti ve sıvı moleküllerinin paraselüler geçişini düzenlerler. Ayrıca protein ve lipidlerin serbest difüzyonunu hücre polaritesini sürdürerek engellerler[14].

Dört integral transmembran proteinler, 'okludin', 'klaudinler', "junctional" adezyon molekülü' (JAM) ve 'tricelulin' bugüne kadar tanımlanmıştır[20-23]. Klaudin ailesi en az 24 üyeden oluşmaktadır. Bu transmembran proteinlerin ekstraselüler bileşeni, çevredeki hücrelerle homofilik ve heterofilik ilişkilerle selektif bariyeri oluştururlar. Bu transmembran proteinlerin intraselüler kısmı ise 'zonula okludens' (ZO) proteinleri gibi sitozolik 'scaffold' proteinleri ile birleşirler. Daha sonra ZO proteinleri, transmembran proteinleri aktomiyozin halkalarına bağlar[24, 25]. TJ proteinlerin aktin iskeleti ile ilişkisi TJ yapısının korunmasında hayati öneme sahiptir(Şekil 2.2).



Şekil 2. 2 'Tight Junction' (TJ) proteinlerinin şematik gösterimi

2.3.1. Okludin

Okludin (~65 kDa) 1993 yılında ilk keşfedilen integral transmembran TJ proteinidir[20]. Okludin 4 transmembran 'domaini', 2 ekstraselüler lüp ve 1 intraselüler lüp olan tetraspan membran proteinidir. Okludinin ekstraselüler lüplarının homofilik ilişkisi makromoleküllere karşı bariyer oluşturur. Uzun C-terminal bileşeni ZO proteinleri gibi birçok intraselüler TJ proteinleri ile ilişki halindedir[26].

Okludinin işlevi tamamıyla henüz anlaşılamamıştır. Ancak hayvanlar ve hücre kültürleri kullanılarak yapılan çok sayıda çalışma, intestinal epitelde TJ'lerin yapı ve permeabilitesinde çok önemli rolü olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalardaki veriler TJ'lerin sürdürülmesi ve birleşmesinde rol oynadığını düşündürmektedir[27].

2.3.2. Klaudinler

Klaudinler (20-27 kDa) 1 intraselüler ve 2 ekstraselüler lupu olan C ve N terminal sitoplazmik domaini olan tetraspan membran proteinidir[21]. Okludinlerle sekans benzerliği barındırmaz. Klaudinlerin ekstraselüler lupları komşu hücrelerle homofilik ve heterofilik etkileşim kurarlar. Böylece bu etkileşim sonucunda ya bariyer oluşturular ya da seçici moleküllerin paraselüler yolakla geçmesi için porlar oluştururlar[28].

Birçok çalışma klaudinlerin anahtar rolünde olduğunu ve TJ'lerin omurga kemiğini oluşturduğunu göstermiştir[29, 30].

Klaudinler en az 24 üyeden oluşan multigen aileden oluşmaktadır. Her bir izoformu dokularda kendi ekspresyon paterni ve özelliklerini göstermektedir. Klaudin 1, 3, 5, 11, 14, 19; işlev olarak net bir şekilde tıkayıcı/kapatıcı role sahiptir. Diğer taraftan klaudin 2, 10, 15, 17 ise açıkça kanal oluşturucudur[31].

Sıçan kolonu en yüksek epitel direncine sahiptir. Bunu duodenum, jejunum ve ileum takip eder. Duodenum ve kolon 'kapatıcı' klaudinler 1, 3, 4, 5, 8 en güçlü şekilde eksprese eder. Geçirgenliği arttıran klaudin 2, 7, 12'yi ise jejunum ve ileumla karşılaştırıldığında az eksprese eder[32].

2.3.2.1. Klaudin-1

Klaudin-1 bağırsak dahil bir çok dokuda bulunmaktadır. İnsan sigmoid kolonunda klaudin-1 lateral membranda ve kriptlerde gözlenmektedir[33]. Ayrıca klaudin-1 kolanjiyositler ve hepatositlerde de eksprese edilmektedir ve genin işlev kaybıyla sonuçlanan mutasyonlarda neonatal sklerozan kolanjite neden olduğu gösterilmiştir[34]. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında (İBH) klaudin-1 protein ekspresyonu anlamlı bir şekilde azalmaktadır. İBH ilişkili diyare TJ proteinlerinin okludin, klaudin-1 ve ZO-3 internalizasyonu sonucu paraselüler permeabilitenin artması nedeniyle olduğu düşünülmektedir[35, 36].

İBH dışında birçok hastalık intestinal disfonksiyon sonucu ortaya çıktığı iddia edilmiştir. Alerjik dokular için, alerjen yiyeceklerin maruziyeti sonrası, klaudin-1 ekspresyonunun azaldığı ve hücreler arası bölgelerde bozulmalar olduğu gözlenmiştir[37]. Ayrıca akut pankreatit, intestinal hasarı indükleyerek klaudin-1'in hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonunun azaltabilmektedir. Malign obstruktif sarılık hastalarında duodenumda azalmış klaudin-1 ekspresyonu ile birlikte mikrovillus kaybı ve genişlemiş hücre bağlantıları gösterilmiştir[38].

İntestinal epitel bariyer işlevi sıklıkla travma, yanık, şok ve diğer kritik cerrahi hastalarda bozulmuştur. Böylece artmış intestinal permeabilite ve gastrointestinal sistemden (GİS) bakteriyel ve/veya endotoksinlerin translokasyonu ile sonuçlanabilmektedir[39]. Yanık hastalarında gastrointestinal sistem ülserlerini engellemek amacıyla profilaktik olarak H2 reseptör antagonistinin yanı sıra enteral beslenmenin de eklenmesi önerilmektedir[40].

Klaudin-1 normal enterositlerin apikal kısmında zayıf olarak eksprese edilmektedir. Ancak kolorektal kanser hücrelerinde ise güçlü olarak eksprese edilmektedir[41]. Klaudin-1 ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde kolorektal kanser dokularında normal spesimenlere göre artmış olduğu bulunmuştur. Klaudin-1 proteini bu nedenle kolorektal tümoriyogenezde majör faktör olarak rolü olabilir[42].

Birçok bakteri ve virüs bağırsaklarda enfeksiyona yol açabilir ve intestinal permeabiliteyi değiştirebilir. Bazı bakteriler bağırsaklar üzerine faydalı etkiler sergilerken, bakteri ve/veya endotoksin translokasyonu ve artmış GİS permeabilitesi, sistemik inflamatuvar cevap sendromunda (SIRS), çoklu organ yetmezliği (MOF) gibi çok ciddi komplikasyonlarda önemli rolü olduğunun farkına varılmıştır[43]. Örneğin enteropatojenik *Escherichia coli*'nin enfeksiyonu sonrası intestinal epitel hücrelerinde ZO-1, okludin, klaudin-1 progresif olarak azaldığı ve bariyer işlevi kaybıyla sonuçlandığı gösterilmiştir[44]. Bu nedenlerle TJ proteinlerini düzenleyici moleküllerle ve kimyasal ajanlarla yapılan çalışmalar intestinal hastalıkların tedavisine olanak sağlayabilir.

2.3.3. ‘junctional’ Adezyon Molekülü

JAM ailesi immunglobulin(Ig) süperaillesine aittir ve 2 ekstraselüler Ig alanı, 1 transmembran alanı ve 1 intraselüler C-terminal alanına sahiptir. JAM üyeleri; epitel, endotel, immun hücreleri gibi bir çok farklı hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. TJ düzenlenmesinde rol almaktadır[31].

2.3.4. Trisellulin

Epitel ve endotel hücreleri sadece iki hücreli birleşme göstermezler. Üç komşu hücre arasında üç hücreli birleşme gösterebilirler. Trisellulin genellikle bu triselüler kavşaklarda yerleşmektedirler. Ancak okludin ve klaudinlerle birlikte biselüler kavşaklarda da yer almaktadırlar[23]. Yapılan çalışmalar bu moleküllerin önemli düzenleyici rolü olduğunu göstermiştir[45].

2.3.5. Zonula Okludens

ZO proteinleri TJ’ a özgü olarak belirlenen ilk proteinlerdir. Şuana kadar 3 ZO proteini; ZO-1 (~220 kDa), ZO-2 (~160 kDa), ZO-3 (~130 kDa) belirlenmiştir[46, 47]. Bu proteinler çok domainli yapılardan oluşmuştur. Bu yapılar TJ’lerin yapısının sürdürülmesi için önemlidir. Birçok TJ proteini ZO proteinlerinin N-terminal uçlarına bağlanırken, C-terminal ucu ise aktin sitoskeleton sistemi ile birleşir[48]. ZO proteinlerinin rolünün net olarak ortaya konulması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. ZO proteinleri TJ proteinlerinin erken dönemde birleşmelerinde rolü olduğu düşünülmektedir[49].

2.4. Bağırsak Permeabilitesinin Önemi

GİS geçirgenliği klinik pratikte bakteri ve LPS gibi toksik bakteriyel ürünlerin ‘steril’ konakçıya transloke olması açısından önemlidir. Bu maddelere karşı artmış geçirgenlik çoklu organ yetmezliği (MOF) gibi ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Artmış geçirgenlik sepsisin ve sonuçta MOF’ un ‘motor’ bileşeni algısını oluşturmuştur. Birçok deneysel çalışmada artmış permeabilite ile sepsis ve MOF gelişimi arasında ilişki gösterilmiştir[50].

TJ geçirgenliği birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. Bunlar içerisinde sitokinler, büyüme faktörleri, bakteri toksinleri sayılabilir. Ayrıca çeşitli gıdalarda geçirgenliği değiştirebilmektedir[51](şekil 2.1).

Malnutrisyonlu bireylerde bağırsak permeabilitesinin arttığı gösterilmiştir[52]. Muhtemelen bu bireylerde hem inflamasyon hem de intestinal geçirgenlik bir bütün içerisinde bu duruma neden olmaktadır. Malnutrisyonlu hastalarda enfeksiyon gelişmesi daha muhtemeldir. Bu da sonuç olarak geçirgenlikte artışı ve büyümede duraklamayı indüklemektedir[53].

Kronik bakım hastalarında kademeli olarak artmış permeabilite izlenmektedir. GİS’de artmış permeabilite istenen bir durum değildir. Çünkü GİS lümeni bakteri ve bakteriyel toksinlerle doludur. Geçirgenliği artmış barsağın MOF gelişimi üzerindeki etkisini gösteren veriler kısıtlı olmasına karşın, GİS disfonksiyonu ve karaciğer anormallikleriyle ilişkisi ile ilgili güçlü veriler mevcuttur. Yapılan bir çalışmada abdominal katastroflar sonucu cerrahların karşılaştığı durum olan proksimal yerleşimli yüksek debili fistülün içeriğinin toplanıp barsağın distal tarafına reinfzyonu sonucunda hastaların kolestatik enzimlerinde düzelme izlenmiştir. Bu bulgular ışığında işlevi bozulmuş gastrointestinal sistemin ve bozulmuş enterohepatik siklusun karaciğer üzerinde toksik etkileri olduğu vurgulanmıştır[54]. Yapılan çalışmalarda sıçanlarda açlığın ve parenteral nutrisyonun anlamlı olarak safra asiti sekresyonunu ve sekretuar immunglobulini azalttığı görülmüştür. IgA ve safra asitleri GİS mukozasında bakteriyel invazyona karşı majör savunma mekanizmalarından birisidir. Saffra asidinde ve birleşiminde meydana gelen değişiklik hem bariyer sisteme hem de GİS mukozasına ciddi toksik etkileri olmaktadır. Bu nedenle mukozal defansın kaybı ve enterobakterlerin çoğalması, bu değişimin önemli sonuçları arasında yer almaktadır[55]. Luminal içeriğin varlığı ya da yokluğu otonomik ve enterik sinir sistemi tarafından algılanmakta ve böylece indirek olarak intestinal bariyer bütünlüğünde rol almaktadır[56].

Yoğun bakım hastalarında mortalite ve morbiditeyi azaltmak için erken enteral beslenme önemli bir yere sahiptir. Mekanik ventilasyona bağlı yoğun bakım

hastalarında yapılan bir çalışmada, malnutrisyonun negatif etkilerini önlemek amacıyla enteral beslenme ve bunun yetersiz kalması ve uygulanamadığı durumda parenteral beslenme desteği verilmesi tavsiye edilmektedir[57].

Neonatolojide prematür doğumun komplikasyonu olarak nekrotizan enterokolit karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalar ince bağırsaklarının büyük bir kısmını kaybedip kısa bağırsak sendromu gelişebilmektedir. Bu durumun önemli komplikasyonu olarak ciddi steatohepatit ve kolestaz gelişip, fibrozis, siroz ve karaciğer yetmezliği oluşabilmektedir. Bu durum aktif bir GİS-karaciğer eksenini olduğunun göstergesidir[58].

Morbid obezler için yapılan jejunoileal by pass ameliyatları veya kör sonlanan luplar sonucunda oluşan ciddi karaciğer yetmezliği nedeniyle yapılmış karaciğer nakilleri ile ilgili yayınlar mevcuttur[59].

Aktif Crohn hastalarında yapılan çalışmalarda kolondan alınan biyopsi örneklerinde okludin ve diğer mühürleyici proteinler olan Klaudin-5 ve 8'in azaldığı por oluşturan protein olan klaudin 2 nin ise arttığı kaydedilmiştir[33].

2.5. İntestinal Permeability Değerlendirmek için Deneysel Modeller

2.5.1. 'Caco-2' Hücre Modeli

Son birkaç dekada, birçok intestinal epitel hücre dizisi çeşitleri hayvan ve insanlardan elde edilerek, ilaç ve toksin permeabilitesini değerlendirmede kullanılmıştır. Bunlar arasında 'Caco-2' hücre dizisi, insan kolon adenokarsinomundan elde edilmiştir ve bu seri, bariyer işlevinin değerlendirilmesi için çalışmaların kurgulanmasında kabul edilmiş referans modelidir[60].

'Caco-2' hücreleri tek tabaka halinde geçirgen filtrelerde kültür edilmesi sonucunda elde edilmektedir. Kültür esnasında hücreler spontan olarak polarizasyon (apikal/bazolateral) ve komşu hücrelerle TJ oluşumu göstermektedir. Bu sayede apikalde bazolateral kompartmana ilaç ve toksinlerin geçişi ölçülmektedir[61].

2.5.2. Transepitelyal Elektrik Direncinin Ölçümü (TEER)

Bu sistem; elektrot benzeri çubuklarla ilişkilendirilmiş basit bir voltmetre ile iyon hareketini ölçmektedir ve bariyer işlevinin gelişimi için etkili bir indikatör olarak değerlendirilmektedir. Rutin TEER ölçümü deney kurulumunda epitel tabaka modelinin bütünlüğünün kontrolü için kullanılmaktadır[62].

TEER ölçümü hızlı, kolay ve gerektiğinde tekrar edilebilir olmasına karşın, herhangi bir spesifik mekanizma veya transport süreci TEER ölçümündeki değişikliklere mal edilemez. Bunu için ileri araştırmalar gerekmektedir.

2.5.3. Paraselüler Madde Geçiş Kitleri

TEER ölçümüne ek olarak, hücre tabakasından işaretli maddelerin paraselüler geçişi tayin edilebilir[63]. Bu belirteçler boyut açısından farklılık gösterebilir. Toksik olmaması, yüksüz (nötr) olması ve suda çözülebilir olması gerekir. Hücreler tarafından metabolize edilmemelidir[64].

Sıklıkla kullanılan paraselüler belirteçler floresan ile etiketli bileşiklerden oluşmaktadır. Buna en sık örnek floresan isotiyosiyanat (FITC)-dekstran ve FITC-inulin örnek verilebilir[65]. Ayrıca araştırılan yere özgü problemler kullanılarak GIS’de spesifik bir yerin durumu değerlendirilebilir. Sukroz ve laktuloz gastroduodenal bölgenin değerlendirilmesi için yararlı problemler iken, sucraloz ve cr-EDTA (kromiyum edta kompleks) kolonik permeabiliteyi değerlendirmek için kullanılır[64].

2.5.4. ‘Tight Junction’ (TJ) Proteinlerinin Değerlendirilmesi

Epitel bariyer görevinin majör fonksiyonel bileşeni TJ proteinleridir. TJ’ler luminal yüzeye yakın kesimde anastomoz ağı oluştururlar. Böylece luminal antijenlerin paraselüler transportunu engellerler[66]. Son yıllarda 50’den fazla TJ proteini bulunmuştur. Epitel proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde TJ’lerin önemli rolü olduğu gösterilmiştir[67]. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda, hücre kültürü modelleri veya insan ile yapılan deneysel çalışmalarda; TJ bozulması, değişmiş intestinal bariyerin temel nedeni olarak gösterilmiştir. TJ proteinlerinin

değerlendirilmesinde çeşitli metotlar kullanılmaktadır (imunohistokimya, western blot, ELİSA). İmunohistokimya hücresel lokalizasyonu ve dokudaki dağılımı göstermesi açısından avantajlı bir metoddur. Ayrıca immunohistokimyasal sinyal miktarı ölçülebilmektedir.

2.5.5. İntestinal Eksplant Model

Hücre kültürü modeline ek olarak, intestinal eksplantlar, bütünlüğü test etmek için bir model olarak sunulmuştur. Bu çalışmalar için bağırsak segmentleri 'Ussing Chamber'lara' yerleştirilerek, kültür ortamı sürdürülerek besin veya ilaç absorpsiyonu çalışılmaktadır[68].

Bu yöntemin dezavantajı; kültür süresinin çok kısa olması ve gecikmiş veya uzun süreli etkilerin çalışılmasına olanak vermemesidir[69].

2.5.6. Bariyer İşlevini Değerlendiren Ek Belirteçler

Bağırsak bariyerinin işlev bozukluğunun yorumlanmasına katkı sağlayan intestinal permeabilite testleri ile ilişkilendirilebilecek başka belirteçler vardır.

D-laktat; anormal mikrobiota tarafından veya bakteri sayısı hızlı bir şekilde arttığında (bakteriyel aşırı üreme (overgrowth) veya kısa bağırsak sendromu), karbonhidrat fermantasyonu sonucunda üretilir[70]. Plazma D-laktat düzeyi ölçümü akut inflamatuvar hastalıklarda veya apandisit tanısında CRP (c-reaktif protein) veya lökosit sayımından daha düşük yalancı negatifliğe sahiptir[71].

Plazma sitrulini; farklılaşmış ince bağırsak enterositleri tarafından glutaminden üretilen bir aminoasittir. Sitrulin, non-protein bir amino asit olup bakteriyel translokasyonun azalmasında ve bağırsak bariyer işlevinin korunmasında önemli rol üstlendiği görülmektedir[72]. Dolaşımdaki düzeyleri, sadece intestinal metabolik aktivitenin de novo sentezine bağlıdır. İşlevsel enterosit kitlesinin bir göstergesidir ve epitelyal bütünlüğün kantitatif olarak araştırılmasında ve intestinal adaptasyonun (örn. cerrahi sonrası) enterosit düzeyinde takibinde biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilir. İnce bağırsak epitel hücre kitlesindeki kayıp (örn. kısa bağırsak

sendromu, kronik villoz atrofi, kemoterapi) dolaşımdaki azalmış sitrulini düzeyleri ile sonuçlanabilir[73]. Sıçanlarda, indüklenmiş endotoksemi sonucu sitrulin düzeyinin azaldığı gösterilmiştir[74]. Endotoksemi ve artmış permeabiliteyi ilişkilendiren hayvan çalışmaları mevcuttur[75]. Sitrulin arginine böbreklerde metabolize edildiği için böbrek işlevi bozulmuş bireylerde düzeyleri güvenilir değildir[76].

İdrarda klaudin-3 ölçümü; immunohistokimyasal olarak gösterilmiş majör mühürleyici TJ proteini olan klaudin-3 kaybıyla korele olduğu gösterilmiştir. İdrar klaudin-3 ölçümü intestinal TJ kaybını gösteren non-invazif bir belirteç olarak kullanılabilir[77].

Lokal inflamasyon; artmış intestinal permeabilite ile ilişkilidir. İnflamasyon sonucu intestinal mukozaya artmış inflamatuvar hücrelerin göçü, sekonder granüllerinin boşaltılması ile sonuçlanabilir. Böylece dışkıda bu proteinler artabilir. *Kalprotektin, laktoferrin, elastaz* gibi nötrofil kökenli proteinler dışkıda görülebilir ve bunlar da inflamasyon belirtici olarak kullanılabilir[78].

Zonulin; hücreler arası TJ'lerin, *Vibrio cholera*'dan salgılanan 'zonula okludens toksin' olarak bilinen toksine benzer şekilde geri dönüşümlü olarak modülasyonunda görev alan bir proteindir. Tek zincirli formunda zonulin, çeşitli yollarla TJ'lerin ayrışmasında rol almaktadır. Yüksek düzeyleri çölyak hastalığı, tip-1 diyabet gibi hastalıklarla ilişkili bulunmuş ve geçirgenlik belirtici olarak gösterilmiştir[79].

2.6. Bakteriyel Translokasyon ve Klinik Önemi

Translokasyon bakteri veya endotoksinlerinin mukozal bariyer boyunca göçmesidir. Bugün gastrointestinal sistem sadece besinlerin emiliminin gerçekleştiği yer olarak değerlendirilmemektedir. İntraluminal patojenlere karşı önemli metabolik ve immünolojik sistem görevi üstlenmektedir[80].

Her bir mililitrede çok yoğun olan bakteri konsantrasyonu olması, ve sadece tek tabakalı epitel dokunun çevre ve steril doku arasındaki bariyer olması, yıllardır bilim adamlarının ilgisini çekmiştir[81]. Ondokuzuncu yüzyıl (yy.) sonlarında,

araştırmacılar GiS'in sepsisin kaynağı olabileceği teorisini savundular[82]. Birçok deneysel çalışma yapıldı. Hemorajik şoktaki köpeklerin periton sıvısında, normal intestinal mikroflorasındakiyle benzer mikroorganizmalar izole edildi[83]. Birçok çalışma intestinal mikrofloranın sepsiste sorumlu olabileceği görüşünü destekledi. Spontan bakteriyel peritonitli sirotik hastalarda enterik mikroorganizmalar kandan ve asitten izole edildi[84]. Tüm bu olaylar gram (-) ve gram (+) bakterilerin, mantarların ve endotoksinlerin barsağın mukozal bariyerinden geçebileceğinin ve bakteriyel translokasyonun kanıtı oldu. Bu nedenle bakteriyel translokasyon barsağa özgü mikrofloranın GiS mukozasından normal steril dokuya invaze olarak hastalığa neden olması olarak tanımlanmaktadır[85]. Ancak yeni kanıtlar sadece bakterinin kendisinin değil bağırsak duvarında üretilen inflamatuvar bileşiklerin ya da toksik ürünlerin (örn. lipopolisakkarit (LPS)) sistemik hasardan sorumlu olabileceğini gösterdi. Bu nedenle, bakteriyel translokasyon tanımı, intestinal lümeninden dolaşıma sadece canlı bakterilerin değil bunların endotoksinlerinin ve antijenlerinin de geçişi eklenerek genişletilmiştir[86].

2.7. Bakteriyel Translokasyon Belirteçleri

2.7.1. Lipopolisakkarit (LPS), Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein (LBP) ve Çözünür CD14 (sCD14)

LPS veya endotoksin Gram negatif bakterinin ana bileşenidir ve sistemik dolaşımda tespit edildiğinde bakteriyel translokasyon belirteçidir[87]. Lipit ve polisakkarit molekülünden oluşmaktadır. Kısa (2-3 saat) bir yarılanma ömrü vardır. Bazı LPS taşıyıcı proteinler, antikorlar ve diğer immunojenik ve mikrobiyolojik parametrelerden etkilenebilmektedir[88].

LBP, bakteriyemiye ve endotoksemiye cevap olarak hepatositlerce üretilen akut faz proteinidir. Spesifik olarak bakteriyel LPS'nin lipit-A kısmına bağlanır. Böylece CD14 gibi hücre reseptörlerine transferi kolaylaştırır. Bu sayede LPS-LBP kompleksi miyeloid hücrelerdeki CD14'e bağlanarak inflamatuvar cevap kaskadını başlatır[89,

90]. Uzun yarı ömrü sayesinde (2-3 gün) bakteriyemi episodundan sonra serumda kalması nedeniyle güvenilir bir biyobelirteçtir[91].

2.7.2. Bakteriyel DNA

Dolaşımda saptanan bakteriyel DNA fragmanları modern bir bakteriyel translokasyon belirticidir. Bunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespiti sirozlu hastalarda sistemik inflamatuvar cevap ile ilişkilidir[92]. Dezavantajı bakteriyel translokasyonda klinik güvenilirliği tam net değildir.

2.8. Sıçanların Cerrahi Gastrointestinal Sistem Anatomisi

Laboratuvar hayvanları metabolik ve immünolojik çalışmaları içeren biyomedikal araştırmalar, tümör ve kanser araştırmaları ve birçok modern deneysel çalışmalar için uygun objelerdir. Bunlar içerisinde sıçanlar, ucuz olması, kolay kullanılabilmesi açısından araştırmalar için oldukça popülerdir. Sıçanlar, bağırsak ve karaciğer nakil modellerinde ve gastrointestinal hastalıklarda sıklıkla kullanılan hayvan modelleridir.

2.8.1. Mide Anatomisi

Sıçanlarda mide karnın sol tarafında, son torasik vertebra ve ilk lumbal vertebra seviyesinde yerleşmiştir. 3.9 – 8.5 gr. arasında değişen ağırlığa sahiptir. Vücut ağırlığının yaklaşık 1.8%'ini oluşturur[93].

2.8.2. Karaciğer Anatomisi

Karnın sağ tarafında, göğüs kafesi içinde diyaframa tutunmuş olarak bulunmaktadır. Vücut ağırlığının 5%'ini oluşturmaktadır. 6 lobdan oluşmaktadır[93].

2.8.3. Bağırsak Anatomisi

İlk kısmı duodenumdur. Uzunluğu yaklaşık 9.5-10 cm.'dir. Duodenumun asendan kısmı jejunum ile devam etmektedir. Jejunum karnın loplara oluşturarak karnın sağ tarafını doldurmaktadır. Uzunluğu 89-130 cm. arasında değişmektedir.

Daha sonra ileum olarak devam etmektedir. İleum uzunluğu ise 2-3 cm civarındadır. İleumun çekuma girdiği yerde genişleme mevcuttur. Çekumun oldukça uzun mezenteri vardır. Çekumun uzunluğu yaklaşık 4.5-6.5 cm.'dir. Kolon (9.5-10 cm) ve rektum (7,5 cm) ile devam etmektedir[93].



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyde erkek, erişkin, ağırlıkları 240-380 gr. arasında olan sprague-dawley (SD) sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar deneyde kullanılmadan 10 gün önce tek tek kafeslerde su kısıtlaması olmadan, standart yem ile beslenip ortam koşullarına uyum göstermesi sağlandı. Sıçanlar sabit ısıda, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda barındırıldı. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 23.06.2015 tarih, 2015/54 kayıt ve 2015/54 – 03 karar numaralı izni alındı. Bu çalışma HÜTF Bilimsel Araştırma Birimi tarafından finansal destek ile hazırlandı (Proje Kodu: THD-2016-9077).

3.1. Deney Grupları

Hayvanlar rastgele her birinde 10 tane sıçan olan 3 deney grubuna ayrıldı:

Grup 1. Laparotomi ve 2 adet enterotomi ve reanastomoz yapılan kontrol grubu

Grup 2. Biliyopankreatik diversiyon yapıp, jejunumdan sadece gıdanın ve sadece biliyopankreatik sıvının geçtiği grup

Grup 3. Jejuno-jejunal bypass yapılarak, uzun bir jejunum segmentinden gıda ve biliyopankreatik sıvının geçmediği grup

3.2. Cerrahi İşlem Ayrıntıları

Sıçanlar deneyden 12 saat önce aç bırakıldı ancak su alımları kısıtlanmadı. Denekler 4 mg/100gr ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 1 mg/100 gr Xylazine HCl (Alfazyne® %2, 20 mg/ml, 30 ml, Alfasan İnt B V. Hollanda) karışımının intraperitoneal uygulanmasıyla uyutuldu. Karın duvarı tıraş edildikten sonra %10'luk Povidon İyodür (Batticon® solüsyon, Adeka, Türkiye) ile saha temizliği yapıp steril delikli örtü örtüldü. Tüm cerrahi işlemler tam steril şartlarda uygulandı (Şekil 2.1). Tüm gruplara antibiyotik profilaksisi (sefazolin (Cefamezin im/iv ampul,

Zentiva) 60 mg/kg) ve analjezik (morfin (Morphine HCl ampul, Galen) 1 mg/kg) subkutan olarak işlem öncesi yapıldı. Orta hat laparotomisi ile karına girildi (Şekil2.2).



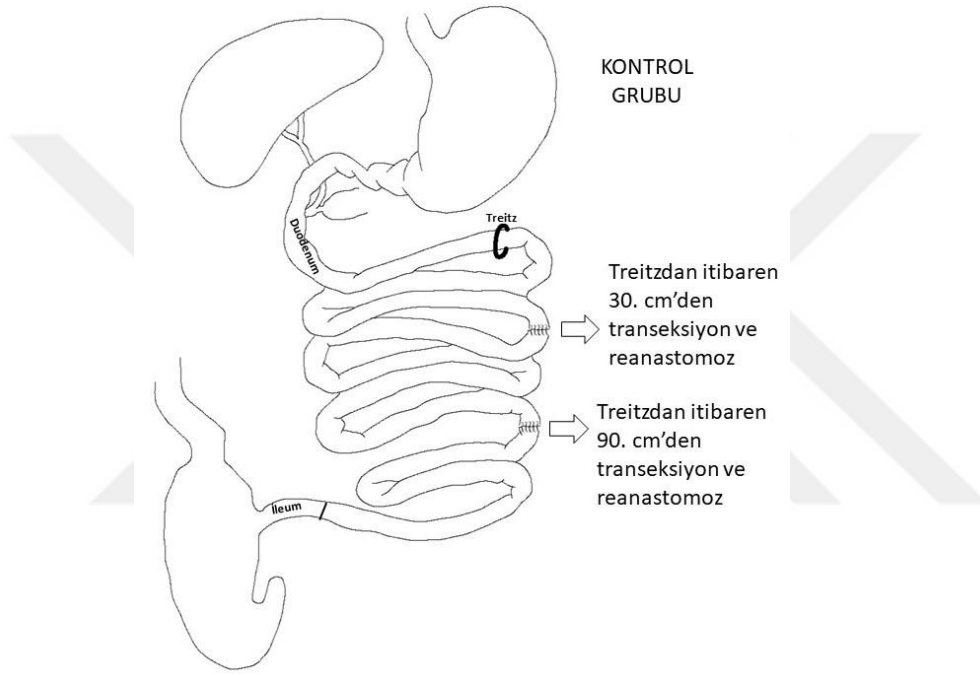
Şekil 3. 1 Deney alanı



Şekil 3. 2 Orta hat laparotomisi

Grup 1'e (kontrol) orta hat laparotomisi yapıldıktan sonra jejunuma Treitz ligamentinden itibaren 30. ve 90. cm'ye 2 adet transeksiyon ve reanastomoz yapıldı.

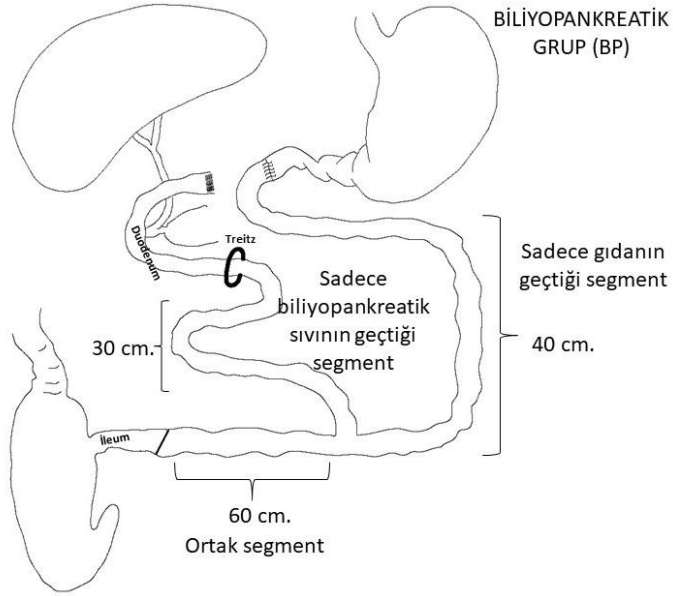
Anastomoz 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) sütür ile tek sıra 4 tane n sırada ve 4 tane arka sırada olacak şekilde yapıldı. Batın kapatılmadan önce batın içi serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter®) ile yıkandı. Sonra orta hat 3/0 polyglactin (Vicryl®, Ethicon) devamlı dikişlerle kapatıldıktan sonra cilt 3/0 polipropilen (Prolene®, Ethicon) sütür ile tek tek kapatıldı. Ameliyat sonrası sıçanlara postoperatif beslenme için 10 ml serum fizyolojik (Eczacıbaşı- Baxter®) dorsal boyun cildine subkutan enjeksiyonu yapıldı(Şekil 3.3).



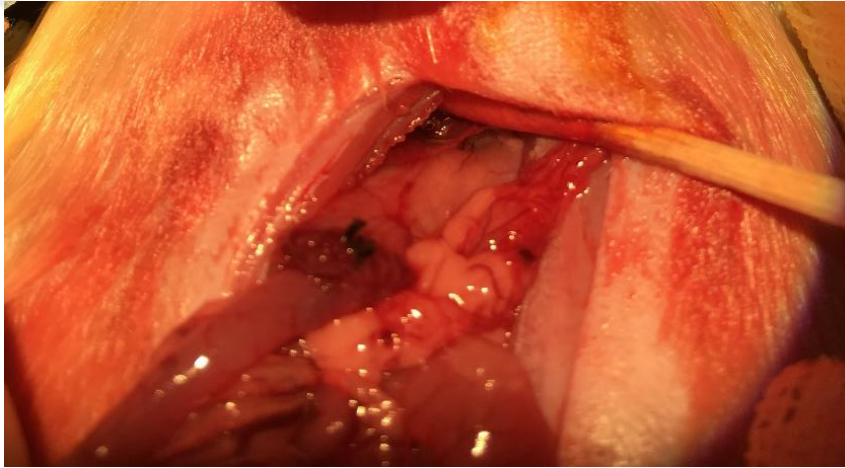
Şekil 3. 3 Kontrol grubunun şematik çizimi

Grup 2'ye (BP) orta hat laparotomisinden sonra mide duodenumdan transekte edilip, duodenal güdük tek kat 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) ile kapatıldı. Treitz ligamentinden itibaren 20. cm. 'den jejunum transekte edildi. Distal uç mideye uç uca 4 tane n sıraya 4 tanede arka sıraya olacak şekilde tek tek 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) ile anastomoz yapıldı (Şekil 3.5). Proksimal uç ilk anastomozdan 40 cm. distale olacak şekilde uç yan şeklinde tek tek 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) ile anastomoz yapıldı (Şekil 3.6). Batın kapatılmadan önce batın içi serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter®) ile yıkandı. Sonra orta hat 3/0 polyglactin (Vicryl®, Ethicon) devamlı dikişlerle kapatıldıktan sonra cilt 3/0 polipropilen (Prolene®, Ethicon) sütür ile tek tek kapatıldı. Ameliyat sonrası

sıçanlara postoperatif beslenme için 10 ml serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter®) dorsal boyun cildine subkutan enjeksiyonu yapıldı(Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 Biliyopankreatik (BP) grubun şematik çizimi

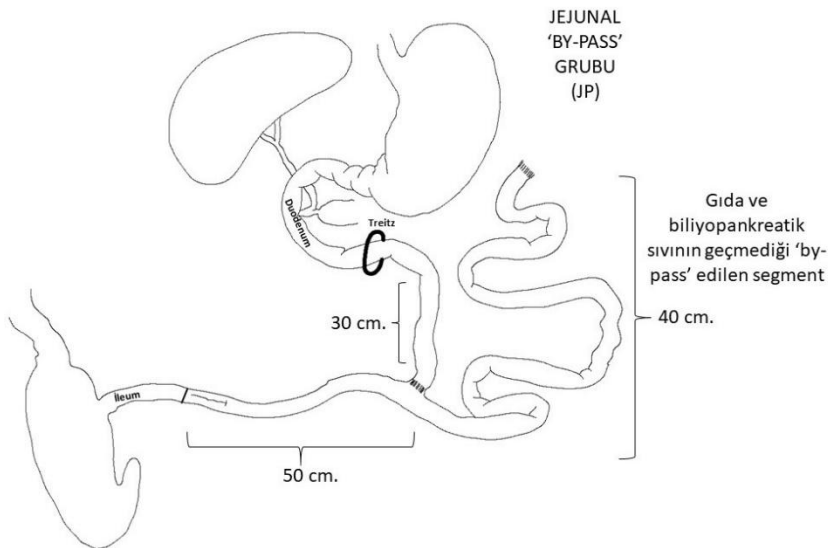


Şekil 3. 5 Tamamlanmış gastrojejunostomi



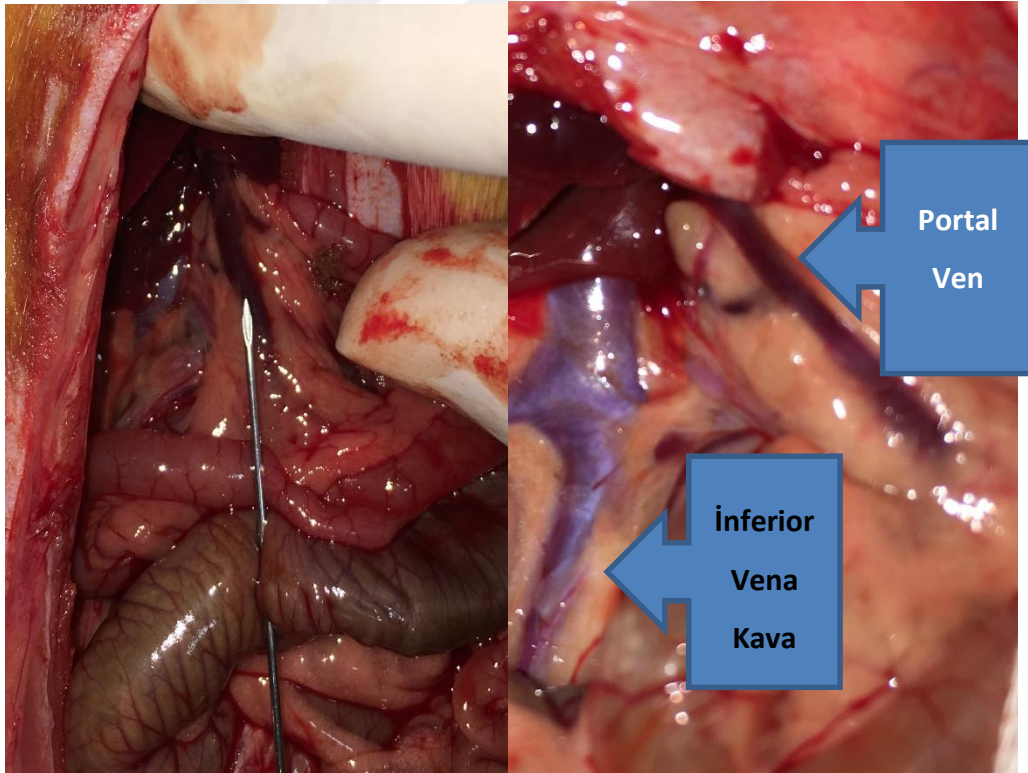
Şekil 3. 6 Tamamlanmış uç-yan jejunojejunostomi

Grup 3'e (JP) orta hat laparotomisinden sonra jejunum Treitz'dan itibaren 30. cm. 'den transekte edilip proksimal uç, distal jejunal ucun 40 cm distaline olacak şekilde uç yan tek tek 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) ile anastomoz yapıldı. Distal jejunal uç güdüğü ise tek tek 6/0 ve 7/0 polidioksanon (PDS) (PDS® II, Ethicon) ile kapatılıp son dikiş ile karın ön duvarına asıldı. Sonra orta hat 3/0 polyglaktin (Vicryl®, Ethicon) devamlı dikişlerle kapatıldıktan sonra cilt 3/0 polipropilen (Prolene®, Ethicon) suture ile tek tek kapatıldı. Ameliyat sonrası sıçanlara postoperatif beslenme için 10 ml serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter®) dorsal boyun cildine subkutan enjeksiyonu yapıldı(Şekil 3.7).



Şekil 3. 7 Jejunal 'by-pass' grubunun şematik çizimi

Ameliyat sahası acı tatları dolayısıyla kloromfenikol (Gemysetin, Deva Holding) ve Povidon İyodür (Batticon® solüsyon, Adeka, Türkiye) karışımıyla sıçanların sütürleri kemirmesini engellemek amacıyla temizlendi. Ameliyat sonrası 30 dk. boyunca sıçanlar ayılma kafeslerinde gözlenip sonra kendi kafeslerine alındı. Postoperatif 1. günde tüm sıçanlara su ve standart yem başlandı. İçme suyuna analjezik olarak asetaminofen 100 mg/kg (Katapirin tablet, Şanlı) eklendi. Gruplar 3 günde bir tartılarak kiloları kaydedildi. 24 gün sonra denekler 4 mg/100gr ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 1 mg/100 gr Xylazine HCl (Alfazyne® %2, 20 mg/ml, 30 ml, Alfasan İnt B V. Hollanda) karışımının intraperitoneal uygulanmasıyla uyutulduktan sonra, eski laparotomi insizyonundan batına girildi. Daha sonra portal venden, lipopolisakkarit(LPS) ve sitrulin analizi için kan örnekleri alındı (Şekil 3.8). Deneklere bu esnada ekssangüinasyon ile ötenazi uygulandı. Ardından histopatolojik ve mikrobiyolojik analizler için jejunum örnekleri alınarak formol içerisine ve steril besiyerlerine konuldu.



Şekil 3. 8 Portal ven örnekleme

3.3. Jejunum Örneklerinin Alınması

Histolojik ve mikrobiyolojik değerlendirme için örnekler alınırken; karıştırıcı faktör olmasını engellemek için tüm örneklerin jejunum olmasına ve tüm gruplarda alınan örneklerin işlemlerden önceki barsağın Treitz'a olan uzunluğu ile aynı bölgeden olmasına özen gösterildi. (yani örn. tüm gruplarda S1 segmentleri hep Treitz'dan itibaren 10. cm, S2 segmentleri 50. cm ve S3 segmentleri 80. cm oldu)

Örnekler alınırken önce mikrobiyolojik inceleme için ilgili segmentler; her bir segment için bisturi ve eldivenler değiştirildikten sonra alındı. Böylece segmentler arası kontaminasyon engellendi. Daha sonra histolojik incelemeler için örnekler alındı.

Histolojik ve mikrobiyolojik değerlendirmeler için jejunal örnekler;

Kontrol grubunda:

Treitz'dan itibaren 10. cm. 'den: **S1.kontrol**

Treitz'dan itibaren 50. cm. 'den: **S2.kontrol**

Treitz'dan itibaren 80. cm'den: **S3.kontrol** alındı(Şekil 3.9).

Grup 2'de (Biliyopankreatik grup (BP)):

Treitz'dan itibaren 10. cm'den: **S1.BP.safra(+).gıda(-)**

Gastrojejunostomiden itibaren 30. cm'den (yani eski Treitz'dan itibaren 50. cm): **S2.BP.gıda(+).safra(-)**

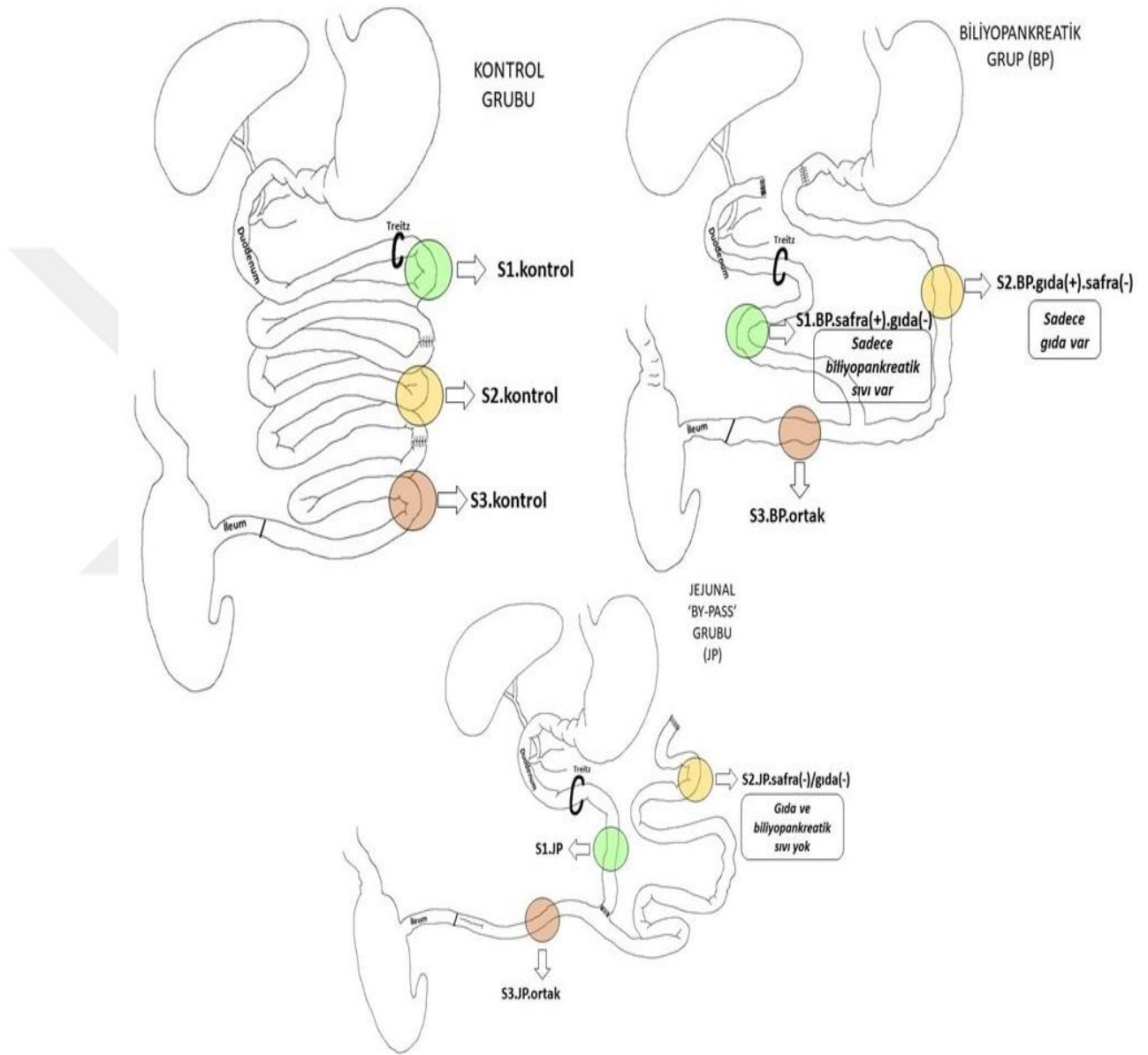
Jejunojejunostomiden itibaren 20. cm'den (yani eski Treitz'dan itibaren 80. cm): **S3.BP.ortak** alındı(Şekil 3.9).

Grup 3'de (jejunal 'by-pass' (JP)):

Treitz'dan itibaren 10. cm'den: **S1.JP**

Kör lupun güdüğünden itibaren 20. cm'den (yani eski Treitz'dan itibaren 50. cm): **S2.JP.safra(-)/gıda(-)**

Jejunojejunostomiden itibaren 10. cm'den (yani eski Treitz'dan itibaren 80. cm): **S3.JP.ortak** alındı(Şekil 3.9).



Şekil 3. 9 Tüm gruplardan alınan örneklerin şematik gösterimi

Alınan örnekler mikrobiyolojik inceleme için steril, daha önceden tartılmış serum fizyolojik içeren kaplara alındı. Histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit ile fiksasyondan sonra parafin bloklara gömüldü.

3.4. Jejunal Dokuların Histolojik Skorlaması

Parafin bloklar 3 µm kalınlıklarda kesitler alındı. Daha sonra hematoksil-eosin (HE) ile boyandı. Olympus SL-50 marka mikroskop kullanılarak incelendi. Tüm histolojik incelemeler gruplara kör iki patolog tarafından skorlandı.

Villus yüksekliği/kript derinliği oranı ışık mikroskopunda 20'lik büyütme alanında ölçüldü ve '2/1'(ileri atrofik), '3-4/1'(atrofik) ve '5/1'(normal) olarak sınıflandırıldı. İntraepitelyal lenfosit (IEL) sayımı 40'lık büyütmede her bir lam 4 kadran bölünerek sayıldı; 100 epitel hücresinde ≤20 ise 'normal', >20 ise 'artmış' olarak değerlendirildi.

3.4.1. Okludin, Klaudin-1 ve Zonula Okludens-3 (ZO-3) için İmmunohistokimya

Rutin takip işlemlerinden sonra parafin bloklara gömülen jejunum dokularından 3 µm kalınlığında alınan kesitler poli-lizin kaplı lamalar üstüne alınarak gece boyunca 60°C'lik etüvde deparafinize edildi. Primer antikor olarak 'rabbit polyclonal to Okludin' (ab168986, Abcam), 'rabbit polyclonal to Zonula okludens protein 3' (ab191143, Abcam) ve 'rabbit polyclonal to Klaudin 1' (ab140349, Abcam) boyanmaları aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

Klaudin-1: Deparafinize edilen dokular, sitratta 20 dk. kaynatıldı, antikor (Abcam marka ab140349, Cambridge, United Kingdom) 1:200 dilusyonda 20 dk. inkube edildi, sekonder elemanlar için 'Leica marka HRP conjugate polimer detection kit' kullanıldı (DS9800, New Castle, United Kingdom). Hidrojen peroksit 10 dk. , post polimer 6 dk. , polimer 6 dk. , DAB (3,3'-diaminobenzidine) 6dk. , hematoksilin 5 dk. , dehidre edilip entellanla kapatıldı. Cilt dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Okludin: Deparafinizasyonu yapılan dokular, EDTA'da(ethylenediamine tetra acetic acid) 20 dk. kaynatıldı, antikor (Abcam marka ab168986, Cambridge, United Kingdom) 1:150 dilusyonda 20 dk. inkube edildi, sekonder elemanlar için 'Leica marka HRP conjugate polimer detection kit' kullanıldı(DS9800, New Castle, United Kingdom).

Hidrojen peroksit 10 dk. , post polimer 6 dk. , polimer 6 dk. , DAP(3,3'-diaminobenzidine) 6dk. , hematoksilen 5 dk. , dehidre edilip entellanla kapatıldı. Böbrek dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

ZO-3: Deparafinizasyon yapıldıktan sonra EDTA'da(ethylenediamine tetra acetic acid) 20 dk. kaynatıldı, antikor (Abcam marka ab191143, Cambridge, United Kingdom) 1:200 dilusyonda 20 dk. inkube edildi, sekonder elemanlar için 'Leica marka HRP conjugate polimer detection kit' kullanıldı(DS9800, New Castle, United Kingdom). Hidrojen peroksit 10 dk. , post polimer 6 dk. , polimer 6dk. , DAB 6dk. , hematoksilen 5 dk. , dehidre edilip entellanla kapatıldı. Bağırsak dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Okludin boyanma şiddeti; zayıf boyanmış (400x), orta (100x) ve kuvvetli (40x) olarak derecelendirme yapıldı.

ZO-3 için boyanma şiddeti zayıf boyanmış (400x), orta (200x) ve kuvvetli (40x) olarak değerlendirildi.

Klaudin-1 için boyanma bölgesi; zayıf (tüm villusun 1/3'ü ve daha azı), kuvvetli(tüm villusun 1/3'ünden daha fazlası) olarak sınıflandırıldı.

Örnekler, hangi gruba ait olduğunu bilmeyen iki patolog tarafından skorlandırıldı.

3.5. Jejunal Aerobik Bakteriyel Popülasyon

Laparotomi ve kan örneklemesinden sonra, daha önce içine 1 ml. steril serum fizyolojik konularak hassas terazide tartılan steril tüplere ilgili segmentler konuldu. Daha sonra tekrar hassas terazi ile tartılıp, alınan dokuların ağırlıkları belirlendi. Steril doku ezici ile homojenize edildikten sonra serum fizyolojik ile dilue edildi(10^5). Uygun dilusyon hacimleri, 'kanlı agar' ve 'Endo agara' ekildikten sonra 37° aerobik ortamda inkube edildi. 24 saatlik inkubasyon sonrası koloniler belirlendi ve sayıldı. Koloni sayımları; 'gram dokuda $\log_{10}$ "colony forming unit" (CFU)' olarak ifade edildi.

3.6. Lipopolisakkarit ve Sitrulin Ölçümleri

Sıçanların portal veninden alınan kan örnekleri, EDTA içeren, steril, pirojenik olmayan tüplerde toplandı ve -80 °C’de muhafaza edildi. Hemolizli örnekler dahil edilmedi. Çalışmada lipopolisakkarit Elisa kit (Elabscience, kat. no:E-EL-0025) ve sıçan citrulline Elisa kit (Mybiosource, kat. no:MBS2600386) kullanıldı. Her iki kitin kullanma talimatlarına uygun şekilde ELISA metoduyla analizi yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23 yazılımı kullanılarak yapıldı. Histolojik ve immunohistokimyasal verilerin (ordinal değişkenler) sıklıkları gruplara göre çapraz tablolar kullanılarak verildi. Gruplar arasında bu sıklıklar bakımından fark bulunup bulunmadığı yerine göre Ki-kare ya da Fisher testleri kullanılarak verildi. Tanımlayıcı analizler sayısal veriler için ortalama ve standart sapma kullanılarak verildi. Ağırlık ve biyokimyasal değişkenler, gruplar arasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. P değerinin 0.05’in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

BULGULAR

3.8. Makroskopik bulgular

Ötenazi esnasında yapılan laparotomilerde, belirgin intraabdominal patoloji (apse, enfekte materyal, cerrahi alan enfeksiyonları) saptanmadı. Bağırsak segmentleri arasında obstrüksiyona yol açmamış kısmi yapışıklıklar mevcuttu. Anastomoz hatlarında darlık veya obstrüksiyon bulgusu mevcut değildi(Şekil 4.1). Yapılan eksplorasyonda gıda ve biliyopankreatik sıvının 'by-pass' edildiği segmentlerde genel olarak gros atrofi izlendi(Şekil 4.2).



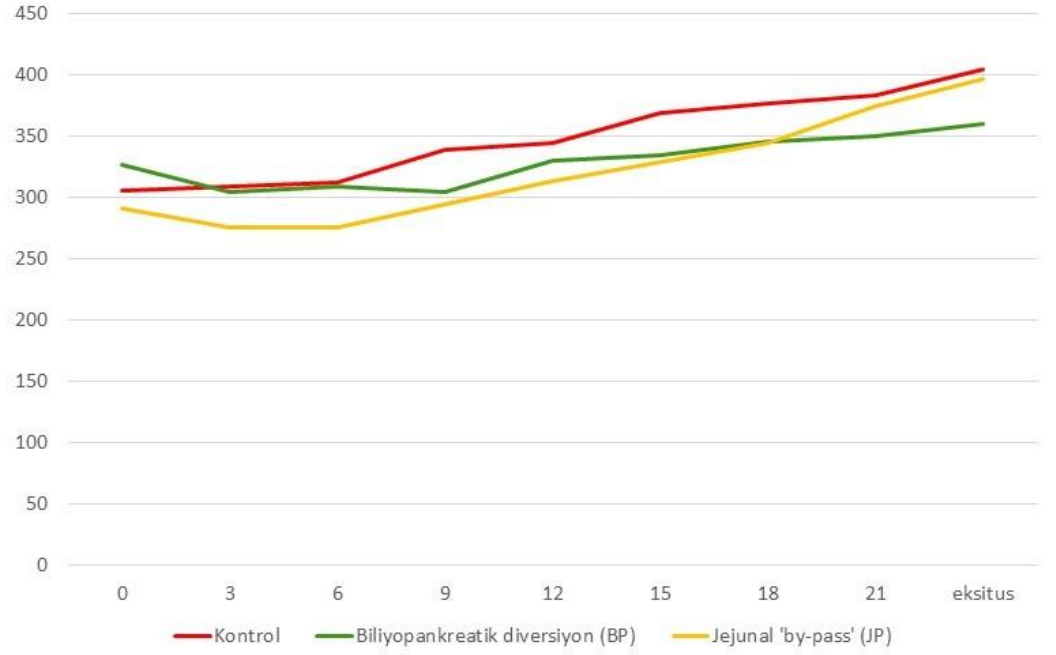
Şekil 4. 1 İyileşmiş anastomoz (uç-yan jejunojenostomi)



Şekil 4. 2 Gıda ve biliopankreatik sıvının 'by-pass' edildiği segmentte izlenen gros atrofi

3.9. Hayvan Ağırlık Ölçümleri

İki adet 'jejunal 'by-pass' (JP)' grubunda ve bir adet 'biliopankreatik (BP)' grubunda olmak üzere üç sıçan dışında sıçanlar deney boyunca sağlıklı durumda izlendiler. Ekssangüinasyon günü sıçanların hiç birinde belirgin intraabdominal patoloji saptanmadı. Üç günde bir kiloları tartılan sıçanların grup ortalamalarının günlere göre kilo değişim grafiği şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.3). Buna göre kontrol grubunda işlem sonrası sıçanların kilo almaları devam etti. Ancak 'JP' ve 'BP' gruplarında işlemden sonra yaklaşık 6 gün boyunca kilo kaybı izlendiği daha sonra ise kilo aldıkları ve kontrol grubunu yakaladıkları görüldü. Gruplar arasında başlangıçtan sona kadar ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.1).

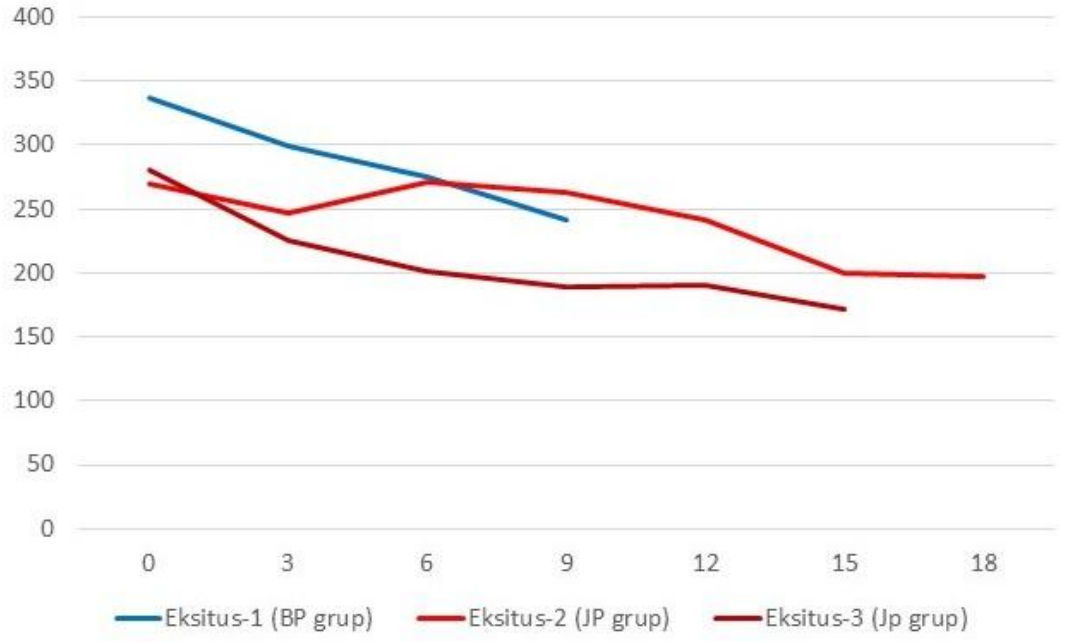


Şekil 4. 3 Sıçanların günlere göre ağırlık değişimi

Tablo 4. 1 Grupların günlere göre ağırlıkları

	Kontrol Grubu		Biliyopankreatik (BP) Grup		Jejunal 'by-pass' (JP) Grubu		
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	P
Ameliyat günü kilo (gr)	306	40	327	33	291	44	0.13
3. gün kilo (gr)	310	42	305	34	276	38	0.18
6. gün kilo (gr)	313	37	310	40	277	42	0.18
9. gün kilo (gr)	339	42	305	60	295	49	0.14
12. gün kilo (gr)	345	50	330	58	314	40	0.37
15. gün kilo (gr)	369	49	335	54	329	43	0.23
18. gün kilo (gr)	377	51	346	58	345	41	0.39
21. gün kilo (gr)	384	49	350	58	375	43	0.57
Eksitus günü kilo (gr)	404	54	361	65	397	50	0.33

Deney günü bitiminden önce ölen üç sıçanın kilo değişim grafiği şekilde verilmiştir (şekil 4.4). Buna göre bu sıçanların işlem sonrası öldüğü güne kadar ağırlıklarını kaybettikleri görüldü. Yapılan otopsilerde ise belirgin intraabdominal kaçak ya da apse görülmedi.

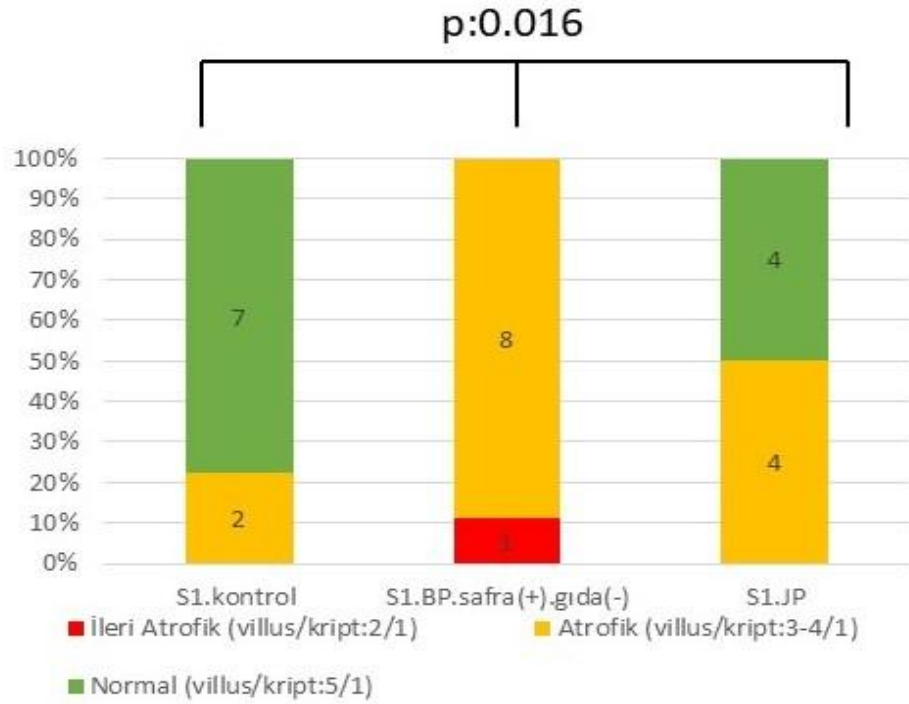


Şekil 4. 4 Ölen sıçanların günlere göre ağırlık değişimi

3.10. Jejenum Örneklerinin Histolojik İncelenmesi

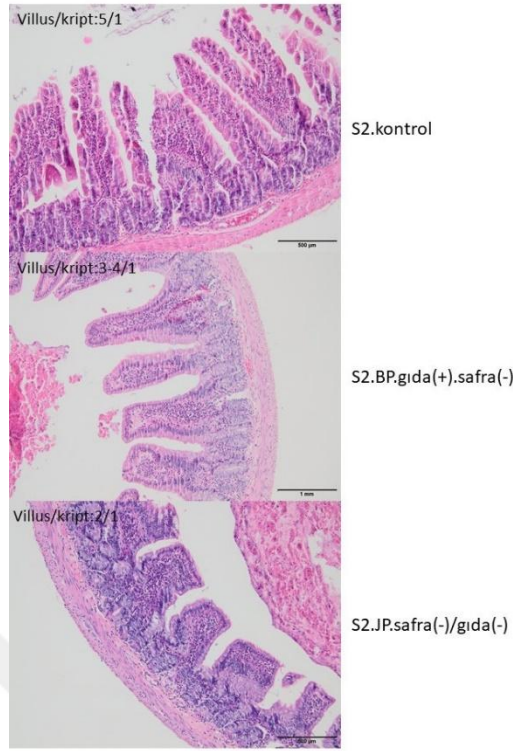
3.10.1. 'Villus/Kript' Oranı

Tüm grupların ilk segmentlerinin (S1) villus/kript oranları karşılaştırıldığında (S1.kontrol vs. S1.BP.safra(+).gıda(-) vs. S1.JP); biliyopankreatik grubun(BP), sadece safranin geçtiği ama gıdanın geçmediği (S1.BP.safra(+).gıda(-)) segmentinde villus/kript oranının anlamlı olarak azaldığı görüldü(p:0.016)(Şekil 4.5).

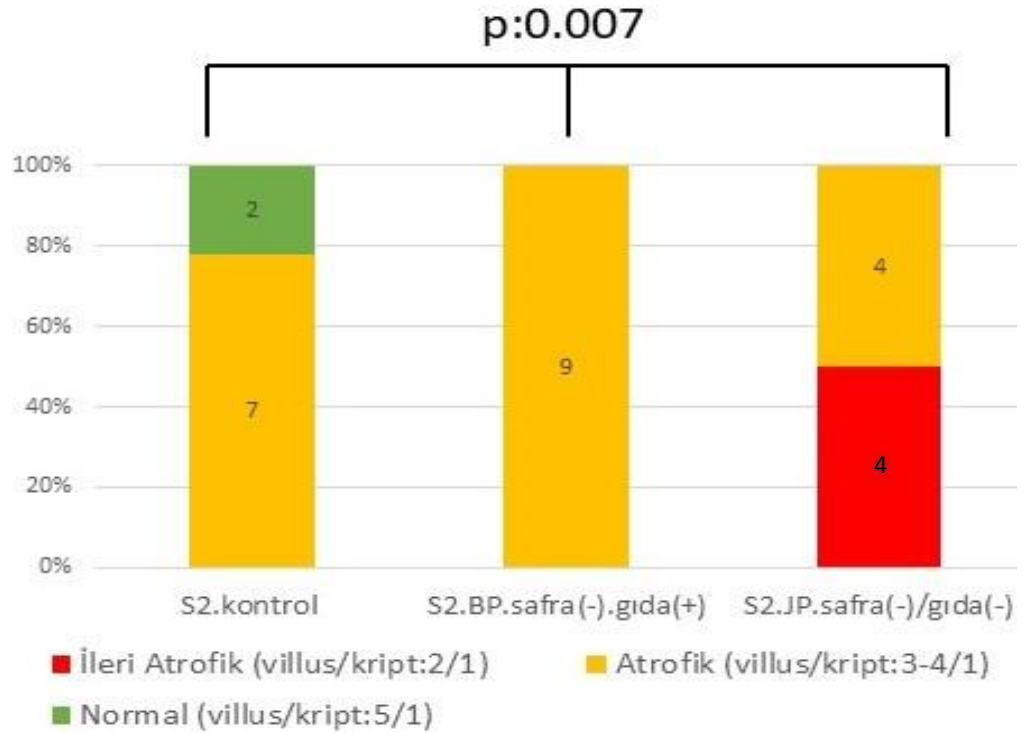


Şekil 4. 5 Tüm grupların birinci segmentlerinde (S1) villus/kript oranının yüzdesinin dağılımı

Tüm grupların ikinci segmentlerinin (S2) villus/kript oranları (S2.kontrol vs. S2.BP.gıda(+).safra(-) vs. S2.JP.safra(-)/gıda(-)) karşılaştırıldığında ise; jejunal 'by-pass' grubunun (JP), safranin ve gıdanın aynı anda geçmediği kısımda ileri derecede atrofi izlendiği ve bunu biliyopankreatik grubunun (BP), safranin geçmediği ancak gıdanın geçtiği kısımdaki atrofının takip ettiği görüldü(Şekil 4.6). Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı izlendi (p:0.007)(Şekil 4.7).



Şekil 4. 6 Grupların bağırsak kesitlerinin örnek mikroskopik fotoğrafları (Biliyopankreatik salgı ve gıdanın geçmediği segmentteki ve yalnızca gıdanın geçtiği segmentteki villus/cryp oranlarındaki değişiklikler açıkça görülmektedir(hematoksilen-eosin boyası).)

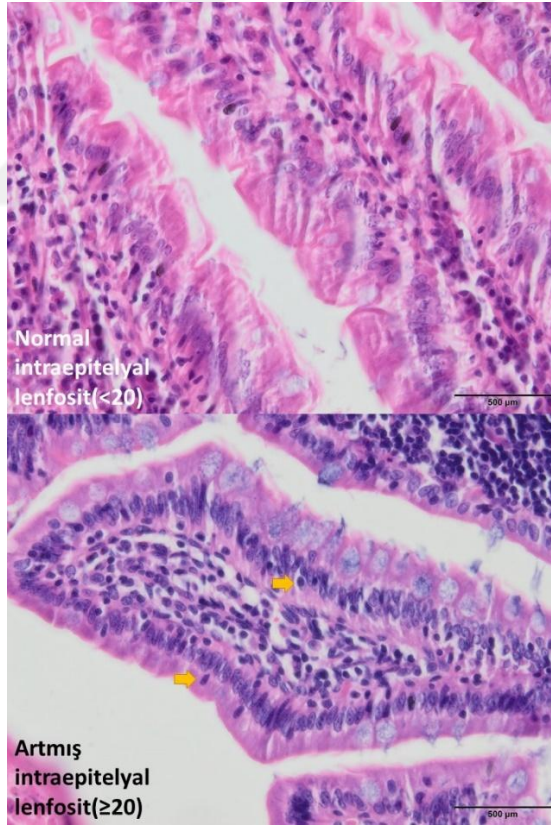


Şekil 4. 7 Tüm grupların ikinci segmentlerinde (S2) villus/kript oranının yüzdesinin dağılımı

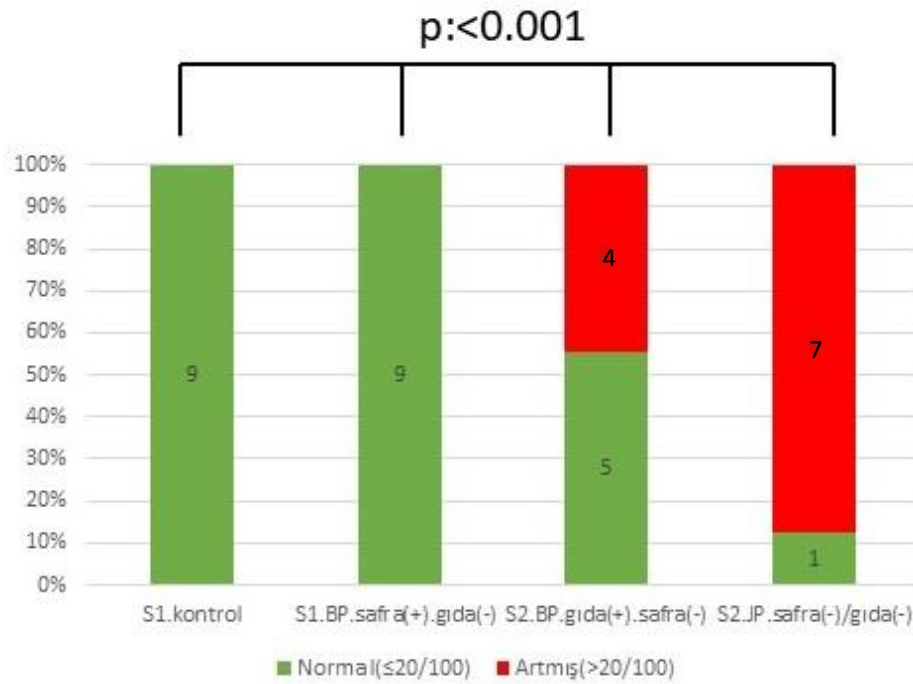
Tüm grupların üçüncü segmentlerindeki villus/kript oranları karşılaştırıldığında (S3.kontrol vs. S3.BP.ortak vs. S3.JP.ortak); gruplar arasında atrofi düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0.15).

3.10.2. İntraepitelyal lenfosit sayımı (İEL)

Grupların İEL sayımları karşılaştırıldığında; safranın olduğu ancak gıdanın olmadığı segmentte (S1.BP.safra(+).gıda(-)) İEL sayısının kontrol grubuna (S1.kontrol) göre değişmediği, safranın olmadığı ancak gıdanın olduğu segmentte (S2.BP.gıda(+).safra(-)) İEL sayısında artış olduğu, safra ve gıdanın olmadığı segmentte (S2.JP.safra(-)/gıda(-)) ise en yüksek oranda İEL oranında artış saptandığı görüldü(Şekil 4.8). Aralarındaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlı saptandı(p<0.001)(Şekil 4.9).



Şekil 4. 8 İntestinal mukozadaki intraepitelyal lenfosit değişimi (Sarı oklar intraepitelyal lenfositlerin birkaçını göstermektedir(hematoksilen-eosin boyası).)



Şekil 4. 9 Grupların intraepitelyal lenfosit (IEL) sayımındaki değişimleri

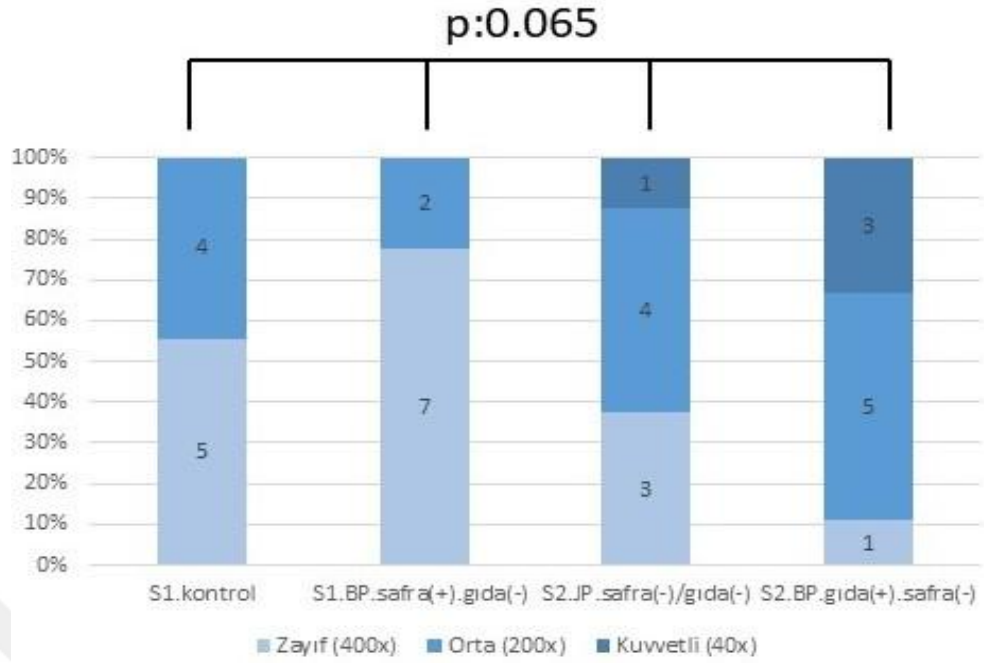
Tüm grupların safra ve besininin ortak geçtiği üçüncü segmentleri (S3.kontrol vs. S3.BP.ortak vs. S3.JP.ortak) karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p:0.14).

3.11. İmmunohistokimyasal Analizler

3.11.1.ZO-3 Boyanma Şiddeti

Tüm grupların birinci, ikinci ve üçüncü segmentlerinin ZO-3 boyanma şiddetleri kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı(p:0.35(S1 segmentleri), p:0.6(S2 segmentleri), p:0.1(S3 segmentleri)).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; gıda varlığında safranin olmaması, ZO-3 boyanma şiddetini artırırken, safra varlığında gıdanın olmaması ise azalttığı görüldü. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı izlenmedi(p:0.065)(Şekil:4.10).

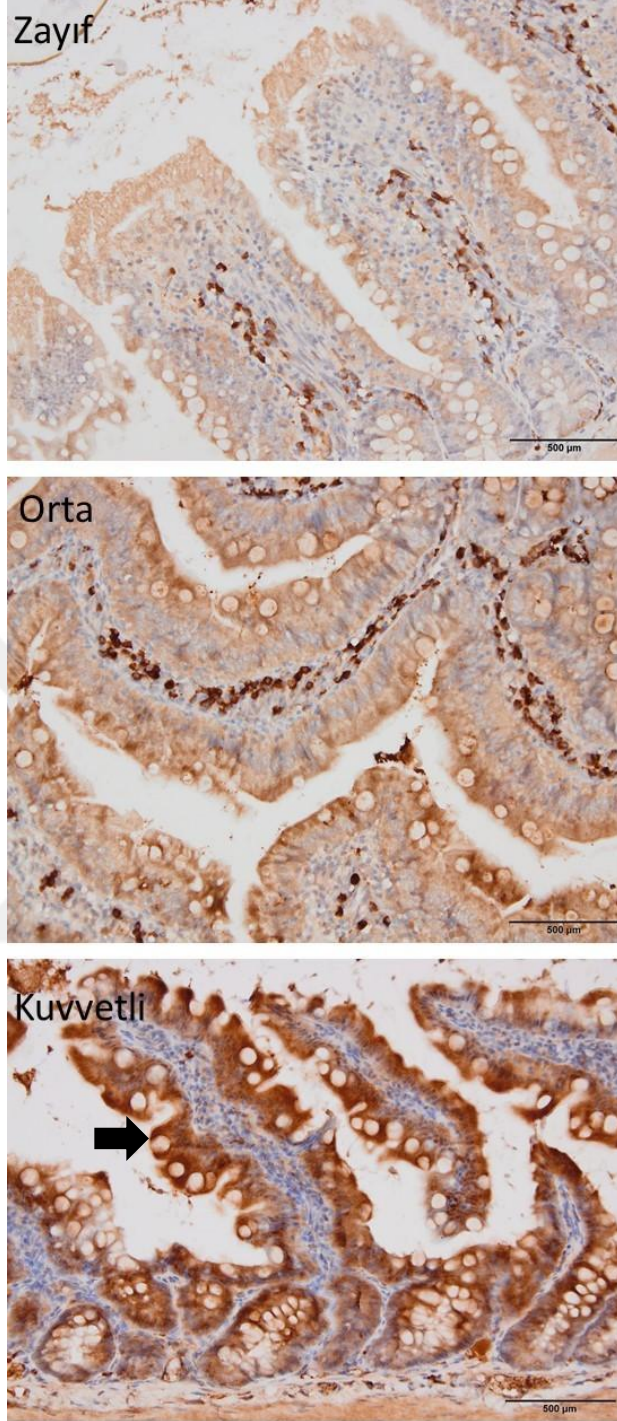


Şekil 4. 10 Gruplar arasında ZO-3 boyanma şiddetinin dağılımı

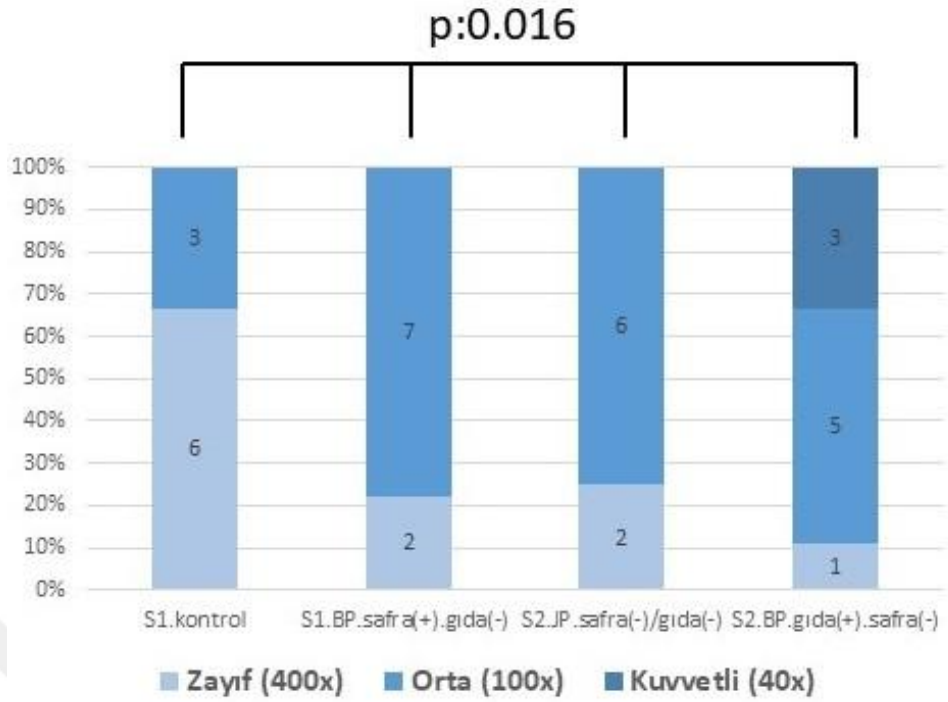
3.11.2. Okludin Boyanma Şiddeti

Tüm grupların birinci segmentleri (S1) kendi aralarında karşılaştırıldığında, jejunal 'by-pass' (JP) grubunda kontrol ve biliyopankreatik gruba göre okludin boyanma şiddetinde anlamlı olarak artış görüldü(p:0.019). İkinci ve üçüncü segmentlerde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi(p:0.37(S2 segmentleri), p:0.026(S3 segmentleri)).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; safranın geçtiği ancak gıdanın geçmediği veya her ikisinin de geçmediği segmentlerde okludin boyanma şiddetinde artış olduğu gözlemlendi(Şekil 4.11). Sadece gıda varlığında ise okludin boyanmasındaki artışın daha da kuvvetli olduğu görüldü(Şekil 4.12). Aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü(p:0.016).



Şekil 4. 11 Farklı jejunum segmentleri arasında okludinin immunohistokimyasal ekspresyonu (*Okludin intestinal epitel hücrelerinde tek başına gıda varlığında kuvvetli olarak ekprese olmaktadır. Siyah ok kuvvetli ekprese edilmiş bölgeyi göstermektedir.*)

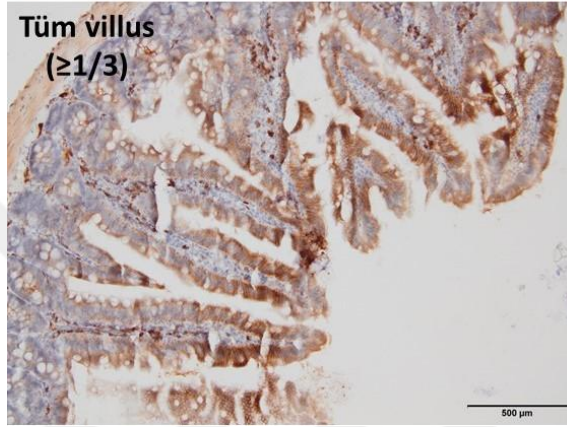
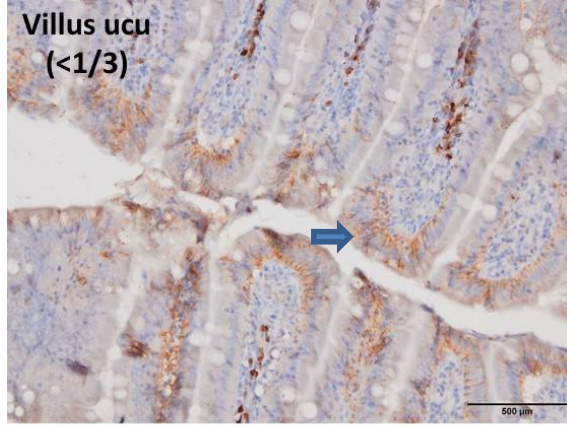


Şekil 4. 12 Gruplar arasında okludin boyanma şiddetinin dağılımı

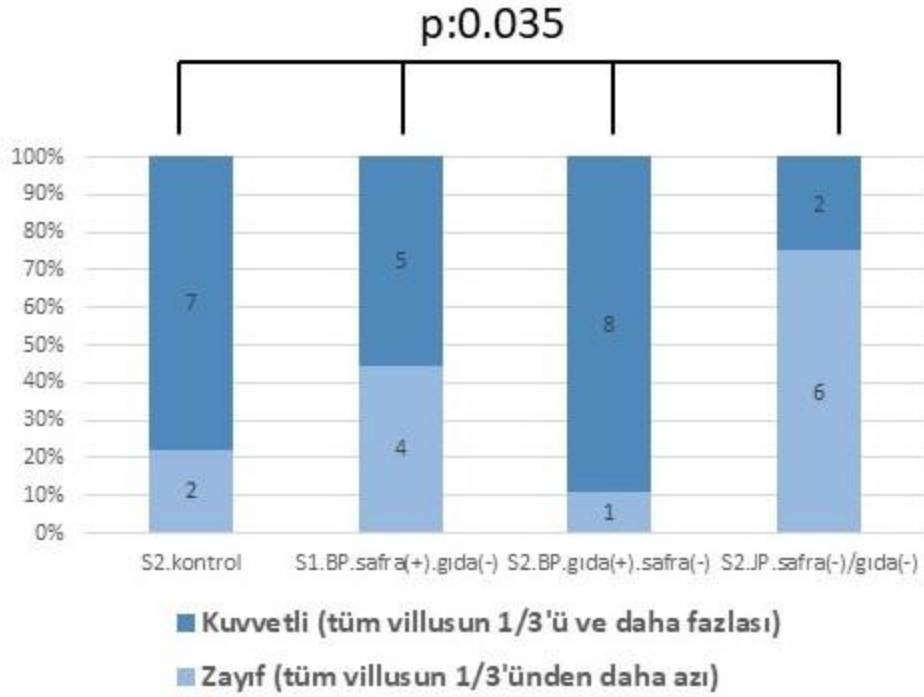
3.11.3. Klaudin-1 Boyanma Bölgesi

Tüm grupların birinci segmentleri(S1) karşılaştırıldığında her üç grupta da klaudin-1 boyanma paternleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi(p:0.89). Grupların ikinci segmentleri(S2) karşılaştırıldığında ise; jejunal 'by-pass' grubunda villuslerde klaudin-1 boyanmasının diğer gruplara göre belirgin bir şekilde sadece uç kısmında(<1/3) boyandığı görüldü(p:0.014). Üçüncü segmentler arasında ise boyanma paternleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim izlenmedi(p:0.35).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klaudin-1 ekspresyon paterninde; gıdanın geçtiği ancak safranın geçmediği segmentte belirgin değişiklik gözlenmediği görüldü. Ancak sadece safranın geçtiği segmentte boyanmanın zayıfladığı, safra ve gıdanın birlikte geçmediği segmentte ise belirgin bir şekilde azaldığı görüldü(Şekil 4.13). Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı(p:0.035)(Şekil 4. 14).



Şekil 4. 13 Jejunal segmentler arasında kladin-1'in immunohistokimyasal dağılım paterni (Gıda ve biliyopankreatik salgının birlikte geçmediği segmentlerde kladin-1 dağılımı villus uçları ile sınırlı kalmıştır. Ok villus ucunu göstermektedir.)



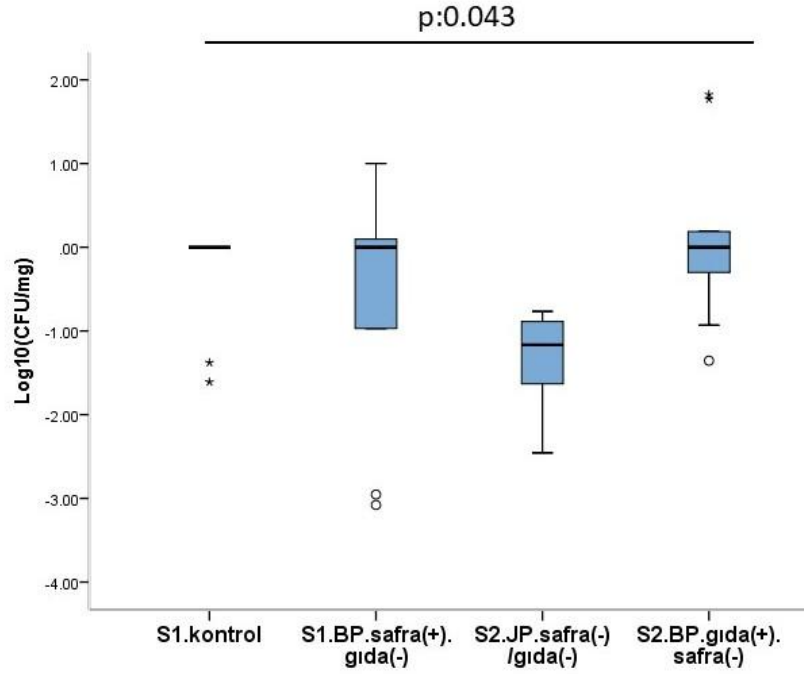
Şekil 4. 14 Gruplar arasında klaudin-1 boyanma paterninin dağılımı

3.12. Jejunal Aerobik Bakteriye Popülasyon

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilgili segmentlerdeki aerobik bakteri popülasyonunun $\log_{10}(\text{CFU/mg})$ değerinde; sadece safra geçen segmentte, belirgin değişim gözlenmediği, sadece gıdanın geçtiği segmentte artış gösterdiği, gıda ve safranın bulunmadığı segmentte ise azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.2). Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kaydedildi (0.043) (Şekil 4.15). Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra yapılan ikili analizlerde, farkın hiçbir gıda ve salgının geçmediği JP grubunun ikinci segmenti ile kontrol segmenti ve gıdanın olduğu ancak safranın olmadığı segment arasında olduğu görüldü ($p:0.009$).

Tablo 4. 2 Grupların aerobik bakteri popülasyonunun log₁₀(CFU/mg) değerleri

	Log ₁₀ (CFU/mg)	
	Ortalama	St. Sapma
S1.kontrol	-0.30	0.63
S1.BP.safra(+).gıda(-)	-0.63	1.44
S2.JP.safra(-)/gıda(-)	-1.32	0.61
S2.BP.gıda(+).safra(-)	0.10	1.08



Şekil 4. 15 Jejunal aerobik bakteriyel popülasyon (log₁₀(CFU/mg))

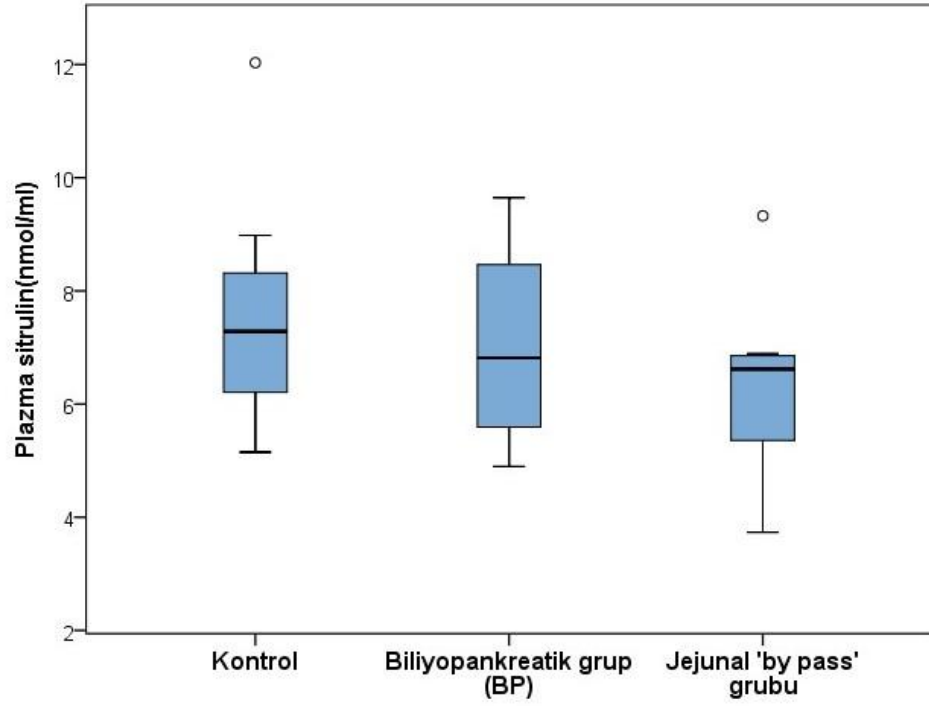
3.13. Lipopolisakkarit ve Sitrulin Ölçümleri

Portal venden alınan plazma lipopolisakkarit düzeylerinin ortalama değerleri; kontrol, BP ve JP gruplarında sırasıyla, 6 (± 6), 5 (± 3) ve 6 (± 5) olarak ölçüldü(Tablo 4.3). Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi(p:0.73).

Plazma sitrulin düzeylerinin ortalama düzeyleri ise, kontrol grubunda en yüksek (8 ± 2), jejunal 'by-pass' grubunda ise en düşük (6 ± 1.7) olarak kaydedildi(Tablo 4.3). Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi(p:0.69)(Şekil 4.16).

Tablo 4. 3 Gruplar arasında lipopolisakkarit ve sitrulin düzeyleri dağılımı

	Lipopolisakkarit (ngr/ml)		Sitrulin (nmol/ml)	
	Ortalama	St. Sapma	Ortalama	St. Sapma
Kontrol	6	6.61	8	2.00
Biliyopankreatik grup (BP)	5	3.18	7	1.75
Jejunal 'by-pass' (JP)	6	5.24	6	1.73



Şekil 4. 16 Plazma sitrulin dağılımı

TARTIŞMA

İnsan vücudundaki en büyük mikroorganizma rezervi gastrointestinal sistemdedir. Gastrointestinal sistemin fiziksel, kimyasal ve immün bariyeri bakterilerin sistemik dolaşıma ve diğer organlara yayılmasını ve invazyonunu engeller[94]. İntestinal bariyer, bağırsak permeabilitesini belirleyen hücreler arası TJ'ler tarafından oluşturulmaktadır ve 'kript-villus' aksının dinamik değişimi ile sürdürülmektedir. Değişmiş bağırsak permeabilitesi, endotoksemi ve birçok hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir.

Bu çalışmada, deneysel sıçan modelinde biliyopankreatik sıvının, gıdanın veya her ikisinin geçmediği jejunum segmentleri oluşturarak, intestinal bariyer için önemli olan TJ proteinlerini değerlendirdik. Çalışmamızda malnutrisyonun karıştırıcı bir faktör olmaması için deney grupları arasında gıda ve biliyopankreatik sıvının birleştiği segment uzunluklarını benzer olarak tasarladık. Bu nedenle deneyin başından sonuna kadar tüm grupların ağırlıkları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

TJ için anahtar role sahip proteinlerden biri olan okludin ekspresyonunda segmentler arasında anlamlı olarak değiştiğini ortaya koyduk. Sadece gıdanın geçtiği jejunum segmentlerinde diğer segmentlere göre enterositlerde artmış okludin ekspresyonu izlendi. Benzer şekilde bununla ilgili daha önce yapılan çalışmada enteral beslenme grubunda, parenteral beslenen gruba göre okludinin anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmişti[95]. Luminal gıda akışındaki değişiklik immün disfonksiyona ve geçirgenlikteki değişikliklere neden olabilir. Enteral beslenme hayatın başlangıcından itibaren gastrointestinal sistem için hayati öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda neonatal dönemden itibaren nekrotizan enterokolit gibi patolojik durumlarda veya sütten kesilme gibi gıda içeriğinin değiştiği durumlarda okludin düzeyinde azalma olduğu gösterilmiştir[96, 97]. Bizim çalışmamız da; intestinal epitelin biliyopankreatik sıvı veya gıda maruziyetindeki değişiklikler sonucunda okludin ekspresyonunda değişikliklere yol açtığını gösterdi. Okludinin TJ bütünlüğünün sürdürülmesinde kritik önemi olduğu bilindiğine göre, GİS bariyerinin sürdürülmesi için oral beslenme önemlidir[26].

Klaudin-1 bağırsak dahil bir çok dokuda bulunabilen bir TJ proteindir. Başta inflamatuvar bağırsak hastalıkları olmak üzere, alerji, pankreatit, kolanjit gibi birçok durumda enterositlerde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir[35, 37, 38]. Kolon kanserinde ise arttığı izlenmiştir[42]. Bu nedenle başta klaudin-1 olmak üzere TJ proteinleri birçok hastalığını etiopatogenezinde rol alabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da klaudin-1 ekspresyonu sadece gıda olmadığında azalmış, biliyopankreatik sıvı ve gıdanın birlikte yokluğunda ise daha çok azalmıştır. Sadece biliyopankreatik sıvı yokluğunda ise belirgin değişme görülmemiştir. Literatürde de yapılan çalışmalarda başta glutamin olmak üzere bazı besin ve proteinlerin klaudin-1 ekspresyonunu düzeltebileceği gösterilmiştir[98]. Bu da özellikle gıdaların TJ proteinlerini etkileyerek çeşitli hastalıkların oluşumunda veya tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bundan sonraki süreçte; bazı besin çeşitleri değişik bağırsak segmentlerine uygulanarak bunların etkilerinin ve oluşturdukları değişikliklerin in-vivo olarak incelenmesi ileriki çalışmaların konusu olabilir.

İnce bağırsak mukozası adapte olabilen bir yapıya sahiptir. Bu adaptasyon sağkalım için gereklidir. Bağırsak mukozası açlık, kısa bağırsak sendromu, bariyatrik cerrahi gibi birçok durumda adapte olabilmektedir. Bizim çalışmamızda, deney gruplarının cerrahi işleminden sonra yaklaşık 4-5 gün boyunca ağırlık kaybettikten sonra tüm grupların hızlı bir şekilde kilo aldıklarını gözlemledik. Sadece 3 sıçanda bu adaptasyonun görülmediğini ve öldüğü güne kadar hızla kilo kaybettikleri görüldü. Bu üç sıçanda da yapılan postmortem incelemede ölüme sebep olabilecek diğer durumlar(apse, enfeksiyon) gözlenmedi. Bu da adaptasyonun sağkalım için hayati öneme sahip olduğunun göstergesi olarak görülebilir. İnsanlarda, belirli bir nedenle kısa bağırsak sendromu gelişmesi durumunda mukozal adaptasyon 1-2 yıla kadar ulaşabilen yavaş bir süreçtir. Kalan barsağın adapte olamaması, devamlı parenteral beslenme ihtiyacını gerektirmektedir. Sürekli TPN ihtiyacı olan hastaların %25'i beş yıl içerisinde ölmektedir[99]. Diğer taraftan çalışmamızda gruplar arasında fonksiyonel enterosit kitlesinin belirteci olan sitrulin düzeyleri arasında da fark bulunmamıştır. Bu da 'by-pass' yapılan grupta, atrofiye uğramış defonksiyone bağırsak segmentine karşın diğer segmentlerin adaptasyonun gerçekleştiğinin bir kanıtı olarak karşımıza

çıkılmaktadır. Sıçanlarda yapılan benzer bir çalışmada adaptasyonun en yüksek bir şekilde bağırsakla direkt ilişki içinde olan gıdalar tarafından indüklendiği gösterilmiştir[100]. Ancak yapılan bu benzer çalışmada mideye 'by-pass' yapılmış olması ve bu nedenle anlamlı kilo kaybının olması çalışmanın kısıtlılığı olarak vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise duodenojejunal 'by-pass' yapılarak gruplar arasında kilo kaybı arasında fark izlenmemiş olması ve böylece malnutrisyonun karıştırıcı faktör olarak karşımıza çıkmaması bu çalışmanın önemli avantajlarından.

Mukozal büyüme ve gelişme; hormonal, sinirsel, immun ve mekanik sinyaller tarafından düzenlenmektedir[101]. Mukozal atrofi ise azalmış villus yüksekliği, crypt derinliği, yüzey alanı ve epitel sayısı ile karakterize morfolojik değişiklikleri içermektedir[102]. Atrofi oral beslenmenin olmadığı durumlarda ve açlığın uzun dönem sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda da biliyopankreatik sıvının ve gıdanın geçmediği segmentlerde diğer segmentlere göre anlamlı bir şekilde atrofi olduğu izlendi. Bunu biliyopankreatik sıvının veya gıdanın ayrı ayrı geçtiği segmentler izledi. Daha önce yapılan bir çalışmada da 'by-pass' edilen segmentte, mukozal atrofının izlendiği sıçan modelinde gösterilmiştir[103]. Başka bir çalışmada ise Roux-en-Y anastomoz yapılan grubun, gıda bacağına biliyopankreatik bacağına göre daha iyi adaptasyon gösterdiği gözlenmiştir[104]. Bizim bulgularımızın sonucunda da gıdanın bulunduğu tüm segmentler diğer segmentlere göre morfolojik özellikleri yönünden daha iyi adaptasyon sağlamıştır. Bu da adaptasyon için mukoza ve gıdanın direk ilişkide olması gerektiğinin ve bölgesel faktörlerin önemli olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Mikrobiota olarak adlandırılan karmaşık mikroorganizma toplulukları insanların tüm vücut yüzeylerinde bulunmaktadır. Özellikle alt gastrointestinal sistemde ciddi boyutlara ulaşabilmektedirler. Bu bakterilerin konakçı ile ilişkileri çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Bu kompleks ve dinamik bakteri popülasyonu konakçının homeostazı için önemli görevler üstlenmektedir. Başta konakçının bağışıklık sistemi olmak üzere birçok metabolik görevlerde rol almaktadırlar[105]. Diğer yandan bu bakteri bileşenlerinin değişmesi birçok inflamatuvar hastalıkların ve

enfeksiyonların patogenezeninden sorumludur. Bizim çalışmamızda da aerobik bakteri popülasyonunda, gıda ve biliyopankreatik salgının birlikte olmadığı segmentte anlamlı azalma görüldü. Diğer yandan biliyopankreatik salgının olmadığı ancak gıdanın olduğu segmentte ise artma yönünde bir bakteriyel popülasyonda artış yönünde bir eğilim izlendi. Bu sonuçlar ışığında mikrobiotayı en etkili şekilde gıdanın varlığı veya yokluğu olduğu sonucuna varıldı. Literatürde de bu konu çok çeşitli şekilde ele alınmıştır. Diyetin varlığı veya yokluğu ile diyet içeriğindeki değişimlerin mikrobiota üzerine etkisi incelenmiş ve diyetin mikrobiotayı etkileyen en güçlü faktörlerden birisi olduğu gösterilmiştir[106]. Safra asitlerinin yokluğunun inflamatuvar bakteriyel popülasyondaki artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir[107]. Bizim çalışmamızda gıda ve biliyopankreatik sıvının bakteriyel popülasyonu değiştirdiğini göstermiştir. Ancak kandaki lipopolisakkarit düzeyleri bu değişimden etkilenmemiştir. Bunun nedeni epitelyal bariyerin intakt olması veya lipopolisakkaritin yarı ömrünün kısa olması olabilir. Lipopolisakkarit dakikalar içinde başlıca karaciğerde elimine edilmektedir[108]. Biz bu çalışmada grupların postoperatif 24. günde örneklerini aldık. Bu da bize işlemler sonunda in vivo olarak geç dönem sonuçları elde etme avantajı sağlarken, kısa yarı ömrü olan LPS ölçümünde intestinal adaptasyon geliştikten sonra veri elde etmemize neden olmuştur. Diğer taraftan çalışmamızda sadece aerobik popülasyonun çalışılmış olması ve bakteriyel tiplendirme yapılmamış olması çalışmanın kısıtlılıkları arasında yer almaktadır. Hangi bakteri popülasyonunun etkilendiği veya patojen mikroorganizmalardaki artış veya azalış ele alınamamıştır.

Bu çalışmada biliyopankreatik sıvı ve gıdanın varlığı veya yokluğu ayrı ayrı incelenmiş ve in vivo olarak bağırsak morfolojisindeki etkileri araştırılmıştır. Genel anlamda gıdanın varlığı veya yokluğu biliyopankreatik sıvıya göre daha güçlü etkiler oluşturduğu izlenmiştir. Ancak safra ve pankreas salgılarının ayrı ayrı etkileri araştırılamamıştır. Pankreas ve safra salgılarının ayrıştırıldığı başka deney modellerinde bu iki grubun etkisi araştırma konusu olacak ve etkileri daha net olarak ortaya konulabilecektir.

4. SONUÇLAR

- Besinler ve gastrointestinal sistem salgılarının bağırsak morfolojisi ve bütünlük belirteçleri üzerine önemli etkileri mevcuttur.
- Villus/kript oranı safra ve besinin olmadığı bağırsak segmentlerinde ileri derecede azalarak atrofiye uğramıştır. Ayrıca bir inflamasyon belirteci olarak intraepitelyal lenfosit sayısı da besin ve gastrointestinal sistem salgılarının birlikte yokluğunda artış göstermiştir.
- TJ yapısında önemli düzenleyici rolü olan okludin proteininin boyanma şiddeti gıda varlığında artış göstermiştir. Ayrıca TJ'lerin yapısında tıkaçıcı role sahip olan klaudin-1 proteini de besinin olmadığı segmentlerde sadece gastrointestinal sistem salgılarının olmadığı segmentlere göre daha zayıf dağıldığı görülmüştür.
- İşlevsel bağırsak kitlesi belirteci olan sitrulin düzeyi gruplar arasında değişiklik göstermemiştir.
- Jejunal aerobik bakteriyel popülasyonun, besin ve gastrointestinal sistem salgılarının yokluğunda azaldığı izlenmiştir.
- Deneysel çalışma sonuçlarımız gastrointestinal sistem yapısı ve bütünlüğü üzerine besinlerin gastrointestinal salgılardan daha önemli etkisi olduğunu düşündürmektedir.

5. KAYNAKÇA

1. Saitoh Y, Suzuki H, Tani K et al. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science* 2015; 347: 775-778.
2. Shen QX, Xu GX, Shen MH. Effect of early enteral nutrition (EN) on endotoxin in serum and intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 2764-2768.
3. Ogata Y, Nishi M, Nakayama H et al. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res* 2003; 115: 18-23.
4. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 207-215.
5. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 660-669.
6. Crenn P, De Truchis P, Neveux N et al. Plasma citrulline is a biomarker of enterocyte mass and an indicator of parenteral nutrition in HIV-infected patients. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 587-594.
7. Opal SM, Scannion PJ, Vincent JL et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180: 1584-1589.
8. Yang JY, Kweon MN. The gut microbiota: a key regulator of metabolic diseases. *BMB Rep* 2016; 49: 536-541.
9. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 189.
10. Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G577-582.
11. De Palma G, Collins SM, Bercik P, Verdu EF. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? *J Physiol* 2014; 592: 2989-2997.
12. Shan M, Gentile M, Yeiser JR et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 2013; 342: 447-453.
13. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 241-260.
14. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 799-809.

15. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293.
16. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* 2005; 93 Suppl 1: S41-48.
17. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 370-378.
18. Dockray GJ. Luminal sensing in the gut: an overview. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 4: 9-17.
19. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174: 4453-4460.
20. Furuse M, Hirase T, Itoh M et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788.
21. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550.
22. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127.
23. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005; 171: 939-945.
24. Madara JL, Moore R, Carlson S. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am J Physiol* 1987; 253: C854-861.
25. Turner JR, Rill BK, Carlson SL et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997; 273: C1378-1385.
26. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G1054-1064.
27. Saitou M, Furuse M, Sasaki H et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4131-4142.
28. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 403-429.
29. Furuse M, Hata M, Furuse K et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156: 1099-1111.
30. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999; 147: 185-194.

31. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 631-659.
32. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 2010; 180: 591-598.
33. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61-72.
34. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 1386-1390.
35. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J et al. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 2001; 159: 2001-2009.
36. Burgel N, Bojarski C, Mankertz J et al. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002; 123: 433-443.
37. Pizzuti D, Senzolo M, Buda A et al. In vitro model for IgE mediated food allergy. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 177-187.
38. Wang N, Yu H, Ma J et al. Evidence for tight junction protein disruption in intestinal mucosa of malignant obstructive jaundice patients. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 191-199.
39. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 383-391.
40. Yasti AC, Senel E, Saydam M et al. Guideline and treatment algorithm for burn injuries. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2015; 21: 79-89.
41. Miwa N, Furuse M, Tsukita S et al. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001; 12: 469-476.
42. Huo Q, Kinugasa T, Wang L et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 851-857.
43. Leaphart CL, Tepas JJ, 3rd. The gut is a motor of organ system dysfunction. *Surgery* 2007; 141: 563-569.
44. Zhang Q, Li Q, Wang C et al. Redistribution of tight junction proteins during EPEC infection in vivo. *Inflammation* 2012; 35: 23-32.
45. Krug SM, Amasheh S, Richter JF et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3713-3724.

46. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3460-3464.
47. Haskins J, Gu L, Wittchen ES et al. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 199-208.
48. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* 2002; 16: 1835-1837.
49. Umeda K, Matsui T, Nakayama M et al. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 44785-44794.
50. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 1993; 218: 111-119.
51. Shimizu M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 232-241.
52. Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet* 1991; 338: 907-910.
53. Campbell DI, Lunn PG, Elia M. Age-related association of small intestinal mucosal enteropathy with nutritional status in rural Gambian children. *Br J Nutr* 2002; 88: 499-505.
54. Rinsema W, Gouma DJ, von Meyenfeldt MF, Soeters PB. Reinfusion of secretions from high-output proximal stomas or fistulas. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 167: 372-376.
55. Hofmann AF. Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol* 2007; 6: 15-27.
56. Luyer MD, Greve JW, Hadfoune M et al. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J Exp Med* 2005; 202: 1023-1029.
57. Altintas ND, Aydin K, Turkoglu MA et al. Effect of enteral versus parenteral nutrition on outcome of medical patients requiring mechanical ventilation. *Nutr Clin Pract* 2011; 26: 322-329.
58. Kelly DA. Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? *Gastroenterology* 2006; 130: S70-77.
59. Lowell JA, Shenoy S, Ghalib R et al. Liver transplantation after jejunoileal bypass for morbid obesity. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 123-127.
60. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 27-43.
61. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 1-26.

62. Abbasi S, Khani H, Gholivand MB et al. A kinetic method for the determination of thiourea by its catalytic effect in micellar media. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009; 72: 327-331.
63. De Walle JV, Sergeant T, Piront N et al. Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 291-298.
64. Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520.
65. Jimison LH, Tria SA, Khodagholy D et al. Measurement of barrier tissue integrity with an organic electrochemical transistor. *Adv Mater* 2012; 24: 5919-5923.
66. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 141-153.
67. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 225-236.
68. Randall KJ, Turton J, Foster JR. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 2011; 27: 267-284.
69. Kolf-Clauw M, Castellote J, Joly B et al. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 1580-1584.
70. Derikx JP, Luyer MD, Heineman E, Buurman WA. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5272-5279.
71. Caglayan F, Cakmak M, Caglayan O, Cavusoglu T. Plasma D-lactate levels in diagnosis of appendicitis. *J Invest Surg* 2003; 16: 233-237.
72. Batista MA, Nicoli JR, Martins Fdos S et al. Pretreatment with citrulline improves gut barrier after intestinal obstruction in mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36: 69-76.
73. Blijlevens NM, Lutgens LC, Schattenberg AV, Donnelly JP. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 193-196.
74. Elwafi F, Curis E, Zerrouk N et al. Endotoxemia affects citrulline, arginine and glutamine bioavailability. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 282-289.
75. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58: 1091-1103.
76. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008; 27: 328-339.

77. Grootjans J, Thuijls G, Verdam F et al. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg* 2010; 2: 61-69.
78. Langhorst J, Elsenbruch S, Mueller T et al. Comparison of 4 neutrophil-derived proteins in feces as indicators of disease activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 1085-1091.
79. Duerksen DR, Wilhelm-Boyles C, Veitch R et al. A comparison of antibody testing, permeability testing, and zonulin levels with small-bowel biopsy in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1026-1031.
80. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP et al. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994; 35: S28-34.
81. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 147S-162S.
82. Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP et al. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 1997; 84: 1340-1350.
83. Schweinburg FB, Frank HA, et al. Transmural migration of intestinal bacteria during peritoneal irrigation in uremic dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 71: 150-153.
84. Wong F, Bernardi M, Balk R et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005; 54: 718-725.
85. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-411.
86. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471.
87. Lin RS, Lee FY, Lee SD et al. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1995; 22: 165-172.
88. Opal SM. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 473-476.
89. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA et al. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270: 10482-10488.
90. Frey EA, Miller DS, Jahr TG et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992; 176: 1665-1671.
91. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-1431.

92. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010; 52: 2044-2052.
93. Vdoviakova K, Petrovova E, Maloveska M et al. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016: 2632368.
94. Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3: 27-43.
95. Shen TY, Qin HL, Gao ZG et al. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4352-4358.
96. Cao ST, Wang CC, Wu H et al. Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets. *J Anim Sci* 2018; 96: 1073-1083.
97. Bein A, Eventov-Friedman S, Arbell D, Schwartz B. Intestinal tight junctions are severely altered in NEC preterm neonates. *Pediatr Neonatol* 2017.
98. Bertrand J, Ghouzali I, Guerin C et al. Glutamine Restores Tight Junction Protein Claudin-1 Expression in Colonic Mucosa of Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2016; 40: 1170-1176.
99. Messing B, Crenn P, Beau P et al. Long-term survival and parenteral nutrition dependence in adult patients with the short bowel syndrome. *Gastroenterology* 1999; 117: 1043-1050.
100. Taqi E, Wallace LE, de Heuvel E et al. The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 987-995.
101. Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 2000; 80: 1633-1667.
102. Shaw D, Gohil K, Basson MD. Intestinal mucosal atrophy and adaptation. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6357-6375.
103. Kovalenko PL, Basson MD. Changes in morphology and function in small intestinal mucosa after Roux-en-Y surgery in a rat model. *J Surg Res* 2012; 177: 63-69.
104. Stearns AT, Balakrishnan A, Tavakkolizadeh A. Impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on rat intestinal glucose transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G950-957.
105. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268-1273.

106. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 20-32.
107. Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM et al. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58: 949-955.
108. Guerville M, Boudry G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 311: G1-G15.

