



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**ENDOKTOKSEMİK SIÇANLARDA PREBİYOTİK VE
PROBİYOTİKLERİN BAĞIRSAK GEÇİRGENLİĞİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Tarık Talha GÖZDEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL**

Eylül, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.09.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Haliç Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-34700 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Bu çalışma, endotoksemi oluşturulmasında kullanılan lipopolisakkarit (LPS) uygulaması sonucunda bağırsak dokusunda meydana gelen histolojik ve immünohistokimyasal değişiklikler üzerine prebiyotik ve probiyotik uygulamasının etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmanın hazırlanmasında, değerli bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın ilk aşamasından son aşamasına kadar bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşarak desteğini esirgemeyen, tezimde büyük emeği olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında benden desteklerini esirgemeyen hocalarım, Doç. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN ve Arş. Gör. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanma süresince her türlü yardımlarını ve desteklerini gördüğüm, Biyolog Sümeyye Asena CAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her durumda destek olan, ilgi ve alakalarını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eylül 2020

Tarık Talha GÖZDEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23
4. BULGULAR.....	27
4.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	27
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	95
KAYNAKLAR.....	104
EKLER	124
EK 1: Etik Kurul Karar Metni.	124
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: İnülin molekülünün biyokimyasal yapısı.....	8
Şekil 4.1.1: Deney gruplarına ait hayvanların ince bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu (HSCORE). * $p<0,05$, ** $p<0,01$: Kontrol grubuna göre; + $p<0,05$, +++ $p<0,005$: LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	28
Şekil 4.1.2: Deney gruplarının ince bağırsak kesitlerinde antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitleri. Villus (V). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	29
Şekil 4.1.3: Kontrol grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	30
Şekil 4.1.4: Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	31
Şekil 4.1.5: Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	32
Şekil 4.1.6: LPS grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	33
Şekil 4.1.7: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	34
Şekil 4.1.8: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	35
Şekil 4.1.9: Deney gruplarına ait hayvanların kalın bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu (HSCORE). ** $p<0,01$, *** $p<0,005$ ve **** $p<0,0001$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	37
Şekil 4.1.10: Deney gruplarının kalın bağırsak kesitlerinde antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde kriptler (kr) ve epitel hücreleri. a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	38
Şekil 4.1.11: Kontrol grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	39
Şekil 4.1.12: Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	40
Şekil 4.1.13: Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu ($\rightarrow$). Kript (kr). a) Bar: 50 μm , b) Bar: 20 μm	41

Şekil 4.1.14: LPS grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.....	42
Şekil 4.1.15: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.....	43
Şekil 4.1.16: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.....	44
Şekil 4.1.17: Deney gruplarına ait hayvanların ince bağırsak dokusunda MPO reaksiyonu. ***p<0,005, ****p<0,0001: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	46
Şekil 4.1.18: Kontrol grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP). a-b) Bar: 20 µm.....	47
Şekil 4.1.19: Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP). a-b) Bar: 20 µm.....	48
Şekil 4.1.20: Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP) ve tunika submukoza (TS). a-b) Bar: 20 µm.....	49
Şekil 4.1.21: LPS grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-c) Bar: 20 µm.....	50
Şekil 4.1.22: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.....	51
Şekil 4.1.23: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-c) Bar: 20 µm.....	52
Şekil 4.1.24: Deney gruplarına ait hayvanların kalın bağırsak dokusunda MPO reaksiyonu. *p<0,05, **p<0,01 ve ****p<0,001: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	54
Şekil 4.1.25: Kontrol grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde lamina propreada (LP) MPO reaksiyonu (→). a-b) Bar: 20 µm.	55
Şekil 4.1.26: Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.	56
Şekil 4.1.27: Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.	57

Şekil 4.1.28: LPS grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP), kan damarı (KD) ve tunika submukoza (TS). a-c) Bar: 20 µm.....	58
Şekil 4.1.29: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP), kan damarı (KD) ve tunika submukoza (TS). a-b) Bar: 20 µm.....	59
Şekil 4.1.30: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea, tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar 20 µm.	60
Şekil 4.2.1: İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. ****p<0,0001 Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	63
Şekil 4.2.2: İnce bağırsağa ait goblet hücresi dağılımı. ****p<0,0001 Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, +++p<0,005 LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	64
Şekil 4.2.3: Kontrol grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	66
Şekil 4.2.4: Kontrol grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu (→). Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	67
Şekil 4.2.5: Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	68
Şekil 4.2.6: Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.....	69
Şekil 4.2.7: Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	70
Şekil 4.2.8: Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.....	71
Şekil 4.2.9: LPS grubuna ait ince bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propriasında ödem (✱). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	72
Şekil 4.2.10: LPS grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	73
Şekil 4.2.11: LPS + Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitinin, H + PAS boyamasında, epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propreasında ödem (✱). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	74
Şekil 4.2.12: LPS + Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	75

Şekil 4.2.13: LPS + Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitinin, H + PAS boyamasında, epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propreasında ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	76
Şekil 4.2.14: LPS + Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	77
Şekil 4.2.15: Kalın bağırsağa ait histolojik hasar skoru. ****p<0,0001 Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	80
Şekil 4.2.16: Kalın bağırsağa ait goblet hücresi dağılımı. *p<0,05, **p<0,01 Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, ++p<0,01 LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	81
Şekil 4.2.17: Kontrol grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	83
Şekil 4.2.18: Kontrol grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu (→). Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	84
Şekil 4.2.19: Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	85
Şekil 4.2.20: Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	86
Şekil 4.2.21: Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	87
Şekil 4.2.22: Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	88
Şekil 4.2.23: LPS grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propreada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	89
Şekil 4.2.24: LPS grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	90
Şekil 4.2.25: LPS + Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propreada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	91
Şekil 4.2.26: LPS + Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	92
Şekil 4.2.27: LPS + Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propreada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.	93

Şekil 4.2.28: LPS + Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.....94



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.2.1: İnce bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.....62

Tablo 4.2.2: Kalın bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.....79



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
^{13}C	: İşaretli karbon
AAA	: Aromatik amino asitler
ATP	: Adenozin trifosfat
BCAA	: Dallı zincirli amino asit
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
FFAR	: Serbest yağ asidi reseptörü
FOS	: Fruktooligosakkarit
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GLP-1	: Glukagon benzeri peptid-1
GOS	: Galaktooligosakkarit
GSH	: Glutasyon
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HDACi	: Histon deasetilaz inhibitör
HE	: Hematoksilin-Eozin
IFN- γ	: İnterferon- γ
IgA	: İmmünoglobulin A
IGF- β	: İmmunoregülatör büyüme faktörü- β
IgG	: İmmünoglobulin G
IL-10	: İnterlökin-10
IL-12	: İnterlökin-12
IL-22	: İnterlökin-22
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
ip	: İntraperitoneal
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NO	: Nitrik oksit
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PPAR γ	: Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör- γ

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SCFA	: Kısa zincirli yağ asitleri
TGF-β	: Tümör büyüme faktörü- β
TLR	: Toll-benzeri reseptör
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
ZO	: Zonula okludens



ÖZET

ENDOKTOKSEMİK SIÇANLARDA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN BAĞIRSAK GEÇİRGENLİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarık Talha GÖZDEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Mikrobiyota, yaşamsal fonksiyonların devamında, hastalıkların başlaması ve gelişmesinde önemli bir etkidir. Vücudun en büyük mikrobiyotası da bağırsak kolonunda bulunmaktadır. Son zamanlarda, mikrobiyota kompozisyonundaki kritik değişimlerin endotoksemi, diyabet, obezite, nörodejenaratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Endotoksemi; tüm hayvanlarda ve insanlarda görülen, immün sistemin lipopolisakkarit (LPS) gibi endotoksinlere karşı ürettiği güçlü uyarının, sistemik inflamasyona sebebiyet vermesi ve bunun sonucunda ölümle dahi sonuçlanabilen patofizyolojik bir durumdur. Endotoksemi esnasında bağırsak geçirgenliğinin artışı ile hücre duvarlarında LPS bulunan gram-negatif bakteriler sistemik dolaşıma geçerek tabloyu daha ileri noktaya taşırlar. Mikrobiyota kompozisyonundaki değişiklikler, bağırsak geçirgenliğinde, endotoksin üretimi ve transportunda da değişikliklere neden olabilmektedir. Bu nedenle, birçok çalışmada mikrobiyota kompozisyonunda etkili olan prebiyotik ve probiyotikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullandığımız inülin, prebiyotik olarak etki eden bir diyet lifidir. İnsanlar inülini sindiremezler, fakat inülin bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilir. Son zamanlarda inülinin, LPS artışı ile oluşan bağırsak geçirgenliğini azalttığı, mikrobiyota kompozisyonunu seçici olarak değiştirdiği ve anti-inflamatuvar özellikleri bulunduğu tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri türlerinden olan *Bacillus clausii*'nin antimikrobiyal ve immün düzenleyici etkileri, hücre-hücre sinyalizasyonu, hücre adezyonu ve vitamin üretimi gibi çok yönlü

bağırsak düzenleyici özelliklerinin keşfedilmesi bu probiyotik türüne olan ilgiyi artırmıştır. Bu nedenle, bağırsağın yapısındaki değişimlerin tayin edilmesi, endotokseminin bağırsaktaki yıkıcı etkilerini veya bağırsakta gerçekleşen olayların endotoksemiye tetikleyici etkilerini anlayabilmek ve aynı zamanda inülin ile *Bacillus clausii*'nin patolojik vakalarda kullanım alanlarını gösterebilmek amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, 3 aylık 39 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Yirmi bir gün prebiyotik ve probiyotik uygulamasından sonra dokuların alınmasından 24 saat önce intraperitoneal olarak LPS uygulaması yapıldı ve deney hayvanlarının ince ve kalın bağırsak dokuları histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler için hazırlandı. Dokular hazırlandıktan sonra bağırsak yapısının tayini için histolojik yöntemler, bağırsak geçirgenliğinin belirlenmesi amacıyla okludin antikor ve lökosit infiltrasyonunu gösterebilmek için miyeloperoksidaz (MPO) antikor uygulaması yapıldı. Sonuç olarak çalışmamızda, prebiyotik ve probiyotiklerin ince bağırsakta bağlantı komplekslerini koruyarak, bağırsağın patojenlere karşı geçirgenliğinin önlenebileceği gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerin prebiyotik ve probiyotik ile beslenmesinin, endotoksemi gibi pek çok patolojik durumda ortaya çıkabilecek bağırsak geçirgenliğinin artışını kısmen düşürebileceği, ancak bağırsak yapısını tamamen koruyamadığı görülmüştür.

Eylül 2020, 139 sayfa.

Anahtar kelimeler: Prebiyotik, Probiyotik, Mikrobiyota, Lipopolisakkarit, Sıçan

SUMMARY

EFFECTS OF PREBIOTIC AND PROBIOTICS ON INTESTINAL PERMEABILITY IN ENDOTOXEMIC RATS

M.Sc. THESIS

Tarık Talha GÖZDEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Microbiota is an important factor in the continuation of vital functions, also initiation and development of diseases. The body's largest microbiota located in the intestinal colon. Recently, it has been shown that critical changes in microbiota composition are associated with many diseases such as endotoxemia, diabetes, obesity, neurodegenerative and cardiovascular diseases. Endotoxemia is a pathophysiological condition that strong stimulation of the immune system against endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS) causes systemic inflammation and can result in death. With the increase of intestinal permeability during endotoxemia, gram-negative bacteria with LPS found on their cell walls move to the systemic circulation and move forward this condition. Changes in microbiota composition can cause changes in intestinal permeability, endotoxin production and transport. Therefore, prebiotics and probiotics that are effective in microbiota composition are used in many studies. Inulin is a dietary fiber that acts as a prebiotic. Humans cannot digest inulin, but inulin is fermented by the gut microbiota. Recently, it has been shown that inulin reduces intestinal permeability caused by the increase of LPS, selectively changes the microbiota composition and has anti-inflammatory properties. The discovery of the antimicrobial and immunomodulatory effects of *Bacillus clausii*, one of the probiotic bacteria species, and its

versatile intestinal regulatory properties such as cell adhesion and vitamin production has increased the interest in this probiotic strain. Therefore, this study was carried out in order to determine the changes in the structure of the intestine, to understand the destructive effects of endotoxemia in the intestine or the endotoxemia triggering effects of intestinal changes. Also, we want to show the usage areas of inulin and *Bacillus clausii* in pathological cases. In our study, 3 months old 39 male Wistar Albino rats were used. After twenty-one days of prebiotic and probiotic application, LPS was applied intraperitoneally 24 hours before the taking of the tissues. Subsequently, small and large intestine tissues of the experimental animals were prepared for histological and immunohistochemical methods. After tissue preparation, histological methods were used to determine the intestinal structure. As an immunohistochemical methods, occludin antibody to show intestinal permeability and myeloperoxidase (MPO) antibody to show leukocyte infiltration were applied. As a result, our study showed that prebiotics and probiotics can protect the tight junctions in the small intestine and prevent the intestinal permeability to pathogens. It has been observed that prebiotic and probiotic feeding of healthy individuals may partially reduce the intestinal permeability but not fully protect the intestinal structure against endotoxemia that may occur in many pathological conditions.

September 2020, 139 pages.

Keywords: Prebiotic, Probiotic, Microbiota, Lipopolysaccharide, Rat

1. GİRİŞ

Bu çalışma, endotoksemi oluşturulmasında kullanılan lipopolisakkarit (LPS) uygulaması sonucunda bağırsak dokusunda meydana gelen histolojik ve immünohistokimyasal değişiklikler üzerine prebiyotik ve probiyotik uygulamasının etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde, prebiyotik ve probiyotikler hakkında genel bir bilgi verilmiştir. Prebiyotik ve probiyotiklerin genel özellikleri ve fizyolojik etkileri belirtilmiş, endotoksemi esnasında bağırsak dokusunda meydana gelen değişimler ile prebiyotik ve probiyotik uygulamasının bağırsak geçirgenliği üzerine olan etkisi çeşitli araştırmacıların yaptıkları çalışmaların ışığında ayrıntılı olarak ortaya konmuştur.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde, yukarıda değinilen açıklamalar doğrultusunda, çalışmada kullanılacak hayvan sayısı ve özellikleri verilerek, gruplar üzerinde yapılan işlemler ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Deneyler sonucu elde edilen veriler histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde toplanmış, tezin “Bulgular” kısmında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilmiş, şimdiye kadar bununla ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıp yorumlanarak, sonuca varılmıştır.

Bu bilgilere dayanarak, çalışmamızda LPS ile endotoksemi oluşturulan sıçanların bağırsak dokuları histolojik olarak incelenmiş, okludin ve miyeloperoksidaz (MPO) dağılımı immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Endotoksemi ile artan bağırsak geçirgenliğinin prebiyotik veya probiyotik uygulaması ile hangi yönde değişeceği sorgulanmış, bu değişimin endotoksemi sürecine ne gibi etkileri olacağı araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Mikrobiyota, bitki ve hayvan gibi çok hücreli tüm canlılarda bulunan, kommensal, simbiyotik ya da patojenik mikroorganizmaların ekolojik birliğidir (Lederberg ve McCray, 2001; Peterson ve Garges, 2009). Bağırsak mikrobiyotasından bahsedildiğinde, genellikle insan bağırsağında kolonize olan çok çeşitli mikrobiyal topluluklar (bakteri, fungi, arke, virüs, protozoa) anlaşılır (Shukla ve diğ., 2017). İnsan bağırsak lümeninde yaklaşık 1500 farklı tür mikroorganizma bulunur (Lozupone ve diğ., 2012).

Gastrointestinal lümenin değişik bölümlerinin kolonizasyonu; pH, oksijen maruziyeti, besin kullanılabilirliği, konak salgıları (safra ve sindirim enzimleri gibi), mukus yüzeyi ve immün sistem ile etkileşimi ile düzenlenir (Flint ve diğ., 2012). Kalın bağırsak, en yoğun ve metabolik olarak aktif mikrobiyotayı içeren bölgedir ve bu bölgede anaerobik filumlar olan Firmicutes (%75'e kadar) ve Bacteroidetes (normal olarak %10 ile %50 arasında) filumlarının baskın olduğu gözlenir. Ek olarak Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes ve TM7 gibi filumlar barındırır (Eckburg ve diğ., 2005; Tremaroli ve Bäckhed, 2012). Firmicutes filumundaki baskın türler Lachnospiraceae ve Ruminococcaceae ailesine mensuptur (Duncan ve diğ., 2007). Ayrıca Actinobacteria filumunun, özellikle Bifidobacterium gibi üyeleri de insan kolonunda sıklıkla karşımıza çıkabilir (Duncan ve diğ., 2007). İnsan bağırsak mikrobiyotasında bulunan bu bakteriyel türlerin neredeyse üçte ikisi kültür koleksiyonlarında bulunmaz iken, moleküler çalışmalar yoluyla gösterilmektedir (Walker ve diğ., 2011).

Prebiyotikler, yüzyıllardır insanların diyetlerinde varlığını sürdüren bir besin grubudur. Prebiyotik denildiğinde, Gibson ve Roberfruid tarafından bilim dünyasına tanıtılmış olan “bağırsak kolonundaki belirli bakterilerin üremesini veya aktivitesini seçici olarak artırarak, konağı olumlu yönde etkileyen ve konak sağlığını yükselten, sindirilemeyen besin içeriği” tanımı anlaşılır (Gibson ve Roberfruid, 1995). Bu şekilde genişçe tanımlanmış besin grubunun içerisinde, oligosakkaritler ve inülin, fruktanlar, fruktooligosakkaritler (FOS), laktuloz, galaktooligosakkaritler (GOS) bulunur (Roberfruid ve diğ., 2010). Ayrıca nişasta, süt oligosakkaritleri, pektin ve diğer lif bileşenlerinin de prebiyotik potansiyelleri bulunmaktadır (Coppa ve diğ., 2006; Bird ve diğ., 2010).

Bir maddenin prebiyotik olarak kabul edilebilmesi için üç şartı sağlaması gerekir: (i) midenin asidik pH ortamına dayanıklı olması, memeli enzimleri ile hidrolize edilememesi ve ayrıca gastrointestinal ortamdan emilememesi, (ii) mikrobiyota tarafından fermente edilebilmesi ve (iii) bu bileşik ile bazı bakteriler seçici olarak çoğalmalı veya aktive edilmeli, bu işlem de konak fizyolojisine pozitif katkı sağlamalıdır (Gibson ve diğ., 2010).

Prebiyotikler çok çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilebildiği gibi, sentetik olarak da üretilir. Kuşkonmaz, şeker pancarı, sarımsak, hindiba, soğan, buğday, bal, muz, arpa, domates gibi doğal yollardan tüketilebildiği gibi (Varzakas ve diğ., 2018), laktoz, sükroz ve nişasta da ana madde olarak kullanıldığında endüstriyel olarak üretilir (Al-Sheraji ve diğ., 2013; Panesar ve diğ., 2013).

Bağırsak mikrobiyotasına enerji sağlaması yoluyla prebiyotikler, bu mikroorganizmaların kompozisyonunu ve fonksiyonunu düzenleyebilir (Flint ve diğ., 2007). Filogenik olarak uzak olan bakteri türleri dahi, ortak olarak bazı prebiyotik türlerini düzenli olarak tüketebilirler (Scott ve diğ., 2013). Fonksiyonel metagenomik tekniği kullanılarak, insan mikrobiyotasının metagenomik kütüphanesindeki genler kimliklendirilmiş, prebiyotik yıkımında kullanılan genler heterolog ekspresyon yoluyla *Escherichia coli* gibi bakterilerde kullanılarak fonksiyonları ve yolakları belirlenmiştir (Cecchini ve diğ., 2013). Actinobacteria, Bacteroidetes ve Firmicutes filumları FOS, GOS ve xylooligosakkaritleri fermente edebilmiştir. Aksine, Bifidobacterium türlerinin nişasta (Belenguer ve diğ., 2006; Ryan ve diğ., 2006) ve fruktan (Rossi ve diğ., 2005) fermantasyonu, bazı spesifik bakterilerin sadece spesifik prebiyotikleri fermente edebildiğini göstermiştir. Bakterilerin bazı spesifik prebiyotikleri fermente etme kapasitesinde bir diğer önemli faktör ise prebiyotiğin zincir uzunluğudur. Örnek olarak; inülin (zincir uzunluğu ≤ 60) sadece birkaç tür tarafından sindirilebilirken, FOS (zincir uzunluğu ≤ 10) çok sayıda tür tarafından kullanılabilir (Scott ve diğ., 2014).

Bazen cross-feeding (çapraz besleme) adı verilen, mikroorganizmaların yaptığı fermantasyon sonucunda ortaya çıkan kompleksler, bir diğer mikroorganizmanın substratı konumuna gelebilir (Belenguer ve diğ., 2006). Örnek olarak, *Ruminococcus bromii* nişastayı indirgedikten sonra, birçok tür bu fermantasyon ürünlerini kullanabilir (Ze ve diğ., 2012).

Prebiyotikler, birçok özelliğinin yanında bağırsak çevresini de değiştirme yetisine sahiptir. Fermantasyon ürünlerinin sonucunda çoğunlukla asidik ürünler ortaya çıkar, bu da lümen pH'sının düşmesine neden olur. Bunun üzerine yapılan bir çalışmada, bağırsak pH'sının 6,5'tan 5,5'a düşmesi mikrobiyota kompozisyonunda ciddi değişikliklere yol açmıştır (Walker ve diğ., 2005; Duncan ve diğ., 2009). Bu tarz pH değişimleri, Bacteroides gibi asite duyarlı türlerin popülasyonunu etkilerken, Firmicutes tarafından bütirat oluşumunu tetikleyebilir. Bu işlem bütirojenik etki olarak adlandırılır (Walker ve diğ., 2005).

Selüloz, ksilan, enzime dirençli nişasta ve inülin gibi prebiyotikler, bakteriler tarafından enerji sistemine geri kazandırılır ve ardından oluşan asetat, bütirat, propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), enerji kazanımında, inflamasyonun düzenlenmesinde, bağırsak motilitesinde, yara iyileşmesinde ve kan damarlarında vazodilatör olarak iş görebilir (Tremaroli ve Bäckhed, 2012). Asetat, bütirat, propiyonat oranı bağırsak lümeninde molar olarak yaklaşık 60:20:20 olmak üzere, hepsinin toplamı lümende yaklaşık 100 mM düzeyinde seyrederek, ancak kan sirkülasyonundaki oranı, özellikle bütirat ve propiyonat için çok düşüktür (Boets ve diğ., 2017).

Bütirat, bağırsak enterositlerinin enerji metabolizmasının büyük bir kısmından sorumlu olan ana enerji kaynağıdır (Roediger, 1982). Ayrıca bütirat, bağırsak bariyer fonksiyonuna sıkı bağlantı bölgelerini uyararak ve mukus üretimini arttırarak destek olur (D'Souza ve diğ., 2017). Hücre yüzeyi düzeyinde bütirat, G protein bağlı reseptörler (GPCR) aracılığıyla çok çeşitli fizyolojik etkiler ortaya koyar (Husted ve diğ., 2017). Özellikle, bütirat bağırsak homeostazını sağlamada çok önemli olan inflamatuvar yolları düzenler (Maslowski ve diğ., 2009; Sina ve diğ., 2009; Kim ve diğ., 2013; D'Souza ve diğ., 2017) ve glukagon-benzeri peptid-1 (GLP-1) ve peptit YY gibi enteroendokrin hormonların üretimini uyarır (Tolhurst ve diğ., 2012; Christiansen ve diğ., 2018). Bu iki hormon da kan sirkülasyonuna ulaşır ve beyin dahil, farklı vücut hücrelerinde bulunan reseptörleri aracılığı ile etki gösterirler.

SCFA'ların en önemli rollerinden biri ise, bakteriyel pro-inflamatuvar moleküllerin, bağırsak lümeninin ötesine translokasyonunu engellemeleri ve bağırsak bütünlüğünü korumada vücut hücreleriyle birlikte uyum içerisinde çalışmasıdır. Tüm SCFA'lar arasında bu özellikleri ile bütirat öne çıkmaktadır. Bunun hakkında yapılan birçok çalışmada, intestinal hücreler arasında bulunan, parasellüler geçirgenliği ve çözünmüş materyallerin geçişini kontrol eden sıkı bağlantı proteinlerini düzenleyerek (Mörkl ve diğ., 2018) epitel bütünlüğünü sürdürmesi

(Feng ve diğ., 2018; Gonzalez ve diğ., 2019), hastalık modellerinde normal bariyer fonksiyonunu sürdürmedeki fonksiyonu (Yang ve diğ., 2014; Han ve diğ., 2015; Matheus ve diğ., 2017; Hu ve diğ., 2018) ile bütiratın anahtar rolü olduğu kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra bütirat, mukus üretimini de arttırarak, lümendeki bakteriler ile bağırsak epiteli arasında fiziksel bir bariyer oluşturulmasına da yardımcı olur (Cornick ve diğ., 2015).

Bütirat ayrıca, genin transkripyon ya da represyon eğilimini etkileyen histon asetilasyonunu da etkiler (Santos ve Lindner, 2017). Bütirat, histon deasetilaz inhibitör (HDACi) olarak davranır (Davie, 2003) ve makrofajlarda LPS stimülasyonuna cevap olarak üretilen pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini hafifletir (Chang ve diğ., 2014). Ayrıca SCFA'ların yerel mikrobiyotaya karşı toleransı tetiklediği ya da direkt olarak inflamatuvar cevabı düşürebildiği, lamina propreadaki makrofajların kommensal bakterilere karşı immün cevap vermesini FFAR (serbest yağ asidi reseptörü) sinyalizasyonuna bağlı olmadan nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-12 (IL-12) sinyalizasyonunu düzenlemesi ile düşürdüğü gösterilmiştir (Chang ve diğ., 2014). Dahası, SCFA'ların, B hücresi metabolizmasını uyararak, immünoglobulin G (IgG) ve immünoglobulin A (IgA)'nın sistemik olarak üretilmesini, bu yolla konak organizmanın immün cevabının düzenlenmesini sağlar (Kim ve diğ., 2016). Bütirat üreten organizmaların azalması tip-2 diyabet ve endotoksemi gibi düşük derecede inflamasyon görülen durumlarda metabolik verilerde negatif yönde sapmaya yol açmıştır (Qin ve diğ., 2012).

Bazı hastalıkların tedavisinde ise bütirat, bütirojenik prebiyotikler yerine sodyum bütirat formunda oral yolla verilmektedir. Sodyum bütirat, çoğunlukla sindirim kanalının üst bölgelerinden emilir ve plazma konsantrasyonunda ani yükselmeye sebep olur (Egorin ve diğ., 1999). Diğer yandan bağırsak kökenli bütiratın, genellikle lokal olarak etki ettiği, kalan kısmının ise karaciğer tarafından absorbe edildiği ve kana anlamlı derecede bütirat geçmediği düşünülmektedir (Bach Knudsen ve diğ., 2003). Bazı çalışmalarda, sağlıklı deneklerde diyet lifi uygulamasının, kanda bütirat seviyesini arttırdığı belirtilmiştir (Wolever ve Chiasson, 2000; Robertson ve diğ., 2005; Priebe ve diğ., 2010). Aynı zamanda, inflamatuvar koşulların da periferel venöz kanda SCFA seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Ktsoyan ve diğ., 2016).

Propiyonat, genellikle bağırsak lümeninden emilerek karaciğere geçer. Son çalışmalarda propiyonatın bağırsak glukoneogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (De Vadder ve diğ.,

2014). Aynı zamanda propiyonatın karaciğer tarafından glukoneojenik substrat olarak kullanıldığını ya da oksitlendiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Wilson ve diğ., 2017).

Bunların yanı sıra SCFA reseptörleri olan FFAR2 ve FFAR3, GLP-1 (glukagon benzeri peptid-1) ve peptit YY anlatımı yapan hücrelerde aynı anda görülür (Kimura ve diğ., 2014), bu bilgi de SCFA'ların anoreksik hormonların salınımını uyararak enerji alımını düşürebileceğini akla getirmiştir. *in vitro* enteroendokrin hücre modeli çalışmalarda, bu bağırsak hormonlarının SCFA varlığında enteroendokrin hücrelerden salınımı incelenmiştir (Psichas ve diğ., 2015). Bu çalışmadan elde edilen verilerde, propiyonat ve diğer SCFA'ların, FFAR2 reseptörü üzerinden anoreksik hormonları stimüle edebildiği gösterilmiştir.

Propiyonatın diğer yandan vücuttaki genel lipit oksidasyonunu arttırarak, enerji harcamasını yükselttiği ortaya konmuştur (Chambers ve diğ., 2018). Bu etkilerin, sempatik gangliyonlarda FFAR3 ekspresyonunun artışından dolayı (Kimura ve diğ., 2013) sempatik sinir sistemi üzerinden, periferik dokularda peroksizom proliferatör aktive edici reseptör- γ (PPAR γ) baskılanarak kahverengi adipoz doku aktivitesini arttırması üzerinden (Li ve diğ., 2018) gerçekleştiği düşünülmüştür.

Propiyonatın ve diğer bazı SCFA'ların glukoz homeostazı üzerine de olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanlarda yapılan diyet lifleri çalışmalarında, plazmada artan propiyonat oranının pankreatik β -hücrelerinin fonksiyonunun artışı üzerinden (Pingitore ve diğ., 2017) yemek sonrası insülinin düşmesi (Vetrani ve diğ., 2016) ve glukoz homeostazının iyileşmesine (Chambers ve diğ., 2014) yol açtığı belirlenmiştir.

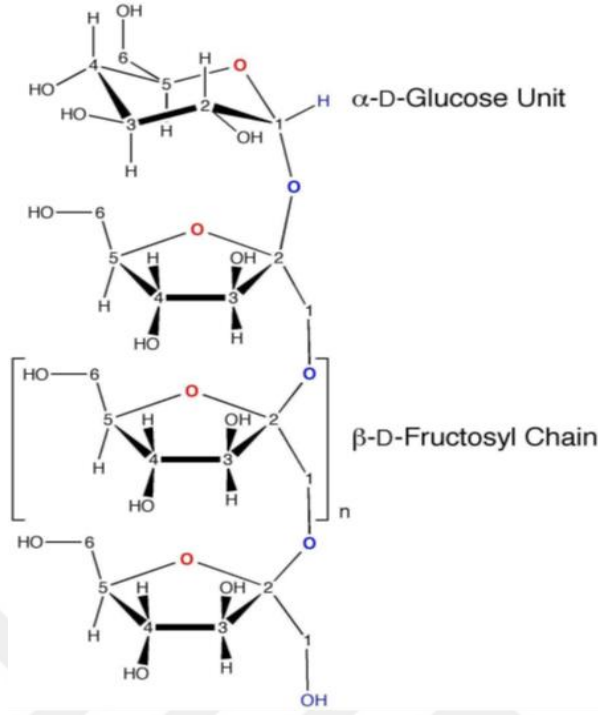
Asetatın bir kısmı, lümendeki bakteriler tarafından bütirata dönüştürülürken, çoğunluğu ise splanik ekstraksiyondan kaçarak, hepatositlere veya adipoz dokuya asetil üniteleri sağlayarak, lipogenezde ya da kasta oksidasyon işlemine kullanılmak üzere kan dolaşımına karışır (den Besten ve diğ., 2013).

Asetatın merkezi iştah regülasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Frost ve diğ., 2014) ve distal kolondaki artışı yağ oksidasyonuna etki eder, glukoz homeostazını ve inflamatuvar durumu iyileştirir (van der Beek ve diğ., 2016). Asetatın iştah kontrolü, adipozite ve kilo alımındaki etkileri üzerinde bir anlaşmazlık vardır. Frost ve diğ. (2014), asetatın diyet kaynaklı kilo alımını merkezi iştah kontrolünü düzenleyerek olumlu etkilediğini belirtirken (Frost ve diğ., 2014), Perry ve diğ. (2016), asetatın tam tersi bir etki

oluşturduğunu, glukozun uyarmasıyla salgılanan insülin miktarını ve ghrelin sekresyonunu arttırdığı, hiperfaji ve obeziteye yol açtığını belirtmişlerdir (Perry ve diğ., 2016).

Ek olarak, karaciğere yüksek seviyede propiyonat akışı, intrahepatik trigliserit miktarında düşüşe yol açmış, bunun da karaciğer ve tüm vücuttaki glukoz homeostazına olumlu etki yapacağı düşünülmüştür (Chambers ve diğ., 2014). Dahası, asetatin adiposit lipolizinin baskılanmasında rolü olduğu gösterilirken, böylece fazla yağlı karaciğerden kaynaklanan glukoz homeostazının bozulmasına karşı durduğu gözlemlenmiştir (Crouse ve diğ., 1968; Wolever ve diğ., 1989). Asetat, yağ metabolizmasında da farklı işlevlere sahiptir. Karaciğerde asetate, lipogenez ve kolesterolegenezin *de novo* sentezinde kullanılır ve propiyonat ile bu işlem inhibe edilir (Nishina ve Freedland, 1990; Demigné ve diğ., 1995). Ek olarak propiyonat:asetat oranı kolonik asetatin lipit deposuna katkı gösteren önemli bir veri olarak değerlendirilebilir. Asetatin ayrıca, leptin sekresyonunu uyardığı düşünülmektedir (Zaibi ve diğ., 2010).

İnülin, β -(2-1)-d-fruktozil fruktoz bağları ile bağlanan fruktoz monomerlerinden oluşan bir polimerdir (Şekil 2.1) (Murphy, 2001). İkinci karbonlarında β -konfigürasyonu bulunduğu için insan ince bağırsağında hidrolize edilemez ve kalın bağırsakta bakteriler tarafından fermente edilir (Apolinário ve diğ., 2014). İnülinin yaklaşık %90'ı kolona geçer ve burada bakteriler tarafından sindirilir (Cherbut, 2002). Karahindibada bulunan inülinin içeriği oligomer ve polimerler barındıran, polimerizasyon derecesi 2 ile 60 arasında değişen yapıdadır. İnülin, bitkilerde bol bulunur ve 2002'den beri yiyeceklerde kullanımı güvenli olarak değerlendirilir (Flores ve diğ., 2016). İnülin soğan, sarımsak, buğday, enginar ve muz gibi kaynaklarda doğal olarak bulunur. İnülinin kalorik değeri, sindirilemeyen doğasından dolayı 1,5 kcal/g gibi düşük bir seviyededir. İnülin, bağırsakta SCFA, laktat ve gaza dönüştürülür, bunun kalorik değerini sadece SCFA ve laktatlar oluşturur (Nyman, 2002).



Şekil 2.1: İnülin molekülünün biyokimyasal yapısı (Murphy, 2001).

İnülinin, klinik beslenme ve diğer *in vitro* çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, fermentasyonu sonucunda ortaya çıkan gazın, bazı zamanlarda dozuna bağlı olarak hafif gastrointestinal rahatsızlıklar oluşturulabileceği belirtilmiştir (Timm ve diğ. 2009; Bonnema ve diğ., 2010). Bu rahatsızlıkların geçici olduğu belirtilip, yüksek gaz aktivitesi, diğer prebiyotiklere oranla çok daha yüksek oranda fermente edilebilmesine bağlanabilir (Hughes ve diğ., 2008).

İnülin fermente edildiğinde propiyonat üretimine meyillidir, bu da total serum kolesterolünü ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)'yi düşüren, asetat:propiyonat oranının düşmesinden kaynaklanır (Amaral ve diğ., 1992). Birçok prebiyotik türünün karşılaştırıldığı bir çalışmada inülinin, diğer karşılaştırılan prebiyotik türlerine göre daha yüksek seviyede bütirat üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Carlson ve diğ., 2017). Genel SCFA üretimine etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, 24 g inülinin oral yolla alımının 4 ile 6 saat sonra kandaki asetat, propiyonat ve bütirat seviyesini yükselttiği belirtilmiş, bu yolla inülin fermentasyonunun genel metabolik duruma pozitif katkı sağlayabileceği düşünülmüştür (Tarini ve Wolever, 2010).

İnülin fermentasyonu, üriner hippurat seviyesinin artışı ile paralel olarak *Colinsella* türünün sayısını arttırmıştır (Dewulf ve diğ., 2013). Hippurat, çeşitli fermentasyon süreçlerinden sonra oluşan, diyabetik ve diyabetik olmayan insanlarda olduğu gibi, obez insanlarda zayıf insanlara göre daha az rastlanan bir metabolittir (Salek ve diğ., 2007; Calvani ve diğ., 2010). *Colinsella* artışı ve hippurat oranlarının yükselişi, inülin kullanımının prebiyotik etkisinden dolayı yararlı bir etkisi olduğunu göstermektedir (Dewulf ve diğ., 2013).

İnülinin prebiyotik etkisinin, *Bifidobacterium* türlerini de arttırdığı uzun zamandır bilinmektedir (Gibson ve diğ., 1995). *Bifidobacteria*'nın, konağı opportunistik bakterilere karşı koruyan antimikrobiyal metabolitler salgıladığı, yüksek miktarda salgıladığı laktik asit ile de kolon pH'sını düşürerek patojen çoğalmasını sınırladığı ve böylece bağırsak sağlığına olumlu katkılar yaptığı bilinmektedir. Yakın zamanlarda, 16S rDNA'nın hiper değişken bölgesi olan V4 bölümü kullanılarak gerçekleştirilen bakteriyal identifikasyon çalışmasında inülinin, *Bifidobacterium* ve *Anaerostipes* türleri, *Lactobacillus gasseri* ve *Faecalibacterium prausnitzii* türü bakterilerde yükselişe yol açarken, *Bilophila* popülasyonunda azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir (Dewulf ve diğ., 2013). Bu sonuçların *Anaerostipes* türlerinin ve *Faecalibacterium prausnitzii*'nin bütirat üretici bakteriler olması dolayısıyla, konağa potansiyel olumlu etkileri olacağı düşünülmektedir (Schwiertz ve diğ., 2002; Allen-Veroe ve diğ., 2012). *Bilophila*'nın ise kabızlık sorunlarıyla ve dışkı sertliği ile olan bağlantısı dolayısıyla, inülinin bağırsak düzenleyici etkileri ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Vandeputte ve diğ., 2017). *Bifidobacteria* aynı zamanda, gram-negatif bakterilerde yoğun olarak bulunan ve inflamatuvar metabolik hastalıklar ve durumlara yol açan inflamatuvar moleküllerin salınmasını tetikleyen LPS'nin kandaki seviyesinin düşmesi ile korelasyon göstermiştir (Knaapen ve diğ., 2013). *Bifidobacteria* dışında *Anaerostipes* ve *Bilophila*, inüline cevap veren türler olarak görülmektedir. *Anaerostipes*, inülini sindiren enzimlere sahip aynı zamanda bütirat üretici bir bakteridir (Scott ve diğ., 2014). *Bifidobacteria*, inülinin ana tüketici olmasının yanında *Anaerostipes*, *Bifidobacteria*'nın ürettiği monosakkaritler ve fermentasyon ürünlerini tüketebilir ve cross-feeding ilişkisine girebilen bakteriler arasında yerini alır (Falony ve diğ., 2006).

Diyet fibrillerinden yoksun diyetlerle tetiklenmiş adipozite, yağ içeriğine bakılmaksızın, kolon kütlesinde belirgin düşüşe yol açar ve bu diyetin değişmesiyle birlikte birkaç gün içerisinde gözlemlenir (Chassaing ve diğ., 2015). Ancak, inülin uygulaması ile bu tersine

çevrilmiş, enterosit proliferasyonu ve Paneth hücresi artışı ile korelasyon göstermiştir (Zou ve diğ., 2018). Aynı çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde inülin, sıkı bağlantı proteinlerinden okludin ve klaudin-2'yi arttırarak, kolon geçirgenliğini azaltmıştır (Zou ve diğ., 2018).

İnülinin akut etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tek doz 24 g inülin verilen yüksek kilolu obez deneklerde yağ oksidasyonu artmış, postprandial plazma serbest yağ asidi oranı düşmüştür. Bunun yanında, inülin takviyesi erken postprandiyal plazma glukozunda ve insülin konsantrasyonunda placeboya göre düşüşe yol açmıştır. Aynı çalışmada gösterilen, işaretli karbon (^{13}C) takibi ile gerçekleştirilen deneyde nefeste $^{13}\text{CO}_2$ görülmüş, aynı zamanda ^{13}C etiketli SCFA'lar inülin alımından 2 saat sonra plazmada gözlenmiştir. Bu çalışma, inülinin substrat metabolizmasına etkisini göstermesi açısından önemlidir (Van der Beek ve diğ., 2018).

Daha önceki çalışmalarda inülinin SCFA'lar üzerinden inflamasyonu düşürdüğü gösterilmiştir (Brooks ve diğ., 2017). SCFA'lar neredeyse tüm immün hücrelerin apoptoz, proliferasyon, kemotaksis ve farklılaşma fonksiyonlarını düzenleyebilir (Sun ve diğ., 2017). Bunun yanı sıra, yakın zamanda yapılan bir çalışmada inülinin obezitede görülen metabolik sendrom belirtilerini SCFA gerekmeden, bazı bakteriyel türleri arttırarak interlökin-22 (IL-22) yükselmesini teşvik ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Zou ve diğ., 2018). IL-22'nin yakın zamanda gösterilen bağırsak epitelinin güçlenmesine olan katkısını enteroendokrin hücrelerde endoplazmik retikulum stresini düşürerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Gulhane ve diğ., 2016).

İnülinin, bağırsak dışında da inflamatuvar parametreler üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir. Yakın zamanda, düşük dereceli endotoksemi ile seyreden alkolik karaciğer hastalığı modelinde yapılan çalışmada, inülinin, karaciğerde M1 makrofajlarını baskıladığı ve M2 makrofajlarının etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkiyi, Arg-1 dağılımını yükselterek ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) etkinliğini düşürerek oluşturmuştur. M1/M2 polarizasyonu, inflamatuvar durumun bir göstergesi olarak okunabilir. M1 makrofajları pro-inflamatuvar olan iNOS ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ekspresyonu açısından yüksek iken, M2 makrofajları anti-inflamatuvar olan Arg-1 ve interlökin-10 (IL-10) ekspresyonu açısından yüksektir. Aynı çalışmada, SCFA'ların direkt olarak M1'i baskıladığı, M2 polarizasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2020).

Bağırsak mikrobiyotasının aynı zamanda endotoksin seviyesinin düzenlenmesinde de önemli etkileri bulunur. Yüksek yağlı diyetle beslenen deneklere inülin uygulaması, endotoksin seviyesinin düşmesine yardımcı olmuştur. İnülinin bu etkileri, bağırsak endotoksin seviyesinde düşmeye yol açan ve düşük seviyeli inflamasyonun iyileştirilmesinde etkili olan Bifidobacterium ve Lactobacillus seviyesini arttırması ile gösterdiği düşünülmektedir (Li ve diğ., 2020).

Sıçanlarda dekstran sülfat sodyum (DSS) ile oluşturulan kolitte oral yolla inülin uygulanması, inflamasyon biyobelirteçlerini, mukozal hasar ve kript hasar skorunu kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde düşürmüştür. Buradaki hastalık modelinde de Bifidobacterium ve Lactobacillus artışı bu durumla paralel olarak gözlenmiş, mukozal immunoregülatör büyüme faktörü- β (IGF- β) ve pro-inflamatuvar sitokinlerde düşüşe yol açmıştır (Videla ve diğ., 2001). Bir diğer kolit modelinde ise inülin, probiyotikler ile kullanıldığında inflamasyonu düşürmüş ve dokuladaki displaziye azaltmıştır (Wang ve diğ., 2019).

İnülinin antioksidan etkisi üzerine yapılan çalışmada, total antioksidan kapasite, süperoksit dismutaz seviyesi ile katalaz enzimi yükselmiş, malondialdehit (MDA) seviyeleri düşmüştür (Pourghassem Gargari ve diğ., 2013). Sinbiyotiklerin kullanıldığı, karsinoma tetiklenerek oluşturulan deneysel tasarım ile yapılan bir diğer çalışmada ise, inülinin bir önceki çalışma ile tutarlı olarak süperoksit dismutaz ve MDA seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (Verma ve Shukla, 2014). Bir diğer alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında da total antioksidan kapasite yükselmiş ve MDA seviyeleri, inülin uygulaması ile düşmüştür (Javadi ve diğ., 2018).

Probiyotik terimi “yaşam için” anlamına gelen pro (Latince için anlamında ön ek) ve bios (yunanca yaşam) kelimelerinden türetilmiştir. Fuller 1989’da probiyotik terimini “konak hayvanın bağırsak dengesini pozitif olarak düzenleyen canlı mikrobiyal besin desteği” olarak tanımlamıştır (Fuller, 1989). Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü’ne göre probiyotik, uygun dozlarda uygulandığında konağa sağlık açısından yararlı olan canlı mikroorganizma türleridir (Food and Agriculture Organization (FAO), 2002). İnsanların doğal bileşikler ya da fermente edilmiş gıdalar şeklinde probiyotik ve prebiyotik tüketiminin çok uzun bir geçmişi vardır (Yoo ve Kim, 2016).

Günümüzde probiyotikler çoğunlukla *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Streptococci* gibi laktik asit bakterileri ile *Bacillus*, *Escherichia* ve *Propionibacterium* türlerinden üretilir. Probiyotik olarak değerlendirilecek türlerin; cins, tür ve suş seviyesinde tanımlanmış olması, nonpatojen, bağırsak mukozasını sindirmeyen, antibiyotik rezistans genlerini diğer türlere taşımayan, safra tuzları ile konjuge olmayan, antibiyotiklere duyarlı, sindirim lümeninden geçerken yaşayabilmesi için asit ve safra tuzlarına tolerans göstermesi, mukozal yüzeye yapışabilmesi, bağırsağı kolonize edebilmesi, antimikrobiyal maddeler salgılaması, patojen bakterileri antagonize edebilmesi gibi özelliklerden hepsi olmasa dahi çoğunu karşılaması gerekir (Borchers ve diğ., 2009).

İntestinal lümende sakkarolitik ve proteolitik olmak üzere iki çeşit fermentasyon tipi görülür. Ancak, bağırsaktaki bakterilerin kültüre edilmesindeki zorluklar yüzünden pek çok türün fermentasyon kapasitesi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Sakkarolitik fermentasyon daha çok proksimal kolonda yoğunlaşmış iken, fermente edilebilen liflerin burada tükenmesi ile distal kolona doğru aşamalı olarak proteolitik fermentasyon artar. Diyet liflerinin ve karbonhidratların fermentasyonu (sakkarolitik fermentasyon) yüksek oranda SCFA, laktat, sükkinat ve metan, karbondioksit ve hidrojen gibi gazların oluşmasına sebep olur (Cummings ve diğ., 1987). Ancak proteinlerin fermentasyonu (proteolitik fermentasyon) çok daha çeşitli moleküllerin oluşumuna yol açar. SCFA'ların yanında, hidrojen, metan, karbondioksit, hidrojen sülfid gibi gazlar, dallı zincirli amino asitlerin (BCAA) fermentasyonu ile isobutirat, 2-metilbütirat, izovalerat, aromatik amino asitlerin (AAA) fermentasyonu ile fenolik ve indolik bileşikler oluşabilir (Russell ve diğ., 2011). Proteolitik fermentasyon sonucunda oluşan çoğu molekül, kolonik ve metabolik sağlık açısından toksik olarak kabul edilmektedir (Russell ve diğ., 2011; Dodd ve diğ., 2017; Zhao ve diğ., 2018). Ancak, indol ve hidrojen sülfid gibi bazı metabolitlerin bağırsağı ve periferik dokuları yararlı şekilde etkileyebileceğine dair de sonuçlar bulunmaktadır (Okamoto ve diğ., 2013; Beaumont ve diğ., 2018). Bunun yanı sıra, proteoliz ile elde edilen BCAA ve AAA'lar cross-feeding yolu ile diğer bakteriler tarafından metabolize edilebilir (Dodd ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2017). Bahsedilen cross-feeding mekanizmasının bozulması, bu amino asitlerin normalden fazla absorpsiyonuna yol açarak, bağırsak bütünlüğünü bozabilir (Dodd ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2017).

Birçok bakteriyel enzim, konak sağlığına etkileri üzerinden çalışılmıştır. Bakteriyel β -glukusidaz ve β -glukuronidaz, glikozitlerin ve glukuronit konjugatların glikozit bağlarını

aglikonlar oluşturmak üzere hidrolize eder. Bağırsaktaki glikozitler, diyetteki bitkisel materyalden kaynaklanır. Endojen olarak üretilen glukuronit konjugatları karaciğerde metabolize edilir, glukuronik asit olarak ince bağırsağa safra asitleri ile salınır (Rowland ve diğ., 1985). Diğer bakteri kaynaklı enzimlere örnek olarak azoredüktaz, nitrat redüktaz, nitroredüktaz ve sülfatazlar verilebilir (Goldin, 1990). Azoredüktaz, aminlerin oluşumuna yol açarken; nitrat redüktaz, nitrati nitrite çevirir, nitroredüktaz ise heterosiklik ve aromatik nitro bileşiklerin oluşumunda görev alır (McBain ve MacFarlane, 2001). Sülfatazlar, kolonik musinler gibi mukozal glikanların yıkımında iş görür (Benjdia ve diğ., 2011). Bu enzimlerin aktivitesi mikrobiyota kompozisyonuna bağlıdır. Örnek olarak, *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria* azoredüktaz, nitroredüktaz ve β -glukuronidazı düşük seviyede üretirken, zorunlu anaeroblar (*Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp., ve *Clostridium* sp.) bu enzimleri yüksek oranda üretirler (Nakamura ve diğ., 2002; Benjdia ve diğ., 2011).

Bağırsaktaki bakteri çeşitliliğinin en önemli kaynaklarından biri, bakteriler arasındaki cross-feeding ve metabolik etkileşimlerdir (Rabiu ve Gibson, 2002). Şaşırtıcı bir şekilde, bu çok çeşitli ekosistemler tek kaynaklı homojen ortamlarda bile gelişebilir (Helling ve diğ., 1987; Maharjan ve diğ., 2006). Örneğin glikoz ile sınırlandırılmış, süregelen *E.coli* kültürü 100'üncü jenerasyondan sonra asetat cross-feeding mekanizması geliştirecek şekilde evrimleşmiştir (Treves ve diğ., 1998). Bu çalışmada, bir alt popülasyon glikoz alımındaki verimini arttırarak atık ürün olarak asetat salgılamaya başlamış ve bu olay düşük konsantrasyonlardaki asetatta gelişebilen ikinci suşun evrimleşmesi için bir ortam oluşturmuştur. Matematiksel modeller, bu özelleşme ve yararlı cross-feeding mekanizmalarının oluşma şartları hakkında bir fikir sunmaktadır. Örneğin, primer besin kaynağı veya sekonder besin kaynağı arasında (Doebeli, 2002) ya da popülasyonun büyüme hızı ile verimliliği arasında (Pfeiffer ve Bonhoeffer, 2004) bir trade-off bulunuyorsa, cross-feeding mekanizması gelişebilir. Buna benzer trade-off mekanizmaları dışında türler, enzimatik olarak sindirebileceği tüm besin varlığını metabolize etmesi gerekiyorsa da gelişebilir (Crombach ve Hogeweg, 2009). Ancak, tüm türlerin sahip olduğu enzimleri haritalayabilmek ve ilişkilerini incelemek çok fazla kompleks gözükmektedir.

Bağırsak lümeninde görülen cross-feeding'e müsin degradasyonu örnek verilebilir. Bağırsakta, *Bacteroides* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus torques*, *Ruminococcus gnavus* ve *Bifidobacterium bifidum* gibi türlerin müsinini kullandıkları

belirtilmiştir (Tailford ve diğ., 2015). İnfant bağırsağında görülen ilk bakteri türlerinden olan *Bifidobacterium bifidum*'un test edildiği çalışmada, müsin sindirimi sonucu açığa çıkan laktat ve asetat gibi metabolitlerin diğer Bifidobacteria ya da *Eubacterium hallii* gibi bakterilerin çoğalmasını sağladığı gösterilmiştir (Bunesova ve diğ., 2017). *Eubacterium hallii*, ortamdaki laktat ve asetat gibi molekülleri kullanarak bütirat sentezler (Bunesova ve diğ., 2017). Ancak, farklı substrat bulunan durumlarda, farklı molekülleri kullanma yeteneği de görülür. Örneğin, nişastayı substrat olarak kullanan *Bifidobacterium adolescentis* tarafından üretilen laktat ve asetatı kullanarak bütirat sentezlerken, fruktooligosakkarit ya da inülinin substrat olarak kullanıldığı ortamda *Eubacterium hallii*, Bifidobacterium tarafından salınan monosakkarit ve disakkaritleri kullanarak da bütirat sentezleyebilir (Belenguer ve diğ., 2006; Moens ve diğ., 2017).

Lactobacillus ve Bifidobacteria gibi bağırsakta normal şartlar altında bulunan çoğu bakteriyel probiyotikler, vejetatif hücrelerin liyofilize edilmiş formları olarak üretilirken, Bacillus türleri gibi uzun zamandır toprakta bulunduğu varsayılan bazı mikroorganizmalar da probiyotik olarak kullanılabilir ve genelde spor formunda üretilir (Cutting, 2011). Bakteriyel sporlar dormant halde bulunur ve ısıya, kurumaya, dehidrasyona karşı direnç gösterirken, aynı zamanda çok stabil bir yapıya sahiptir. Bu da probiyotik olarak kullanım için çok uygun özellikleri olduğunu gösterir (Nicholson ve diğ., 2000; Casula ve Cutting, 2002). *Bacillus subtilis*, Bacillaceae familyasının üzerinde en çok çalışılan ve keşfedilmiş türlerinden biridir ve 1990'dan beri probiyotik olarak kullanımı önerilmektedir. 2001 yılında sabun endüstrisinde probiyotik olarak kullanılan bazı *Bacillus subtilis* soyları *Bacillus clausii* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Senesi ve diğ., 2001). *Bacillus clausii* sporları sırasıyla Chloramphenicol, Novobiocin/Rifampicin, Neomycin/Streptomycin ve Tetracycline antibiyotiklerine dayanıklı olan O/C, N/R, SIN ve T soylarından oluşan Enterogermina® adlı probiyotik olarak satışa sunulmuştur (Ciffo, 1984; Mazza ve diğ., 1992). Bütün bu soyların, penisiline dayanıklı tek bir soy olan *B. subtilis* ATCC 9799'dan türediği bilinmesine rağmen, sekretom analizi, ürettikleri proteinlerin ekspresyon seviyelerinde değişimler bulunduğunu göstermiştir (Lippolis ve diğ., 2013). Probiyotiklerdeki intrinsik antibiyotik direncinin, bazı hastalıklarda bağırsağı sağlıklı tutmak açısından antibiyotik-probiyotik kombinasyonu uygulaması esnasında avantaj sağladığı düşünülmüştür (Hammad ve Shimamoto, 2010; Varankovich ve diğ., 2015). Ayrıca, *Bacillus clausii*'nin O/C soyunun *Clostridium difficile* ve

Bacillus cereus tarafından tetiklenen sitotoksik etkileri baskıladığı gösterilmiştir (Ripert ve diğ., 2016).

Probiyotik *Bacillus clausii*, gastrointestinal lümende yol alırken oksidatif stres, osmotik stres, midedeki asidik ortam ve ince bağırsaktaki safra tuzlarından dolayı zorlu ortam şartlarına maruz kalır. Bakteriler asidik ortam ile karşılaştıklarında ATP'yi hidrolize ederek, protonları sitoplazmadan dışarıya pompalayan F₀F₁-ATP sentaz pompası ile H⁺ homeostazı sağlar (Cotter ve Hill, 2003). Bu sentaz kompleksinin *B. clausii* genomunda kodlandığı gösterilmiştir (Khatri ve diğ., 2019).

Probiyotik bakterilerin, safra tuzlarının tetiklediği intrasellüler asidifikasyon ve deterjan etkisi göstererek, biyolojik membran yapısını bozması gibi toksik etkilere karşı dirençli olması gerekmektedir. *B. clausii*'de safra tuzlarına tolerans ile ilgili 2'si ornitin dekarboksilaz ailesine ait, 3'ü sodyum safra tuzu simporter ailesine ait toplam 5 protein tanımlanmıştır (Khatri ve diğ., 2019). Ayrıca, *B. clausii* genel stres adaptasyonu proteinlerini de barındırır. Universal stress protein (UspA) hücrel büyümenin durduğu zamanda, hücrenin hayatta kalması için çok önemli görevler üstlenirken, hücrel stres altında hücreyi savunma ya da kaçma yönünde yeniden programlar (Nachin ve diğ., 2005; Seifart Gomes ve diğ., 2011). Moleküler şaperonların da çevresel strese karşı direnç oluşturabileceği gösterilmiş, bununla ilgili yapılan Pfam domain taramasında, şaperonin GroES ve GroEL, ısı-şok proteini 44, soğuk-şok proteini CspA, Clp proteaz, HtpX ve HrcA-benzeri ısı şok proteinleri gibi proteinlerin bulunduğu gösterilmiştir (Khatri ve diğ., 2019). Bu proteinler büyüme, DNA ve RNA'nın stabilitesi ve inklüzyon cisimciklerinin oluşumunun önlenmesi gibi basit hücrel fonksiyonlarda çok önemli roller üstlenirler (Veinger ve diğ., 1998; Narberhaus, 2002). *B. clausii*, hiperosmotik stres ve ısı direncine karşı şaperon proteini DnaJ ve nükleotit değişim faktörü GrpE ve oksidatif strese karşı direnç için de metiyonin sülfoksit redüktaz A proteini kodlar (Khatri ve diğ., 2019).

Bakteriyosinler, aynı ya da benzer diğer bakteriyel türlerin büyümesini engelleyen, dar spektrumlu antibiyotik olarak işlev göre protein tabiatlı toksinlerdir (Cotter ve diğ., 2006; Heng ve Tagg, 2006). Bakteriyosinler, probiyotiklerin diğer patojen bakterilerin büyümesini sınırlandırarak konağa yararlı etkilerde bulunabilirler. Örneğin, *B. clausii*'de bulunan gallidermin bakteriyosini *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturmalarını efektif şekilde engellediği bilinmektedir (Saising ve diğ., 2012; Khatri ve diğ., 2019). Bu bakteriyosinin aynı

zamanda, *Propionibacteria*, *Staphylococci*, ve *Streptococci* türlerinin hedef olduğu akne, egzama, folikülit ve impetigo gibi deri hastalıklarında efektif olduğu belirtilmiştir (Field ve diğ., 2015). Diğer *Bacillus* türlerinde ve *B. clausii*'de de bulunan sporulasyon-öldürücü faktör skfA bakteriyosini ise sporulasyon evresine girmeyen kendi türündeki bakterilerin lizisine yol açmaktadır. Bu davranış, sporulasyon evresine giren hücrelere besin kaynağı sağlayarak onları destekler, aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda diğer hücrelere de etki ettiği belirtilmiştir (Liu ve diğ., 2010; González-Pastor ve diğ., 2003; Lin ve diğ., 2001).

Tüm bu bilgiler ışığında *Bacillus clausii* sporlarının insan bağırsağında yaşam süresi üzerine yapılan çalışmada, *Bacillus clausii* sporlarının bağırsak lümeninde ilerlerken hayatta kaldığı, ince ve kalın bağırsakta vejetatif forma geçebildiği ve tek doz uygulamada dahi 12 güne kadar dışkıda izole edilebildiği gösterilmiştir (Ghelardi ve diğ., 2015). Bu çalışma ve yukarıdaki literatür taraması göz önünde bulundurularak, *Bacillus clausii* sporlarının probiyotik olarak kullanılması için gereken özellikleri sağlamakta olduğu üzerinde fikir birliği oluşmuştur.

Bacillus clausii'nin *Clostridium difficile* enfeksiyonunun hafifletilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. *In vitro* yapılan çalışmada, *Bacillus clausii* O/C'nin bu patojenin majör virülans faktörü olan *Clostridium difficile* toksinlerini nötralize ederek, memeli hücrelerinin kaybını önleyebildiği gösterilmiştir (Ripert ve diğ., 2016). Bunun, serin proteaz ve M-proteaz üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Saf haldeki M-proteazların, Vera hücre soyunu *Clostridium difficile* kültürü süpernatantlarının sitotoksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (Ripert ve diğ., 2016).

Post menapoz döneminde osteoporoz ile ilgili yapılan bir çalışmada *Bacillus clausii*'nin immünomodülatör etkisi üzerinden kemiklerdeki erimeyi azalttığı tespit edilmiştir (Dar ve diğ., 2018). Altı haftalık probiyotik uygulamasından sonra ovariektomi uygulanan farelerde *Bacillus clausii*, T hücreleri oranı üzerinde etkili olmuş, pro-inflamatuvar sitokinler ile ilişkili olan Th17 hücrelerinin sayısı kontrole göre azalmış, anti-inflamatuvar sitokinler ile ilişkili olan Treg hücrelerinde artışa yol açmıştır (Dar ve diğ., 2018). Aynı zamanda IL-6, IL-17, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerde düşüşe yol açarken, IL-10 ve interferon- γ (IFN- γ) gibi anti-inflamatuvar sitokinlerde yükseliş gözlemlenmiştir (Dar ve diğ., 2018).

Bacillus clausii uygulamasının immün düzenleyici etkileri, bir diğer çalışma olan alerjik çocuklarda nazal sıvılarda yapılan sitokin ölçümü ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, 4 haftalık

Bacillus clausii uygulamasının, nazal sıvılardan alınan örneklerde IFN- γ , IL-12, tümör büyüme faktörü- β (TGF- β) ve IL-10 sitokinlerinde belirgin bir artışa, IL-4 seviyesinde ise belirgin bir düşüşe yol açtığı gözlemlenmiştir (Ciprandi ve diğ., 2004).

Probiyotiklerin aynı zamanda, kronik böbrek hasarında plazma üre seviyelerini düşürebildiği ve oksitadatif stresi azaltabildiği de gösterilmiştir. Fareler üzerinde gerçekleştirilen üremi modelinde, 15 günlük *Bacillus clausii* uygulaması, artan üre seviyelerinden dolayı bozulan oksidan dengesinin yeniden sağlanmasına katkıda bulunmuştur (Patel ve diğ., 2020). Böbrek dokusunda antioksidan olan GSH (glutatyon), süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin miktarı belirgin bir şekilde artmış, lipid peroksidasyonunu gösteren malonadialdehit seviyeleri azalmıştır (Patel ve diğ., 2020). Bunların yanı sıra, *Bacillus clausii* gelişmekte olan ülkelerde sıklıkla görülen ve ciddi patolojik sonuçlara yol açabilen diyareye karşı da koruyucu etki sağlamaktadır. 10 gün boyunca *Bacillus clausii* uygulanan çocuklarda, diyarenin belirgin ölçüde düzeldiği gözlemlenmiştir (Sudha ve diğ., 2013). Semptomların ağırlığı azalmış ve diyare süresi gün içinde ortalama 34 dakikadan 9 dakikaya kadar düşmüştür (Sudha ve diğ., 2013). Bu tedavi amaçlı uygulamanın yanında, ölçülen yan etkilerden herhangi biri gözlemlenmemiştir.

Probiyotik *Bacillus clausii* uygulaması ile değişen gen ekspresyonunun belirlendiği bir çalışmada inflamasyon, immün cevap, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, intestinal geçirgenlik, hücre adezyonu, hücre-hücre sinyalizasyonu, apoptoz, sinyal transkripsiyonu ve transdüksiyonu ile ilgili genler etkilenmiştir (Di Caro ve diğ., 2005). Örneğin, ince bağısak kriptlerinin potansiyel patojenlere karşı savunmasında çok önemli rolü olan defensin 126 beta, probiyotik uygulamasından sonra artmıştır (O' Neil, 2003; Di Caro ve diğ., 2005). Crohn hastalığında indüklenebilen defensin 126 beta gibi beta-defensinlerin kaybı hastalığın dikkat çekici özelliklerinden biridir (Wehkamp ve diğ., 2003). Aktivitesi artan bir diğer gen ise lökosiyalindir (Di Caro ve diğ., 2005). Lökosiyalin bir sialoglikoprotein olup, insan T lenfositleri, monositler, granülositler ve bazı B lenfositlerinin yüzeylerinde eksprese edilir. Lökosiyalinlerin T-hücresi aktivasyonunda fizyolojik ligand-reseptör kompleksinin bir parçası olabileceği düşünülmektedir (Onami ve diğ., 2002). Bunların yanı sıra, TGF- β süperaillesinden bazı faktörler dahil olmak üzere, IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin de gen ekspresyonunu arttırmıştır (Di Caro ve diğ., 2005). Tüm bu faktörlerin hücrelerde proliferasyonu uyarak mitojen aktiviteye sebebiyet verdiği, böylece bağırsakta yara

iyileşmesine yardımcı olabileceği düşünülmüştür (Itoh ve Kataoka, 2002; Arthur ve diğ., 2003; Di Caro ve diğ., 2005).

Diyet kaynaklı endotoksin artışının önlenmesi üzerine insanlarda yürütülen çalışmada, *Bacillus clausii*'nin de içerisinde bulunduğu *Bacillus* türlerinden oluşan probiyotik kokteyli post-prandial endotoksin ve trigliserit oranını düşürmüş, inflamatuvar biyobelirteçlerin de önemli ölçüde azalmasını sağlamış ya da düşüş eğilimine sokmuştur (McFarlin ve diğ., 2017). Bu çalışma yalnızca sistemik verilerin ölçümü ile yürütülmüş olup, bu düşüşün bozulmuş mikrobiyotanın iyileştirilmesi veya bağırsak geçirgenliğinin azaltılması ya da bu iki etkinin aynı anda gerçekleşmesi ile oluşabileceğini düşündürmüştür.

Tüm olumlu sonuçlar gösteren çalışmaların yanı sıra, bazı çalışmalarda *Bacillus clausii* uygulaması etki göstermemiştir. BALB/c ve C57BL/6 ırkı farelerde yapılan *Salmonella enterica* serovar typhimurium ile indüklenen diyare ve enfeksiyonda *Bacillus clausii* uygulaması mikrobiyotanın daha çok bozulmasına yol açmış, ancak tek başına *Bacillus clausii* uygulaması ile bir değişiklik gözlemlenmemiş ve bu da *Salmonella enterica* ile *Bacillus clausii*'nin birbirlerine sinerjistik etkileri olabileceğini düşündürmüştür (Pradhan ve diğ., 2019). Aynı çalışmada Hdac1, Hdac3, Hdac6, Hdac7, Hdac8 ve Hdac9 gibi histon deasetilazlar *Bacillus clausii* tarafından aktive edilmiş, bu da inflamasyonu arttırmış ve immün hücre filtrasyonunu yükseltmiştir (Pradhan ve diğ., 2019). Aynı zamanda erken doğum gerçekleştirilen bebeklerde düşük doğum kilosu, prematüre olması ve yoğun bakım ünitesinde bakımdan dolayı sepsis gelişebilir ve mikrobiyota yoğun bakım ünitesinin ortamına göre şekillenebilir (Zaidi ve diğ., 2005). Bu durumda, patojenlerde artış görülür ve kullanılan antibiyotikler ve diğer ilaçlarla birlikte mikrobiyal çeşitliliğin azalması kaçınılmazdır (Mshvildadze ve diğ., 2010). Böylece probiyotik kullanımı mikrobiyotayı iyileştirebilirken, aynı zamanda sepsis oluşumuna yol açabilir. Bu konu hakkında literatürde çeşitli çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (Deshpande ve diğ., 2010; Joshi ve diğ., 2019).

Endotoksemi, gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS gibi endotoksinlerin kandaki varlığına denir. Endotoksinden dolayı immün cevap normalin çok üzerine çıkar, cevap çok yüksek ise septik şok ve sepsis gelişebilir (Opal, 2010). Endotokseminin genel özellikleri; yüksek ateş, bütün vücutta özellikle enfekte dokularda belirgin damar genişlemesi, kalp debisi yüksekliği, kan akışkanlığının azalması, doku hasarı sonucu oluşan alyuvarların aglütinasyonu ve vücudun pek çok bölgesinde mikro pıhtıların oluşmasıdır (Guyton ve Hall,

2007). LPS, özellikle pro-inflamatuvar sitokinler, eikosanoidler ve NO salgılanmasını artıran monositler, dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri üzerinde etkilidir (Abbas, 2006). LPS'nin yol açtığı endotoksemi tablosunda immün cevap olarak pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar mekanizmaların aktivasyonu, özellikle monositler ile makrofajlarda TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve sonrasında diğer IL'ler, araşidonik asit metabolitleri, serbest radikaller, NO ve reaktif oksijen türleri (ROT) gibi aktif biyolojik aracı moleküllerin salınımı, hipoksi gibi hümoral ve hücrel reaksiyonlar nedeniyle dolaşım bozukluğu, organlarda fonksiyon bozukluğu ve çoklu organ bozukluğu gibi birçok fizyolojik değişik meydana gelir (Castellheim ve diğ., 2009). LPS molekülü yapısal olarak lipit A, oligosakkarit merkez ve O-antijeni olarak 3 parçaya ayrılabilir. Lipit A, LPS'nin endotoksik etkilerinden sorumlu olan bölgesi olarak bilinmektedir (Raetz ve Whitfield, 2002).

İmmün sistem, patojenlerin istilasına karşı bir koruyucu olarak rol oynar ve doğuştan var olan makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler ile T ve B lenfositlerinden oluşur. Toll-like (Toll-benzeri) reseptörleri (TLR), bakterilerin LPS, lipoteikoik asit gibi korunmuş moleküler ürünlerini tanıyan bir yapıya sahiptir. TLR-4 ve TLR-2'nin bu bakteriyel moleküller ile uyarılması, bir dizi hücrel yolağı aktive ederek inflamasyon başlatabilir ve membran permeabilitesini değiştirebilir (Takeda ve diğ., 2003; Cario ve diğ., 2007). Doğuştan var olan bağışıklık sistemi, yabancı maddelerin tanınması üzerine aktive olup hafıza oluşturmak için adaptif bağışıklık başlatır. Bununla birlikte, enfeksiyonu gidermek için sitokinler, kemokinler ve antimikrobiyal peptitler meydana getirir (Mills ve O'Neill, 2014).

İnsanlar, diğer hayvanlara göre endotoksinlere daha duyarlıdır. Örneğin 1 $\mu\text{g/kg}$ LPS uygulaması, insanda şok başlatmaya yeterli iken, farelerde bu miktar bin katına çıkabilmektedir (Warren ve diğ., 2010). Endotoksemi üzerine yapılan çalışmalarda, endotoksemi esnasında bağırsakta genellikle *Clostridia spp.* ve *Enterococcae spp.* gibi patojenik ve antibiyotik dirençli tek bir bakteri türünün baskın hale geldiği gözlemlenmiştir (Zaborin ve diğ., 2014). Dahası, bağırsaktaki kilit bakteri türleri, endotoksemi esnasında varlığını yitirmeye başlar (Zaborin ve diğ., 2014; Ojima ve diğ., 2016). Bunlardan bazıları, SCFA gibi insan fizyolojisine yararlı etkileri olan metabolitleri ürettiği bilinen *Faecalibacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Blautia spp.*, ve *Ruminococcaceae spp.*'dir (Rajilic-Stojanovic ve de Vos, 2014). Aynı zamanda, ileri derecede bir gram negatif bakteri enfeksiyonunda, bağırsak motilitesinde ciddi aksaklıklar meydana gelir (Khan ve Collins,

2006; De Winter ve De Man, 2010). Hayvan modellerinde LPS'ye bağılı endotokseminin, bağırsak düz kas hücrelerinin kasılmasını engellediğı (Cullen ve diğ., 1999) ve bu mekanizmanın da endotoksemi sırasında aktif hale geçen makrofajlardan salınan prostaglandinler, hidrojen peroksit (H_2O_2), sitokinler ve NO gibi düz kasların kinetik yapısını değıştiren moleküllerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Guarino ve diğ., 2013). Bağırsak mikrobiyotası, LPS ve peptidoglikan gibi, vücudun periferik dokularında inflamasyona sebebiyet verebilen moleküller açısından zengindir (Tremaroli ve Bäckhed, 2012). Karaciğer yağlanması hakkında yapılan bir çalışmada, metabolik sendrom görülen hastalarda bağırsak epiteli geçirgenliği ciddi şekilde artmış, dolayısıyla portal ve periferik dolaşımda lipopolisakkarit miktarı da yükselmiştir (Brun ve diğ., 2007).

Bağırsak epiteli, besinlerin absorpsiyonu dışında vücudu besinler ile alınan sistemik patojenlere karşı korur. Bağırsak epiteli, tek katlı silindirik türde olup, bağırsak lümenini lamina propreadan ayırır (van der Flier ve Clevers, 2009). Bağırsak epitelinin sıkı bağlantıları iyon, besinler ve suyun geçişini düzenlemede en önemli görevi üstlenir. Sıkı bağlantılar iki epitel hücresi arasında seçici geçirgen bir engel oluşturan, apikal ve bazolateral membran alanları arasındaki sınırı belirleyen unsurlardır (Turner, 2006). Sıkı bağlantılar birbirinden bağımsız olarak davranan, hücreleri birbirine mühürleme görevi gören iplikçiklerin dallanmış ağlarından oluşur (Förster, 2008). Şimdiye kadar okludin (Furuse ve diğ., 1993), klaudin (Furuse ve diğ., 1998), JAM (Junctional Adhesion Molecule) (Martín-Padura ve diğ., 1998) ve triselülin (Ikenouchi ve diğ., 2005) olmak üzere dört transmembran protein, bu iplikçikleri oluşturan integral protein ailesi olarak tanımlanmıştır. Okludin, 65-kDA molekül ağırlığına sahiptir ve OCLN geni tarafından kodlanır (Förster, 2008). Bu transmembran proteinlerin intrasellüler bölgeleri, transmembran proteinleri aktin gibi hücre iskeletine sabitleyen zonula okludens (ZO) gibi sitosolik iskelet molekülleri ile iletişim halindedir (Lee, 2015). Hücre içindeki aktin kasılması veya gerilmesi, bağlantı proteinlerinin genişleyip daralmasında önemli rol oynar (Turner ve diğ., 1997).

Transsellüler ve parasellüler geçişler; membranda bulunan hücresel pompalar, iyon kanalları ve sıkı bağlantılar ile düzenli bir şekilde kontrol edilir. Özellikle bakteriyel translokasyon veya epitelin uzaması ile hasar görebilen sıkı bağlantı bölgeleri dolayısıyla, bu bakteriler ile T-hücrelerinin etkileşimi gibi herhangi bir düzeyde bozulma, inflamasyona ve doku hasarına neden olabilir (Baumgart ve Dignass, 2002).

Bağırsak bariyerindeki bozukluklar ve artan geçirgenlik, inflamatuvar bağırsak hastalığı, huzursuz bağırsak sendromu, alkolik karaciğer hastalığı, steatohepatitis, karaciğer sirozu, pankreatitis, tip 1 ve tip 2 diyabet, obezite, depresyon gibi birçok hastalık ve sendromda sıklıkla görülmektedir. Geçirgen bağırsaktan dolayı, bağırsak bariyeri tarafından indüklenen düşük seviyeli inflamasyon, mikrobiyal ürünler ile pek çok farklı organda hasarlara sebep olabilir (Valentini ve diğ., 2014).

İnflamatuvar bağırsak hastalığında, dikey sıkı bağlantı iplikçiklerinin sayısının azalması, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun değişimi ve kolonik epiteldeki sellüler prion proteinin ekspresyonunun azalması ile subsellüler dağılımının değişmesi gibi epitel sıkı bağlantılarındaki değişimler, bağırsak geçirgenliğinin arttığını göstermektedir (Petit ve diğ., 2012). Tüm bu değişimler, inflamasyon esnasında çok fazla eksprese edilen TNF- α , IFN- γ , IL-1 β ve IL-13 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin artmış aktivitesinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Bischoff ve diğ., 2014). Aynı zamanda, bu hastaların çoğunda sistemik endotoksemi görüldüğü bildirilmiştir (Pastor Rojo ve diğ., 2007). Serum endotoksin, lipopolisakkarit-bağlayıcı protein ve çözünebilen CD14 seviyeleri ile pro-inflamatuvar sitokinlerin hastalık aktivitesi ile paralel bir şekilde arttığı görülmüş, inflamatuvar bağırsak hastalığında bakteriyel ürünlerin katkısını gösterme açısından aydınlatıcı bir sonuç alınmıştır (Pastor Rojo ve diğ., 2007).

Karaciğer, endotoksin, peptidoglikan, lipopeptidler ve bakteriyel DNA gibi mikrobiyal ürünlerin de bulunduğu portal kanı alır ve bu ürünlerin filtrasyon ve detoksifikasyonun başlangıç bölgesi olarak görülür (Fukui, 2015). Alkolün bağırsak epitel bütünlüğüne hasar vererek, endotoksin gibi bakteriyel ürünlerin ya da bakterilerin kendilerinin tranlokasyonu sonucunu doğuran etkilere sahip olduğu uzun süreden beri bilinmektedir (Keshavarzian ve diğ., 1994). Alkolik karaciğer hastalığında, endotoksinler kritik rol oynar. Bağırsak kökenli endotoksinlerin en önemli etkisi, hepatik Kuppfer hücrelerinden pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımını uyarmasıdır (McClain ve diğ., 1998).

Depresyonda, endotoksinlerin ve pro-inflamatuvar moleküllerin uyarması ile aktive olan inflamatuvar cevap sisteminin etkinliği ile hastalığın seyri arasındaki korelasyon son yıllarda belirgin bir biçimde ortaya konmuştur (Maes ve diğ., 2008). Gram-negatif Enterobacteria türlerine karşı üretilen serum IgM ve IgA seviyeleri, depresif hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Berk ve diğ. 2013).

Farelerde yapılan çalışmalarda, su veya yağın oral yolla verilmesi, yağın alımının kan sirkülasyonuna nasıl geçtiği ile ilgili fikirler oluşmasını sağlamıştır. LPS seviyeleri sadece yağ alımında artmış, yağ oranının yüksekliğine oranla kandaki LPS seviyesi de yükselmiştir (Cani ve diğ., 2007). Sağlıklı kişilerde de benzer şekilde yüksek yağlı yiyecekler, postprandial LPS miktarını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseltmiştir (Erridge ve diğ., 2007; Laugerette ve diğ., 2011). Bu olayın LPS'nin suda çözünemeyen bölgesi olan lipit A'nın, şilomikronlar tarafından miseller oluşturarak, sonrasında absorbe edilerek kana geçmesinden kaynakladığı düşünülmektedir (Vreugdenhil ve diğ., 2003; Ghoshal ve diğ., 2009). Bu fikirden hareketle, obezite ile bağırsak epiteli ve endotoksemi arasında ilişki kurmak mümkündür. Bir diğer çalışmada, obez farelerde bağırsak geçirgenliğinin arttığı gösterilmiştir (Cani ve diğ., 2008). Bu artışın, diyet yağlarının intestinal mukozadaki mast hücrelerini uyarak, bağırsak geçirgenliğini indirekt olarak etkileyebilmesi ile gerçekleşebildiği düşünülmektedir (Ji ve diğ., 2011).

Tüm bu bilgilerin ışığında, endotoksemik durumlarda *Bacillus clausii* sporlarından oluşan probiyotik ve inülin grubu prebiyotiklerin kullanım alanları ile ilgili literatür çok yaygın olmamakla beraber, inflamasyon belirteçlerinde çoğunlukla düşüşe yol açmaları, bağırsak mukozasına olan yararlı etkileri ve bağırsak mikrobiyotasını düzenleme yetenekleri ile bu iki uygulamanın da yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma, LPS uygulaması ile oluşturulan endotoksemik sıçan modelinde, bağırsak yapısındaki değişimlerin tayin edilmesi, endotokseminin bağırsaktaki yıkıcı etkilerinin belirlenmesi ve inülin grubu prebiyotik ile *Bacillus clausii* sporlarından oluşan probiyotiklerin bağırsak geçirgenliği üzerine etkilerinin gerek endotoksemi sürecinde gerekse bu sürecin öncesinde koruyucu olup olmadığının ortaya konulması ve bu iki uygulamanın etkilerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, çalışmamızda bağırsak yapısının tayini, bağırsak geçirgenliğinin belirlenmesi ve inflamatuvar süreçlerin gösterilmesi amacıyla histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖN ÇALIŞMALAR

Tezin ön denemesi olarak yapılan çalışmalarda, 5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma) 2,5 mg/kg bir doz 0,5 ml fizyolojik tuzlu su (FTS)'da çözündürülerek, 24 saat önce intraperitonel (ip) olarak, 2,5 mg/kg bir doz da operasyondan 3 saat önce 0,5 ml FTS'de çözündürülerek ip olarak verildi. Yapılan bu ön çalışmada, literatüre dayanarak sıçanlarda endotoksemi oluşturulması hedeflendi. Ancak, ilk enjeksiyondan sonra ikinci enjeksiyon yapılamadan tüm hayvanlarda ölüm gözlemlendi. LPS dozunun istenilenden yüksek olduğu düşünülerek, dozun düşürülmesi ile ikinci ve üçüncü bir deneme yapıldı.

İstenilen deney modelinin oluşturulması amacıyla doz denemesi yoluna gidilerek, 2,5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma) bir doz, 24 saat önce ip olarak uygulandı. Bu denemenin sonunda da tüm hayvanlar öldü. Ardından, 1,5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma) bir doz, 24 saat önce ip olarak uygulandı ve böylece endotoksemi modelininin oluşması sağlandı.

3.2. DENEY DÜZENEGİ

Çalışmada deney hayvanı olarak, 3 aylık 39 adet erkek Wistar Albino sıçan (250-300 g) kullanıldı. Deney süresince hayvanların standart kafeslerde, standart pelet yem ve musluk suyu ile beslenmeleri sağlandı. Hayvanlara yapılan günlük uygulamalar aynı saatte yapıldı. Çalışmanın Etik Kurul onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan, 30.05.2019 tarihinde (Karar No: 23) alındı ve hayvanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Çalışmada kullanılan hayvanlar, rastgele olacak şekilde 6 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (n=6): 21 gün boyunca 1,25 ml içme suyu, gavaj yoluyla verildikten sonra, 0,5 ml FTS (fizyolojik tuzlu su)'in ip olarak enjekte edildiği grup.

2. Prebiyotik Grubu (n=6): 21 gün boyunca 500 mg/kg inülin, 1,25 ml FTS'de çözündürülerek gavaj yoluyla verildikten sonra 0,5 ml FTS'nin ip olarak verilmesiyle oluşturulan grup.

3. Probiyotik Grubu (n=8): 21 gün boyunca *Bacillus clausii* (1,25 ml, 1.109 cfu) sporları bulunan probiyotik içeriği, gavaj yoluyla verildikten sonra 0,5 ml FTS'nin ip olarak verilmesiyle oluşturulan grup.

4. LPS Grubu (n=7): 21 gün boyunca 1,25 ml içme suyu, gavaj yoluyla verildikten sonra, 1,5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma) tek doz olacak şekilde ip olarak uygulanarak, endotoksemi oluşturulan grup.

5. LPS+Prebiyotik Grubu (n=6): 21 gün boyunca 500 mg/kg inülin, 1,25 ml FTS'de çözündürülerek gavaj yoluyla verildikten sonra, 1,5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma)'nin tek doz olacak şekilde ip uygulaması ile endotoksemi oluşturulan grup.

6. LPS+ Probiyotik Grubu (n=6): 21 gün boyunca *Bacillus clausii* (1,25 ml, 1.109 cfu) sporları bulunan probiyotik içeriği, gavaj yoluyla verildikten sonra 1,5 mg/kg LPS (*E. coli*, Serotip 0111: B4, Sigma)'nin tek doz olacak şekilde ip uygulaması ile endotoksemi oluşturulan grup.

Deney sonunda, intraperitoneal enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlara 50 mg/kg ketamin, 5 mg/kg ksilazin anestezisi uygulandı. Işık mikroskobu analizleri için hayvanların ince bağırsak ve kalın bağırsaklarından örnekler alındı.

3.3. IŞIK MİKROSKOBU ÇALIŞMALARI

3.3.1. HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR

Işık mikroskobu için yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarından alınan ince bağırsak ve kalın bağırsak dokuları küçük parçalara bölündü. Bağırsak örnekleri %10'luk nötral tamponlu formaldehitte tespit edildikten sonra %70 alkole alınıp, alkol birkaç defa değiştirilerek fiksatif uzaklaştırıldı. Daha sonra, yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırılan parçalar, parafine (58°C'lik) gömüldü. Parafin bloklardan 5-µm kalınlığında alınan kesitlere, yapıdaki histolojik değişikliklerin incelenmesi ve glikokaliksin gösterilmesi için Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Hematoksilin + PAS (H+PAS) boyama yöntemi uygulandı. Kesitler ışık

mikroskobunda incelendi ve Kameram 390 CU (Mikrosistem Ltd. Türkiye) sistemi aracılığı fotoğrafları çekildi. Histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi için skorlama yapıldı. Histolojik hasar skoru değerlendirmesinde; çizgili kenarda devamsızlık, bazal membran hasarı, villus bütünlüğünde bozulma, epitel bütünlüğünün bozulması, villusların lamina propreasında ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve epitel ile bazal membranın bağlantısının kopması gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak, her bir histolojik değişken, 0 (hasar yok), 1 (az hasar), 2 (orta derecede hasar) ve 3 (maksimum hasar) arasında puanlandı.

3.3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37°C'de tutulduktan sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde mikrodalgada 10 dakika tutularak antijen iyileştirilmesi yapılan kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda %3'lük hidrojen peroksit'de endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 15 dakika tutulduktan sonra, distile suyla çalkalanıp tuzlu fosfat tamponu (PBS)'na (pH 7.2) alındı. Daha sonra, oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V Blok (Thermo Fisher Scientific, TA-125-UB) uygulandı. Kesitlere, hücrelerarası bağlantıları göstermek için Okludin (Rabbit polyclonal to Occludin, Thermo Fisher, 404700), lökosit dağılımını göstermek için miyeloperoksidaz (MPO) (Rabbit polyclonal to myeloperoxidase, Thermo Fisher, PA5-16672) antikorunun uygulaması yapıldı. Antikorlar, UltrAb Diluent (Thermo Fisher Scientific, TA-125-UD)'de okludin için 1:100, MPO için 1:75 oranında sulandırıldı. Kesitler, 3 kez 5'er dakika PBS'de yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikor (Thermo Fisher Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildi. Daha sonra kesitler PBS'de yıkandı ve peroksidaz ile işaretli streptavidin (Thermo Fisher Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için 5 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Thermo Fisher Scientific, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkanarak, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve gliserol jelatin ile kapatıldı. Dokudaki reaksiyonların dağılımı ışık mikroskobu ile incelendi ve reaksiyonlar her grubun bireylerinden 40x büyütmede ve 20 alanda yoğunluğa ve dağılıma göre derecelendirildi. Yoğunluğuna göre: 0 (boyanmamış), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun) şeklinde skorlandı. Ayrıca, bu reaksiyonlarının görüntü alanındaki dağılımları 100 üzerinden

değerlendirildi. Her bir grup için HSCORE değeri = $P_i (i+1)$ formülü kullanılarak belirlendi. “i” yoğunluk skoru, “Pi” alandaki boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir. Kesitlerin fotoğrafları Kameram 390 CU (Mikrosistem Ltd. Türkiye) ile çekildi.

3.4. İSTATİKSEL ANALİZ

Elde edilen veriler, GraphPad İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software, San Diego, CA, USA.) aracılığı ile analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Grupların dağılımının, normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben histolojik ve immünohistokimyasal veriler tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey’in çoklu karşılaştırma testi (Tukey’s Multiple Comparison Test) ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

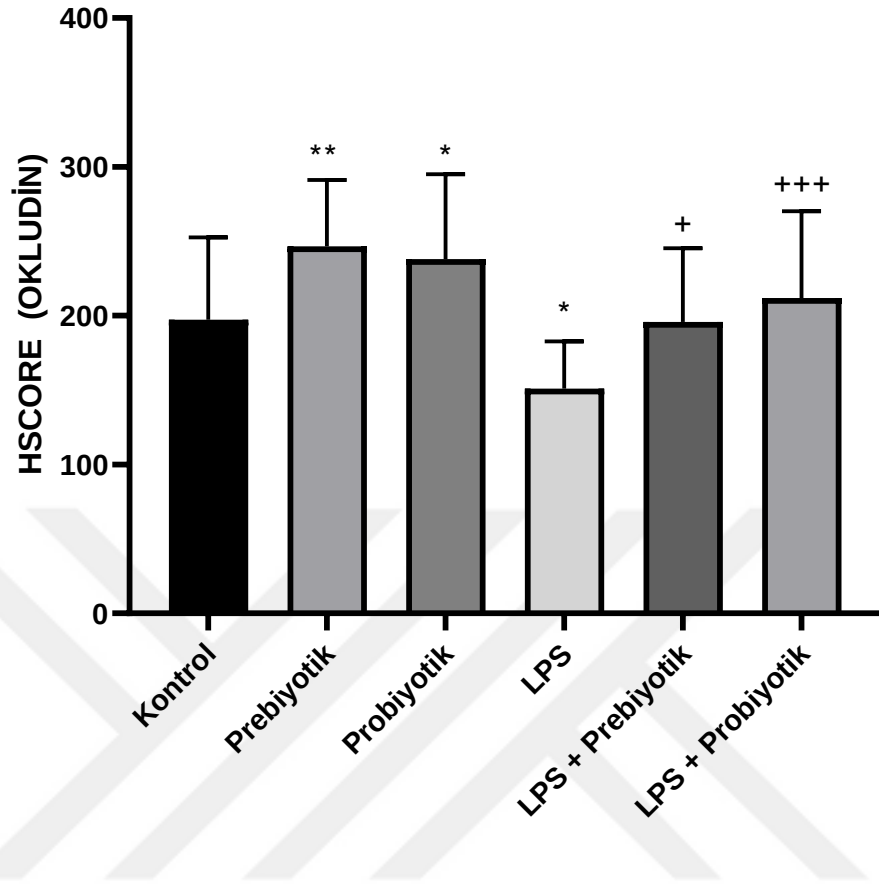
Deney hayvanlarından alınan ince bağırsak kesitlerinde immünohistokimyasal olarak okludin reaksiyonunun dağılımına ve yoğunluğuna bakıldı. Kesitlerde okludin reaksiyonuna HSCORE uygulanarak bakıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi (Şekil 4.1.1).

Deney gruplarının ince bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu değerlendirildiğinde, antikor uygulanmayan negatif kontrollere göre (Şekil 4.1.2) kontrol grubunda okludin reaksiyonunun epitel tabakası hücrelerinde olduğu görüldü (Şekil 4.1.3).

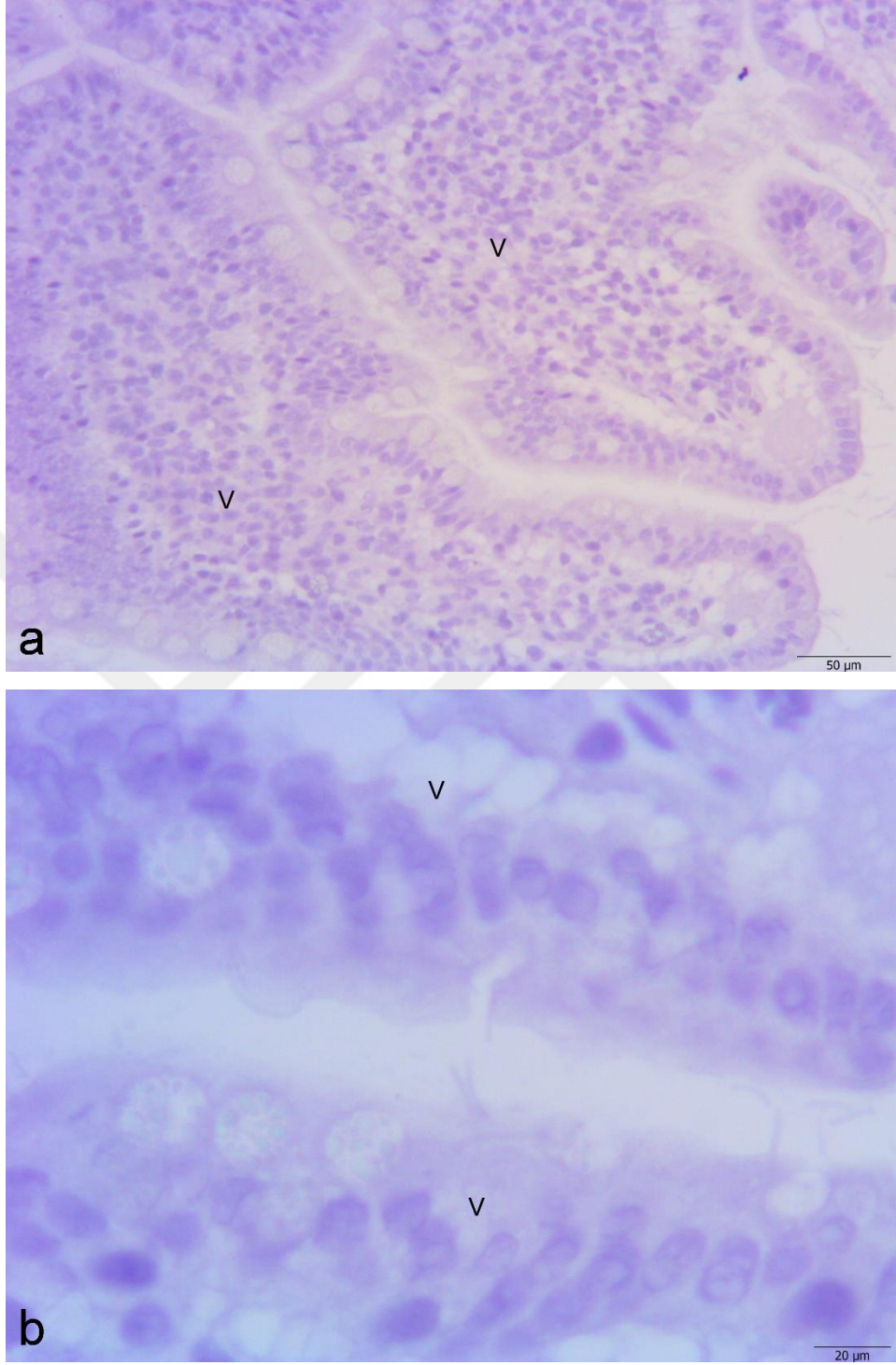
Prebiyotik ve probiyotik uygulanan gruplarda okludin reaksiyonuna epitel hücrelerinde rastlandı. Bazı bireylerde bağırsak lümenine bakan epitel hücrelerinin daha yoğun reaksiyon verdiği gözlemlenirken, bazı bireylerde ise kriptleri oluşturan hücrelerin daha yoğun boyandığı görüldü (Şekil 4.1.4, 4.1.5). Prebiyotik ($p<0,01$) ve probiyotik ($p<0,05$) gruplarında okludin reaksiyonu değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre reaksiyonunun arttığı belirlendi.

LPS enjeksiyonu yapılan grupta okludin reaksiyonunun epitel hücrelerinde bulunduğu ve reaksiyonun kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 4.1.1, 4.1.6)

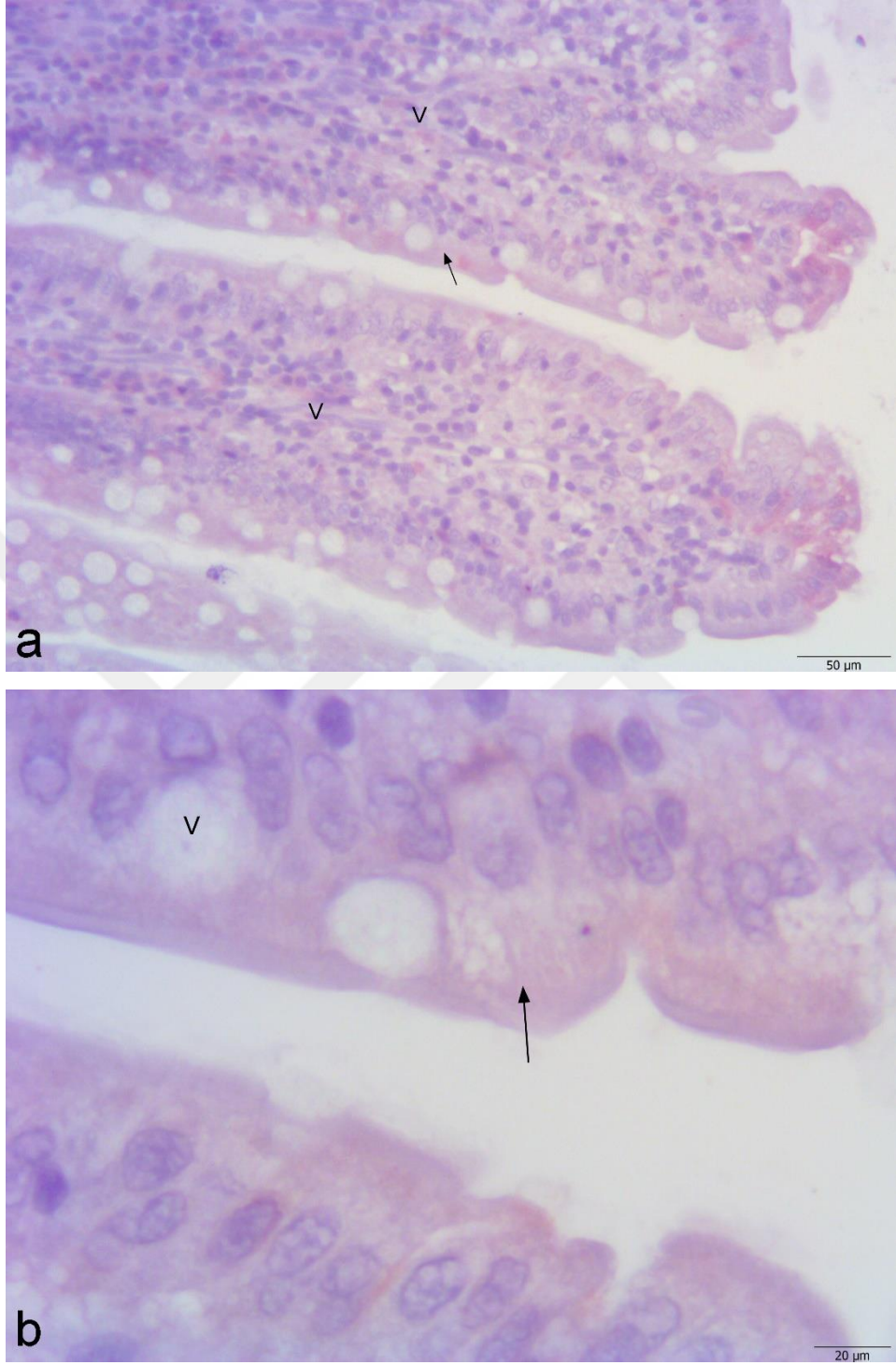
LPS + Prebiyotik ($p<0,05$) ve LPS + Probiyotik ($p<0,005$) grubunda okludin reaksiyonunun LPS grubuna göre arttığı belirlendi (Şekil 4.1.1). LPS ve Prebiyotik uygulanan grupta okludin reaksiyonu epitel hücrelerinde görüldü. Epitel tabakasında bazı bölgelerde reaksiyonun daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 4.1.7). LPS ve probiyotik uygulanan grupta okludin reaksiyonu epitel hücrelerinde tespit edildi. Epitel tabakasında okludin reaksiyonunun bazı bölgelerde daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 4.1.8).



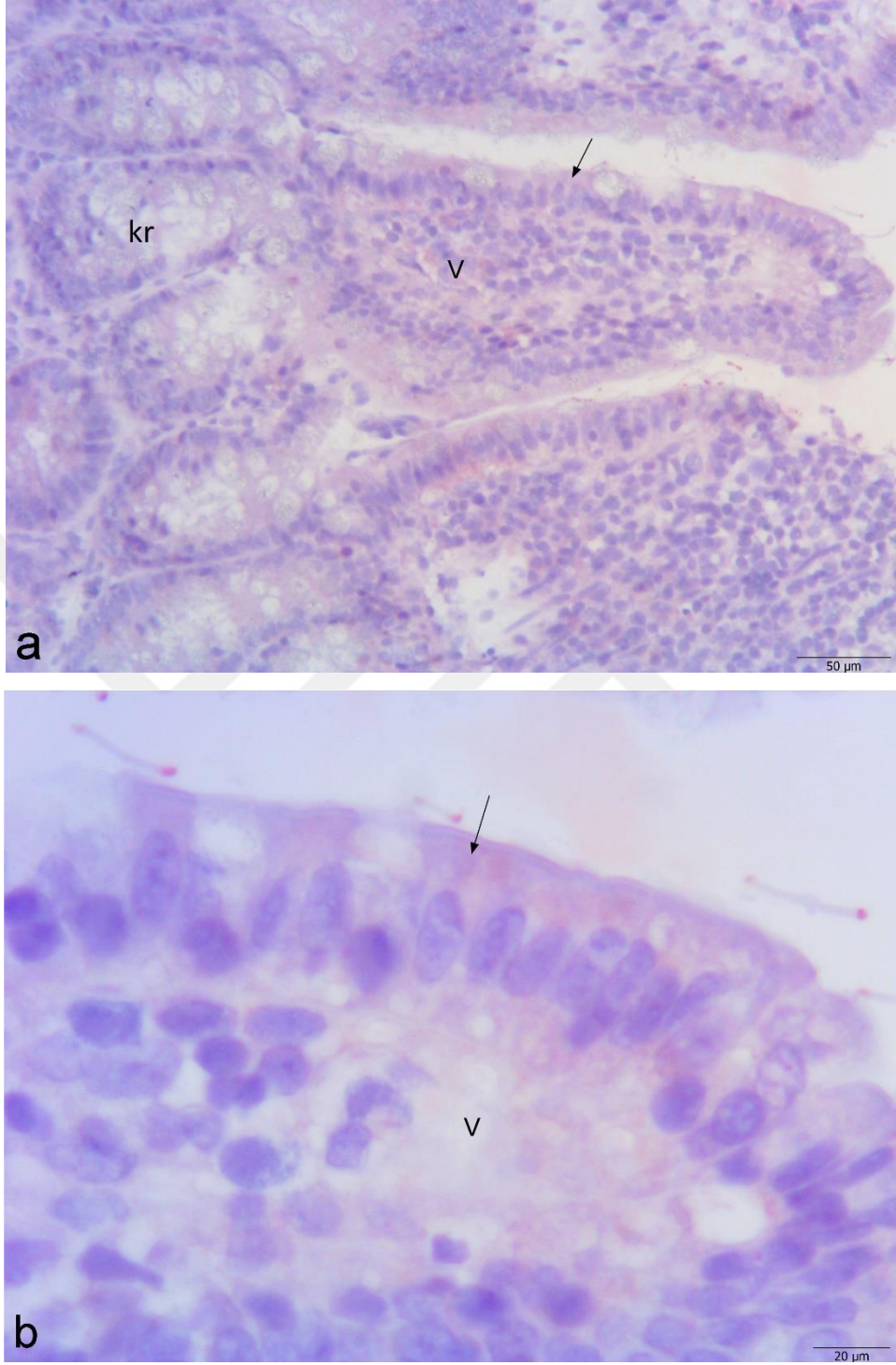
Şekil 4.1.1: Deney gruplarına ait hayvanların ince bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu (HSCORE). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: Kontrol grubuna göre; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,005$: LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



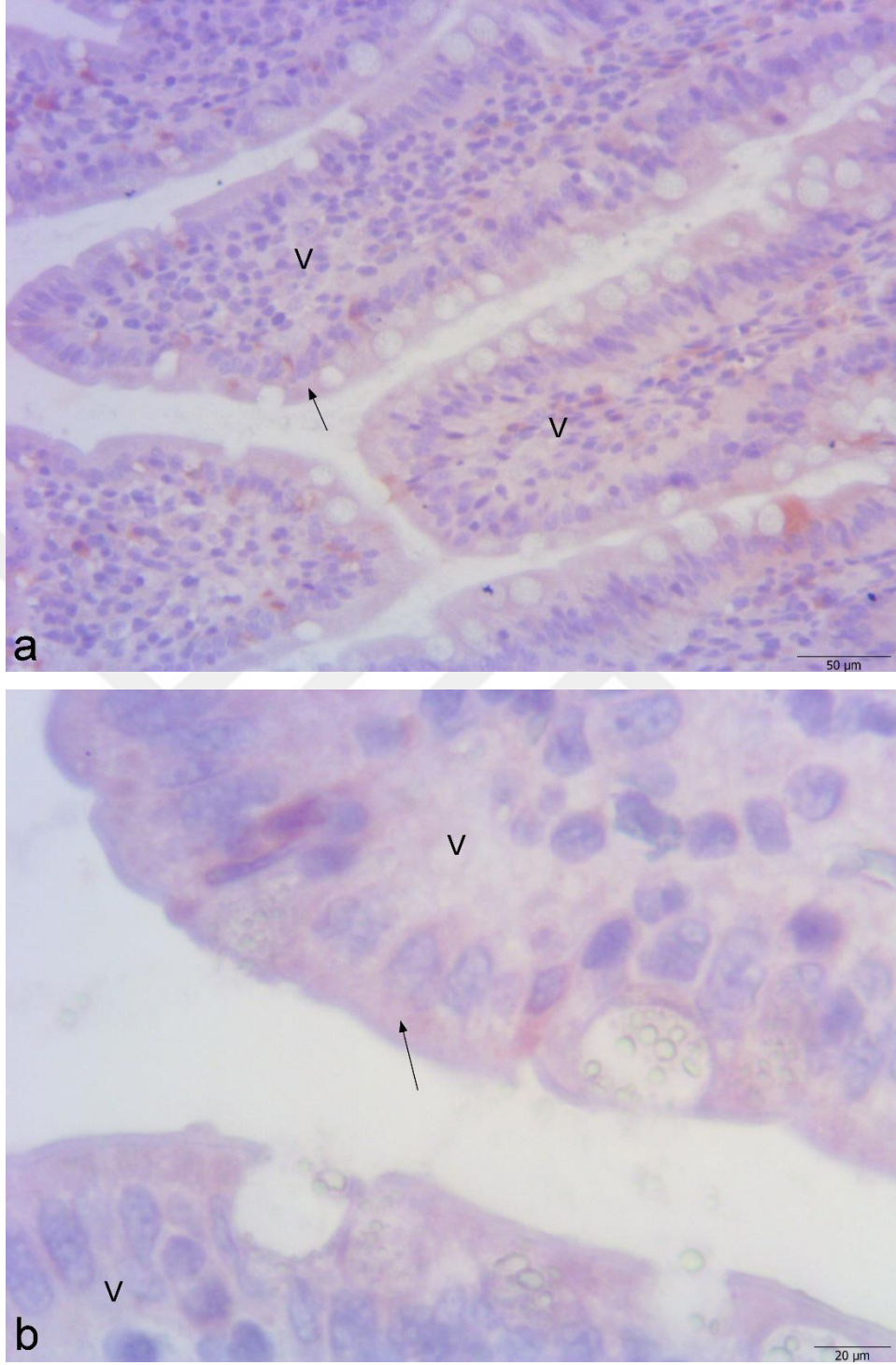
Şekil 4.1.2: Deney gruplarının ince bağırsak kesitlerinde antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitleri. Villus (V). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



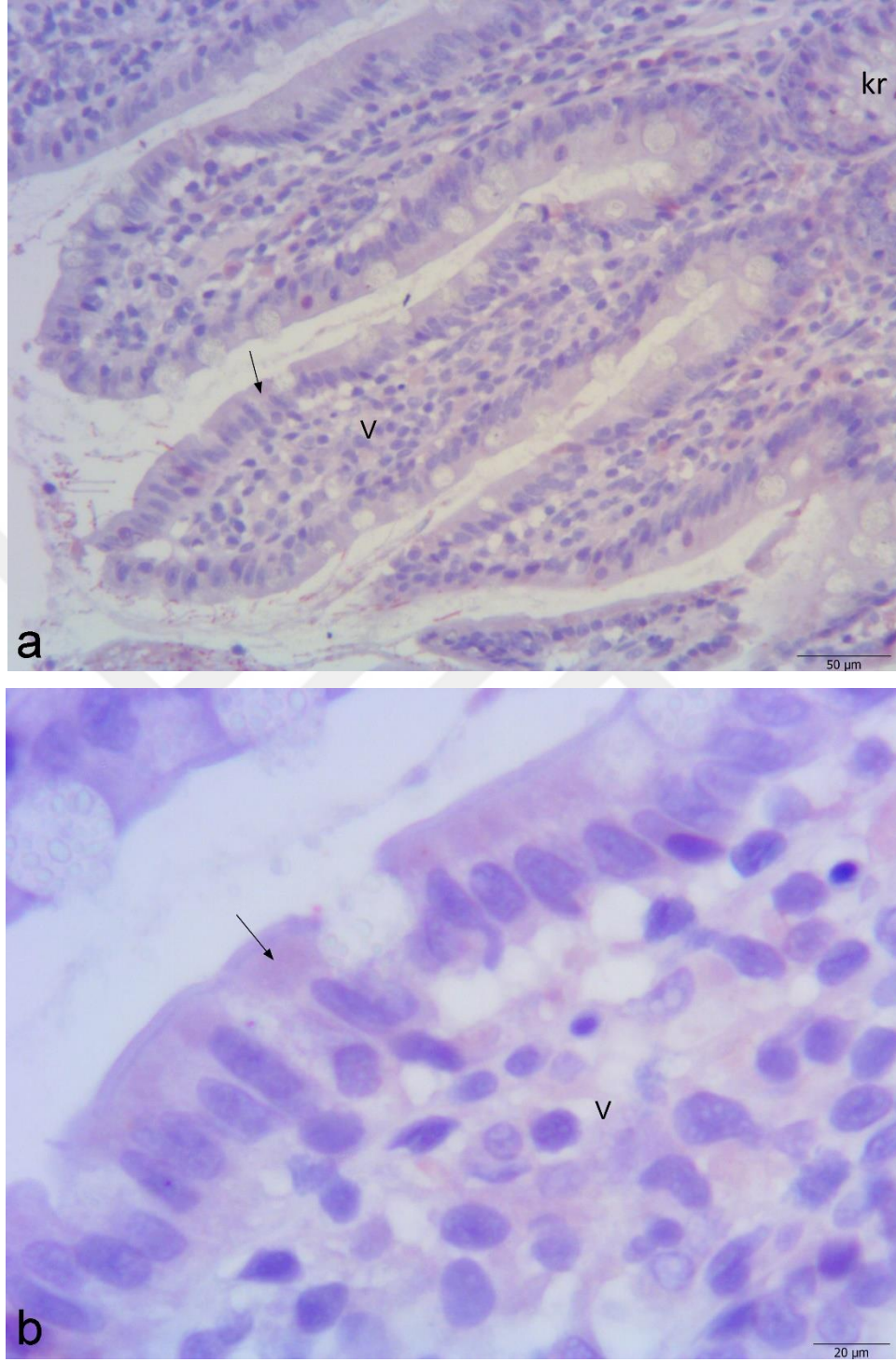
Şekil 4.1.3: Kontrol grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



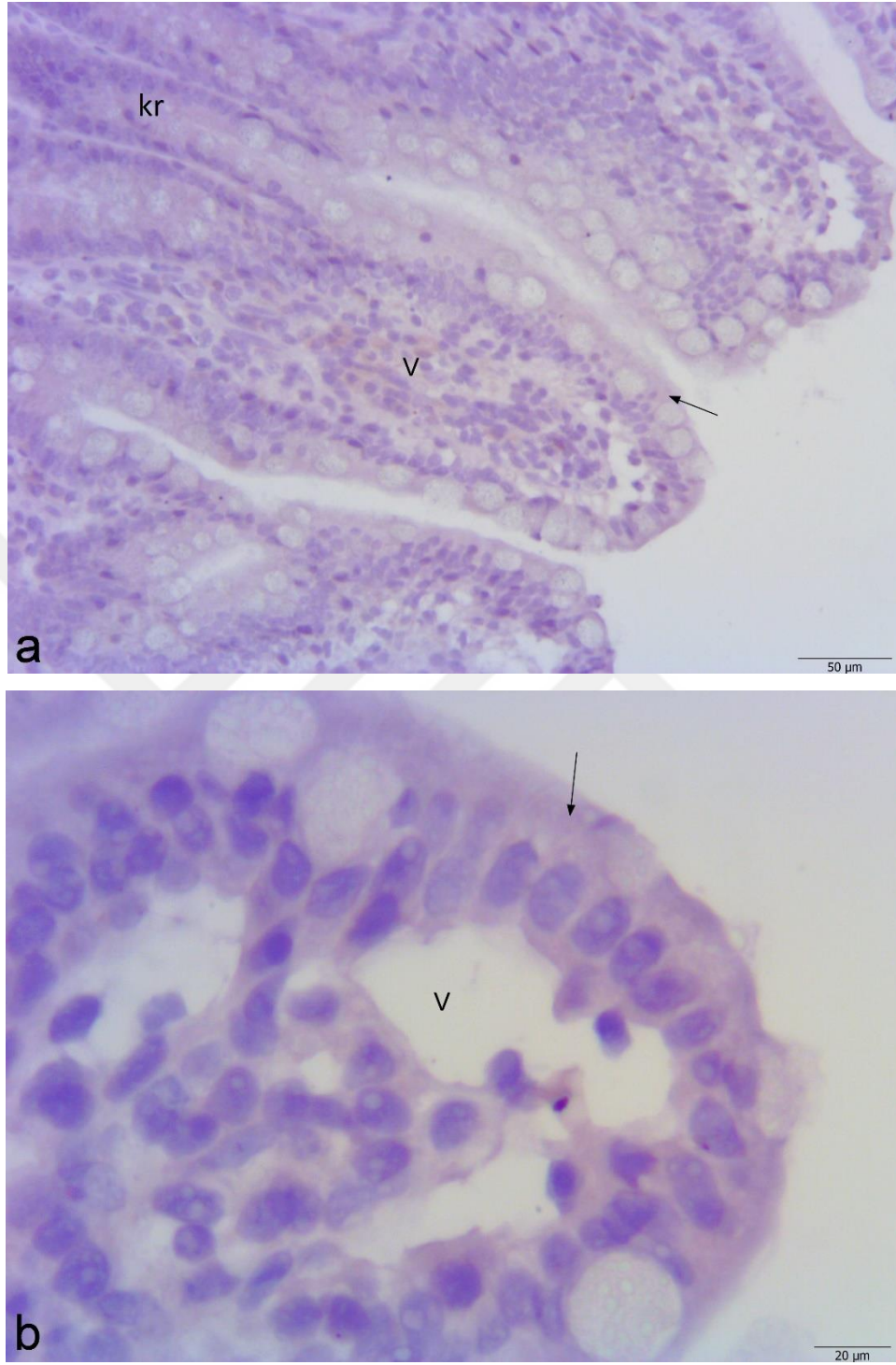
Şekil 4.1.4: Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



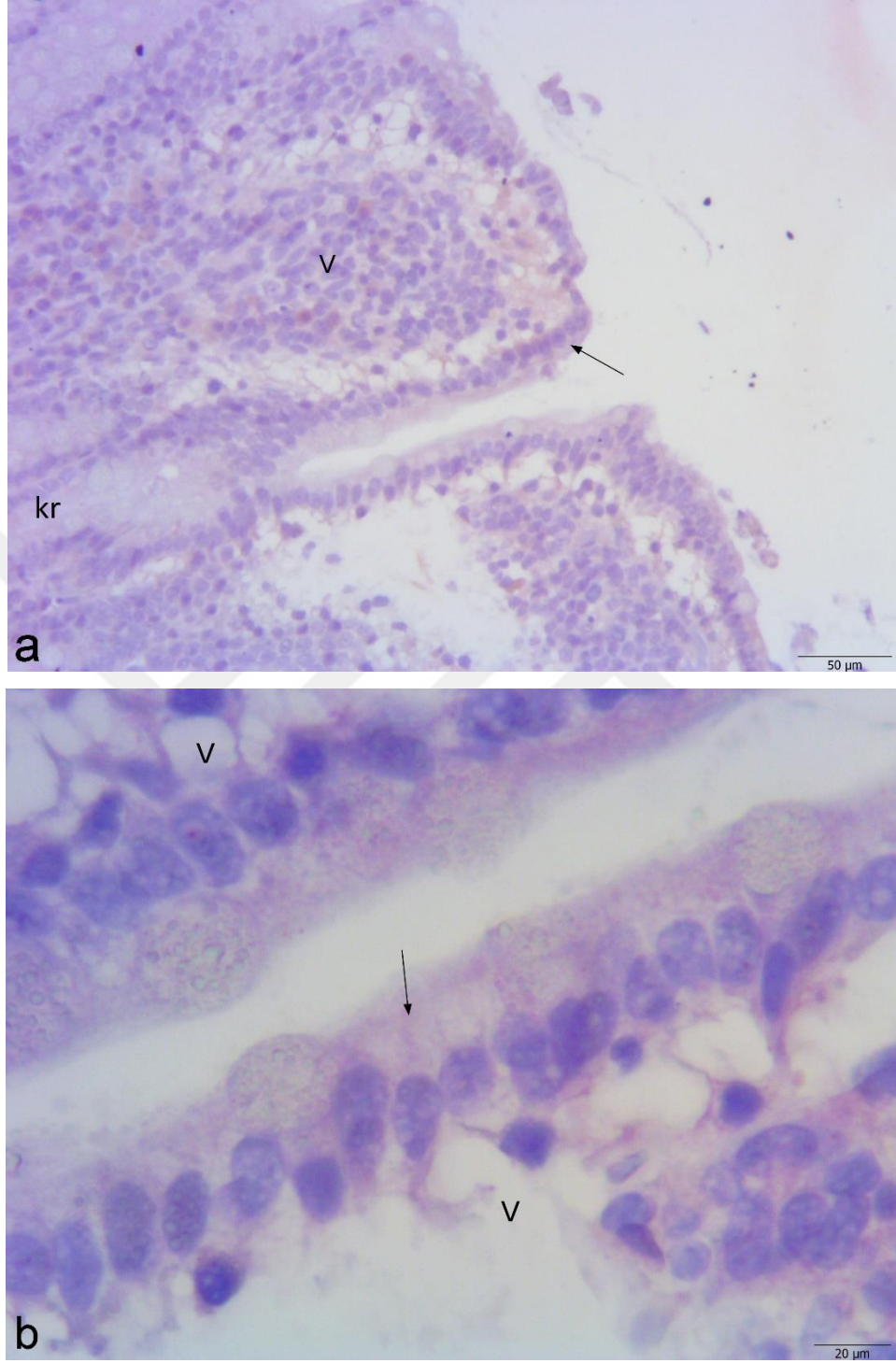
Şekil 4.1.5: Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.6: LPS grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.7: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



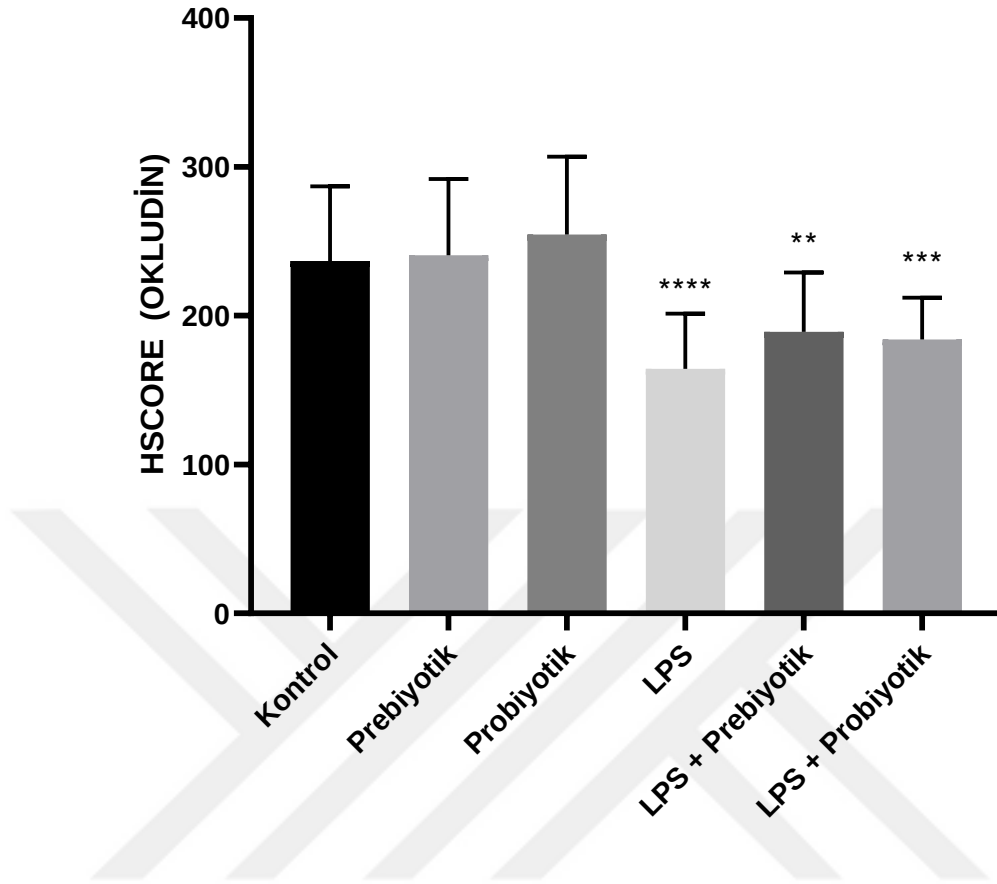
Şekil 4.1.8: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu (→). Villus (V) ve kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.

Deney hayvanlarından alınan kalın bağırsak kesitlerinde immünohistokimyasal olarak okludin reaksiyonunun dağılımına ve yoğunluğuna bakıldı. Kesitlerde okludin reaksiyonuna HSCORE uygulanarak bakıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi (Şekil 4.1.9).

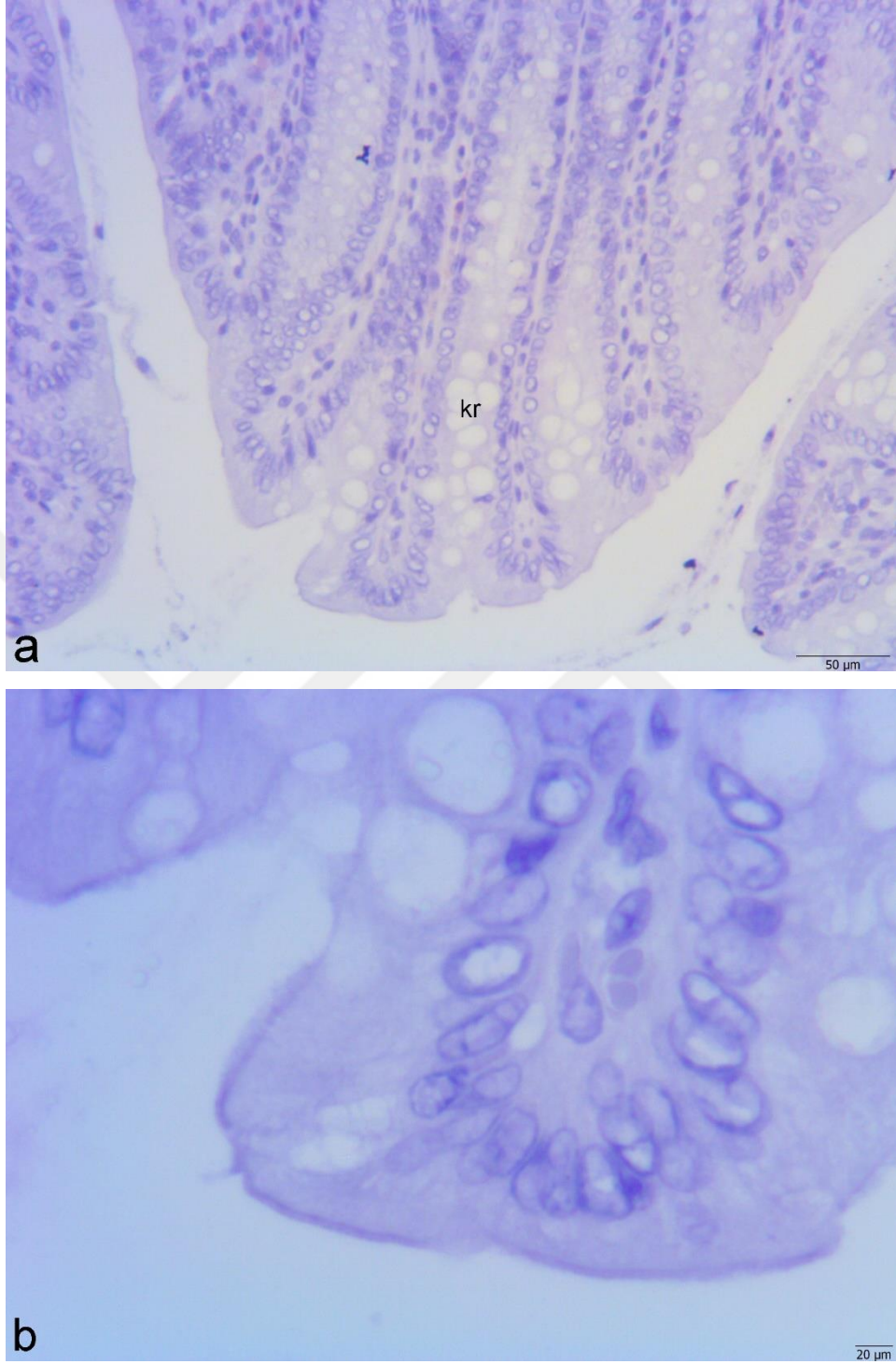
Deney gruplarının kalın bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu incelendiğinde, antikor uygulanmayan negatif kontrollere göre (Şekil 4.1.10) kontrol grubunda okludin reaksiyonu epitel tabakası hücrelerinde görüldü (Şekil 4.1.11).

Kalın bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonunun prebiyotik ve probiyotik gruplarında kontrole benzer olduğu tespit edildi. Prebiyotik ve probiyotik uygulanan grupta okludin reaksiyonu epitel tabakası hücrelerinde görüldü (Şekil 4.1.9, 4.1.12, 4.1.13).

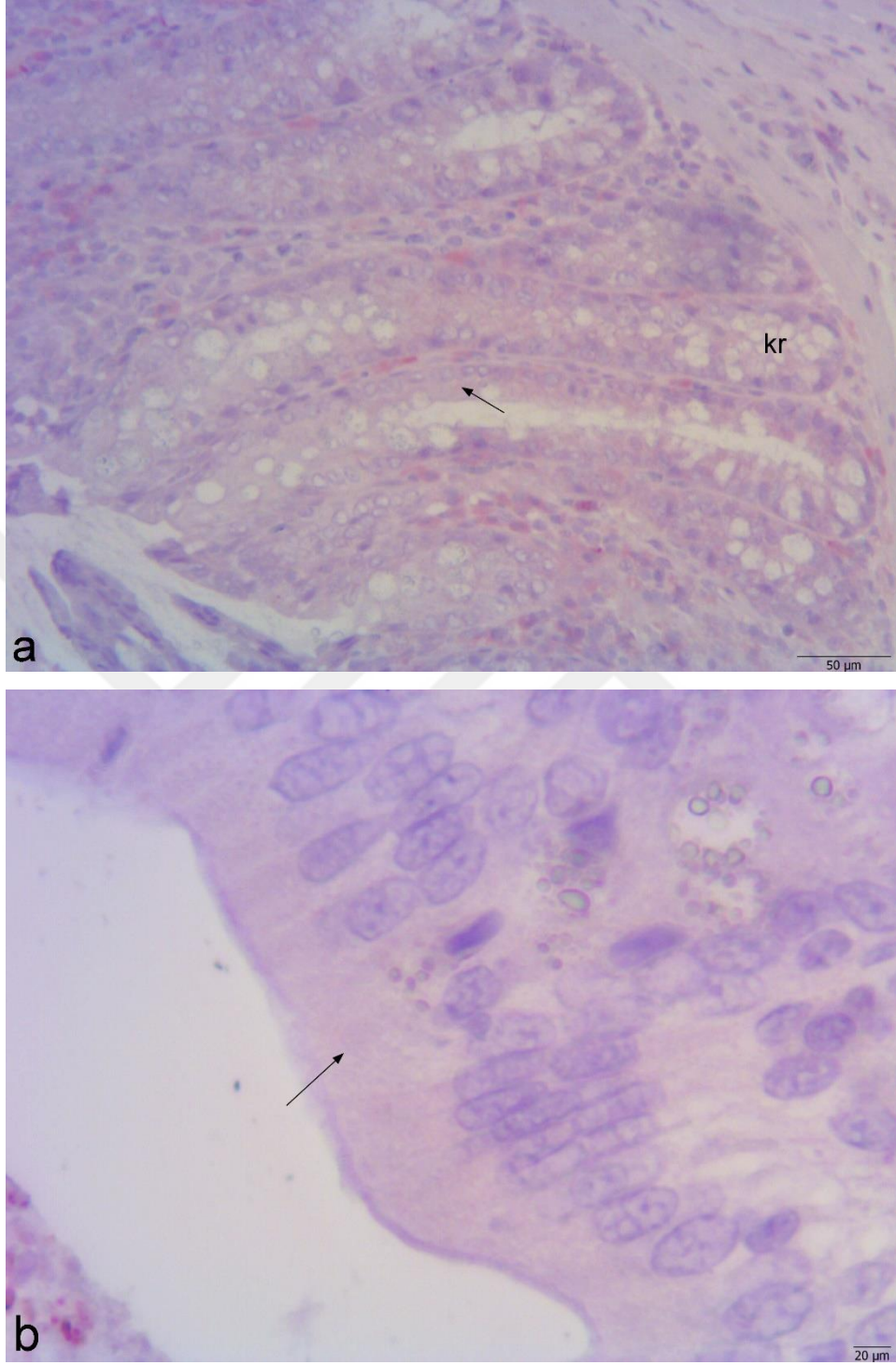
LPS uygulanan LPS ($p<0,0001$), LPS + Prebiyotik ($p<0,01$) ve LPS + Probiyotik ($p<0,005$) gruplarının kalın bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi (Şekil 4.1.9). LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik grubunda okludin reaksiyonun LPS grubuna benzer olduğu görüldü (Şekil 4.1.9). LPS uygulanan gruplarda kalın bağırsak kesitlerinde okludin reaksiyonu epitel tabakası hücrelerinde belirlendi (Şekil 4.1.14, 4.1.15, 4.1.16).



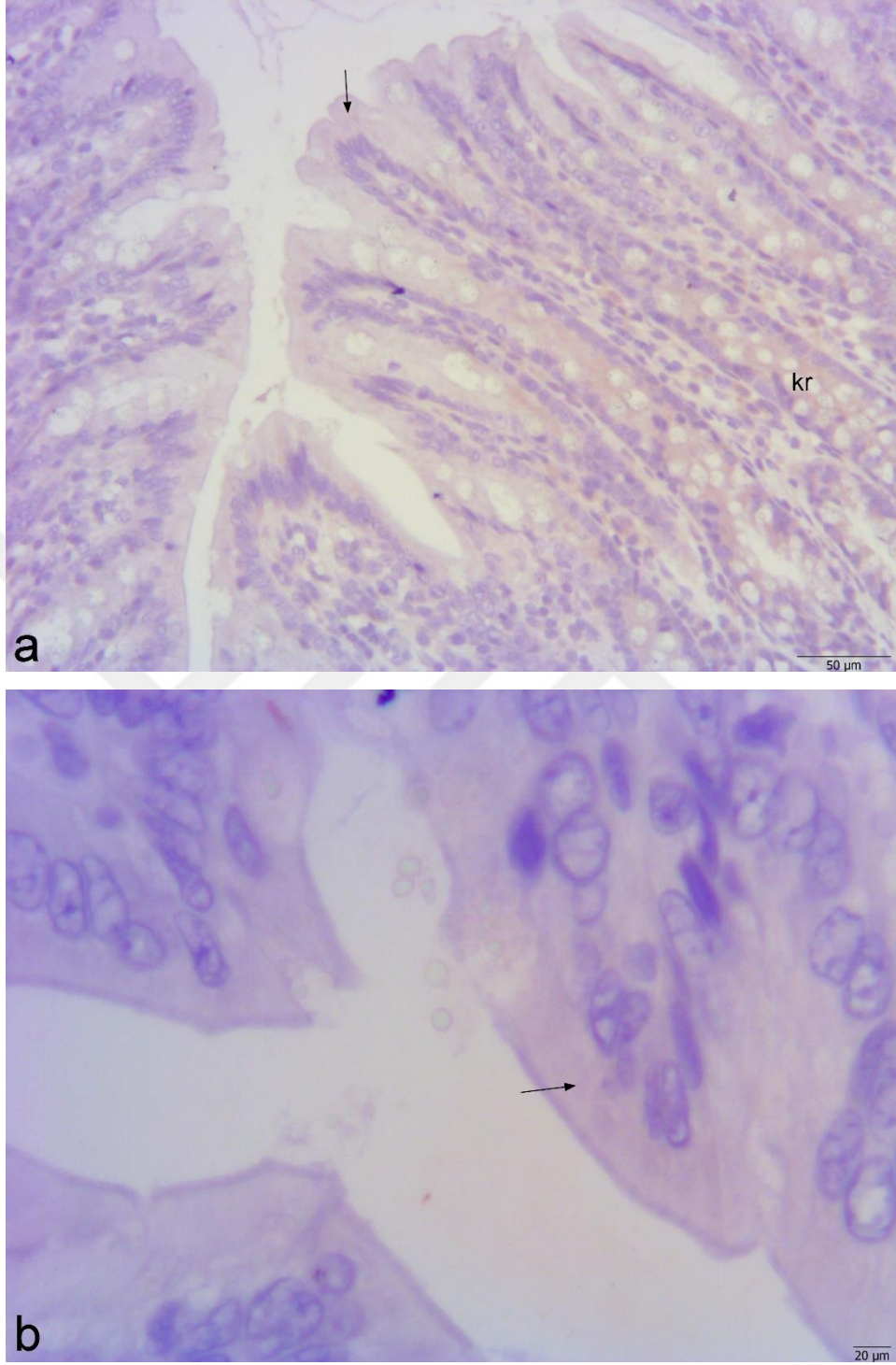
Şekil 4.1.9: Deney gruplarına ait hayvanların kalın bağırsak dokusunda okludin reaksiyonu (HSCORE). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ ve **** $p < 0,0001$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



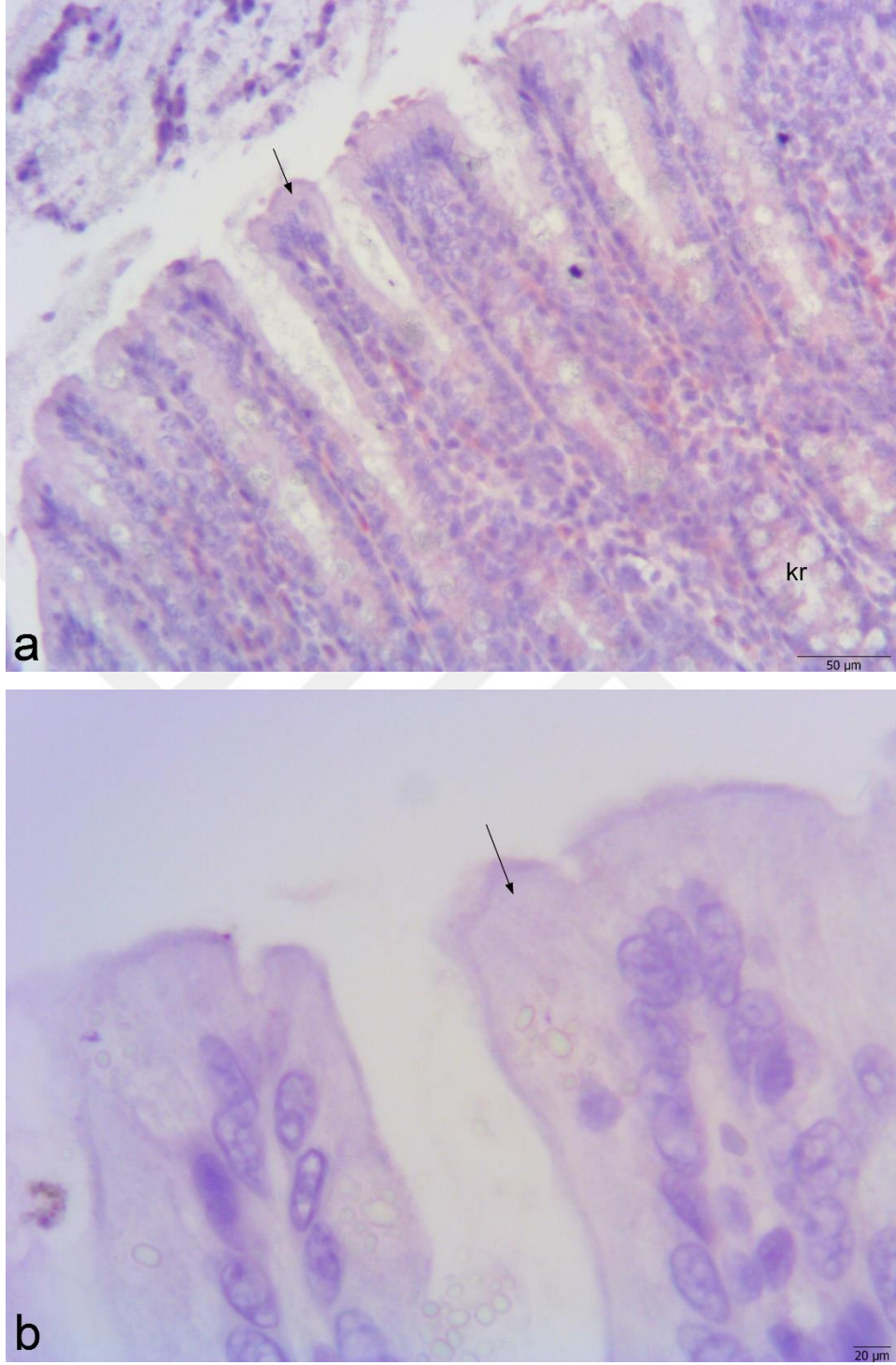
Şekil 4.1.10: Deney gruplarının kalın bağırsak kesitlerinde antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde kriptler (kr) ve epitel hücreleri. a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



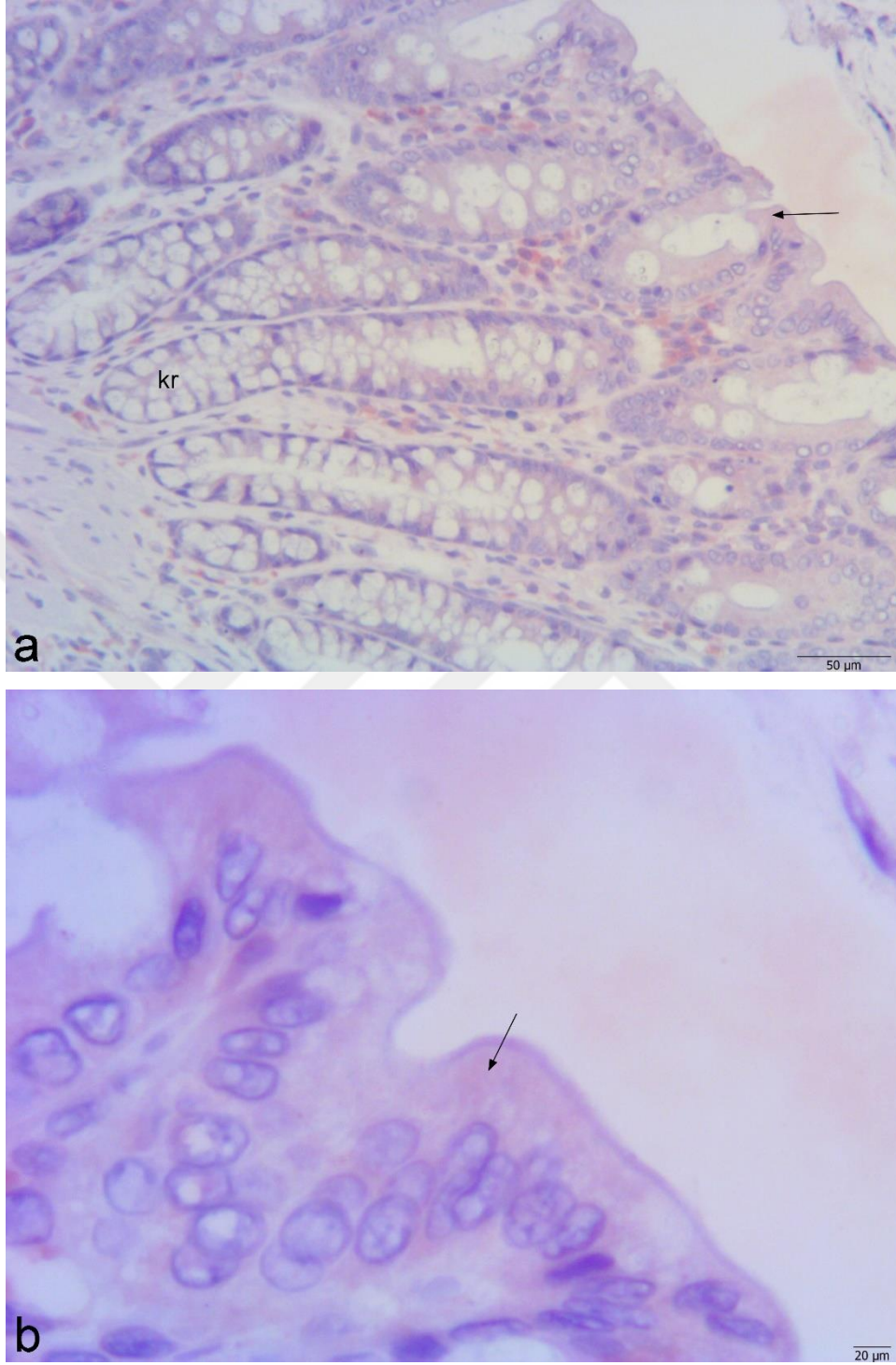
Şekil 4.1.11: Kontrol grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



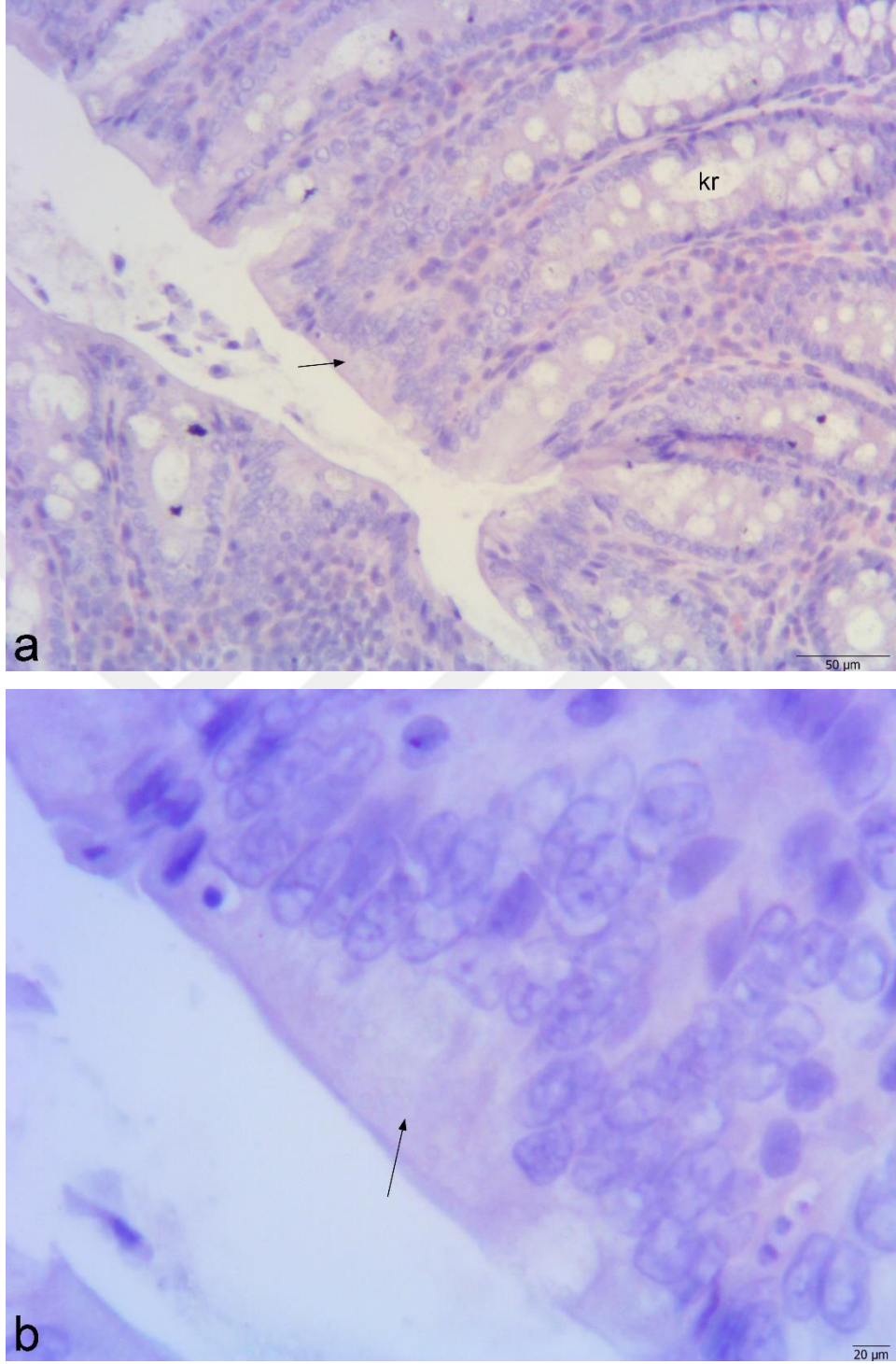
Şekil 4.1.12: Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



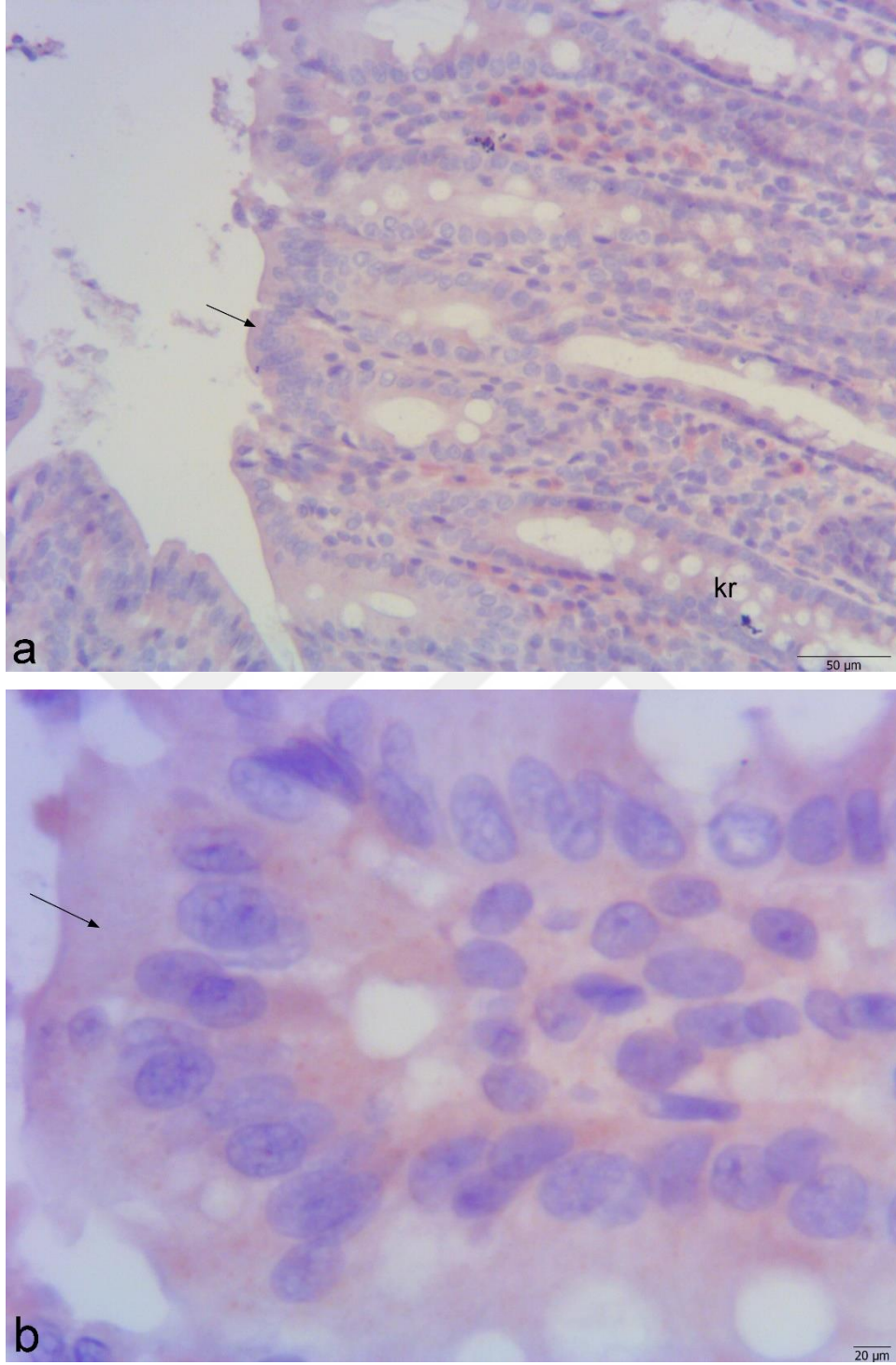
Şekil 4.1.13: Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.14: LPS grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



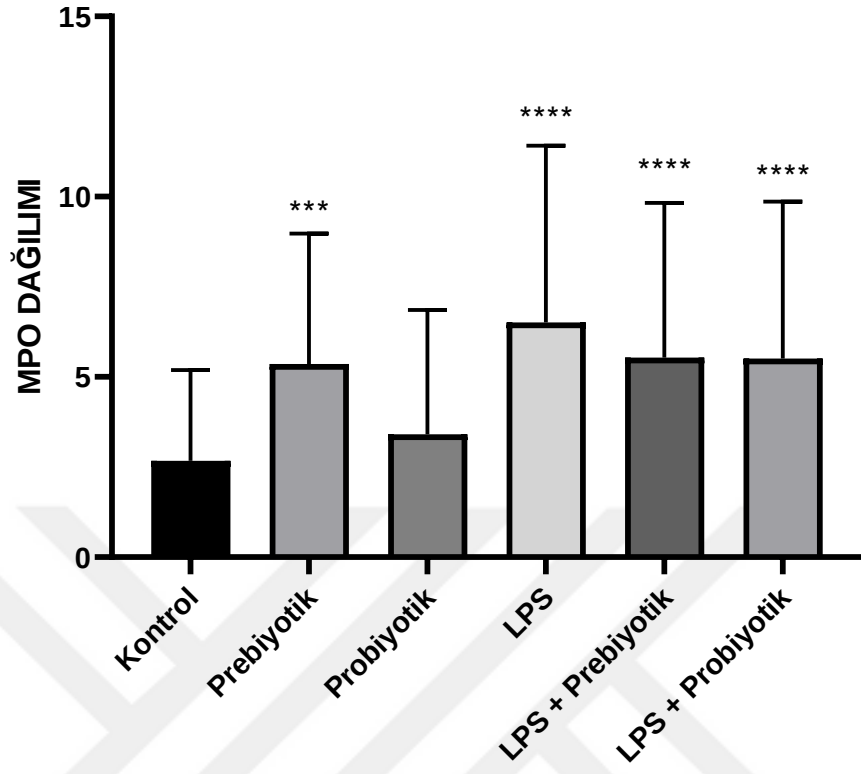
Şekil 4.1.15: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



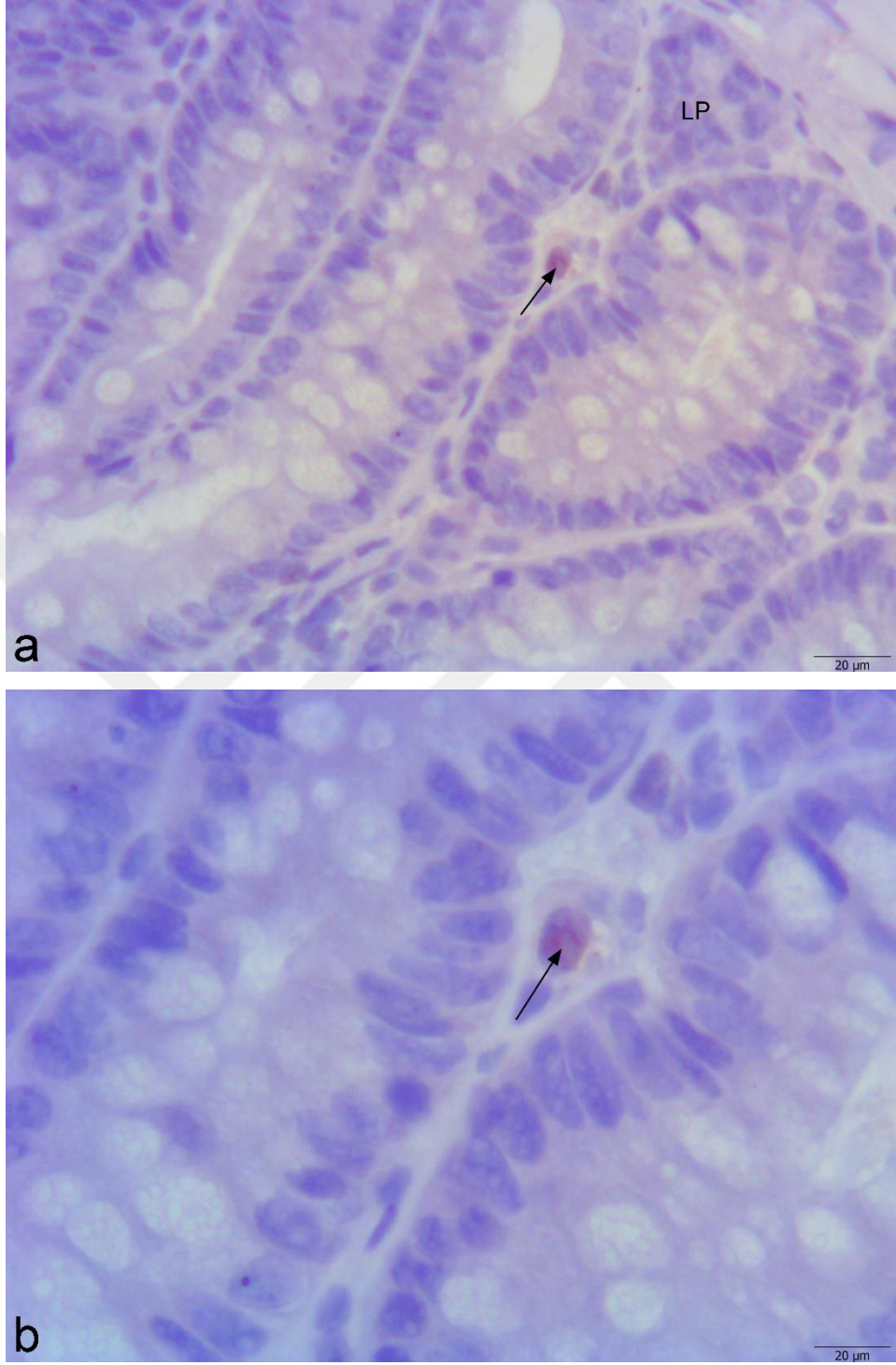
Şekil 4.1.16: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde epitel hücrelerinde okludin reaksiyonu (→). Kript (kr). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.

Deney hayvanlarından alınan ince ve kalın bağırsak dokularında lökosit varlığını göstermek amacıyla immünohistokimyasal olarak miyeloperoksidaz antikor uygulaması yapıldı. MPO işaretli lökositlerin dağılımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi (Şekil 4.1.17, 4.1.24).

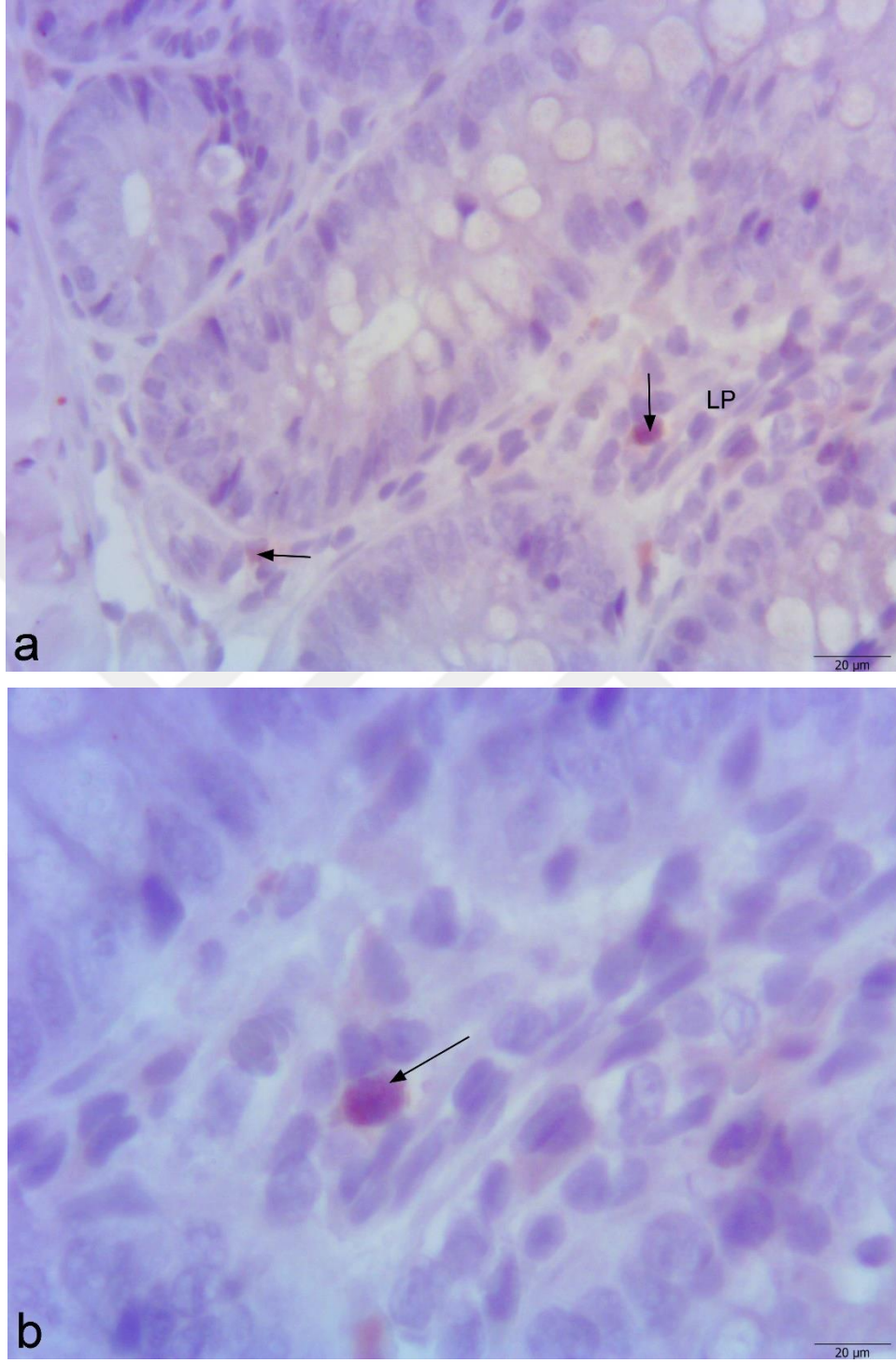
Deney gruplarının ince bağırsak dokusunda MPO reaksiyonu değerlendirildiğinde, antikor uygulanmayan negatif kontrollere göre (Şekil 4.1.2), kontrol grubunda MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea çok az bir alanda olduğu görüldü (Şekil 4.1.18). Prebiyotik uygulanan grupta MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea mevcut olduğu ve kontrole göre arttığı ($p<0,005$) tespit edildi (Şekil 4.1.17, 4.1.19). Probiyotik uygulanan grupta MPO ile işaretli lökositlerin dağılımı lamina proprea ve tunika submukozada olup, kontrole benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.20). LPS uygulanan LPS, LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik gruplarında MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea, tunika submukoza ve kan damarlarında olduğu ve kontrole göre arttığı ($p<0,0001$), ancak LPS grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi (Şekil 4.1.17, 4.1.21, 4.1.22, 4.1.23).



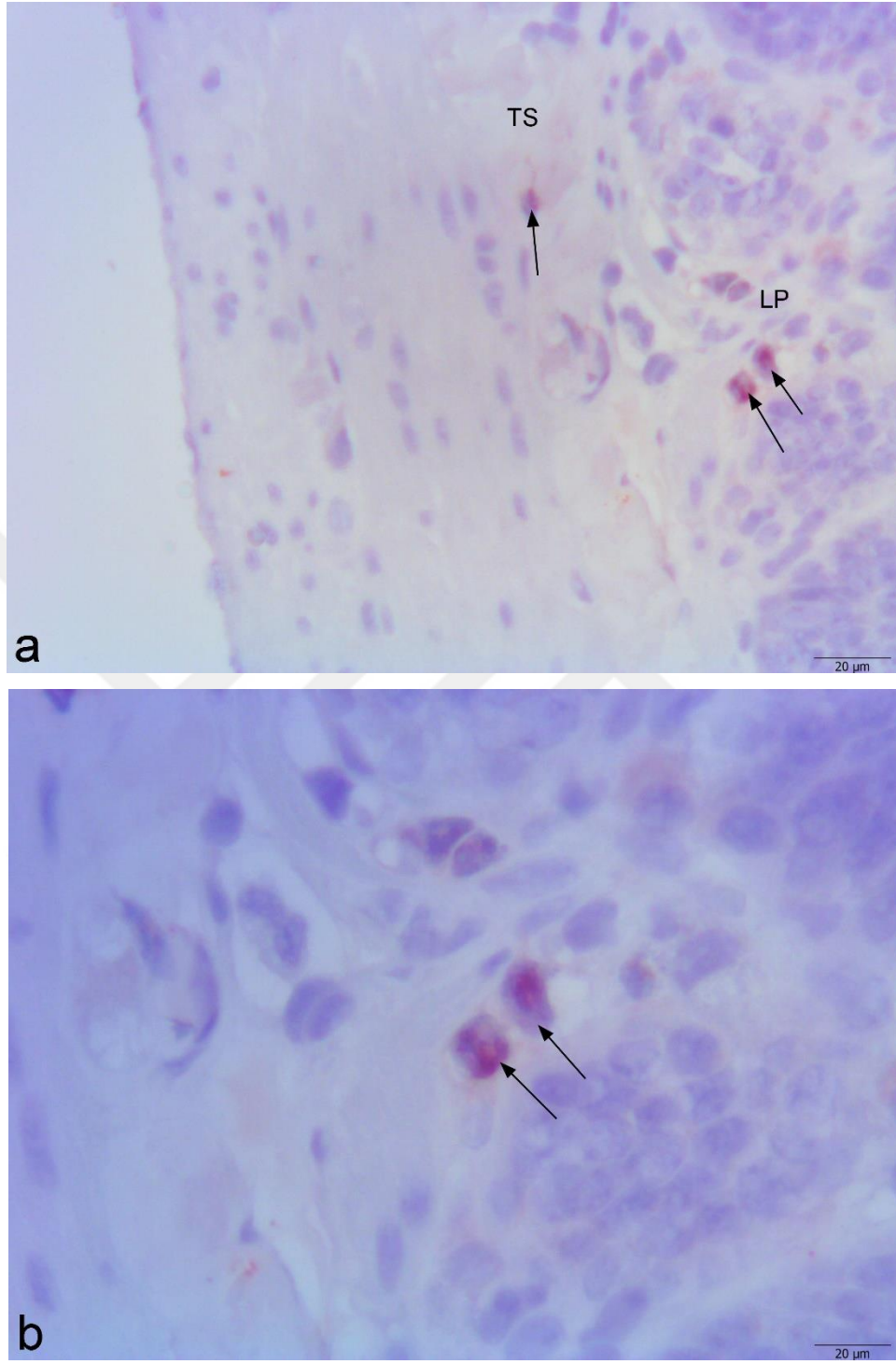
Şekil 4.1.17: Deney gruplarına ait hayvanların ince bağırsak dokusunda MPO reaksiyonun dağılımı.
 *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



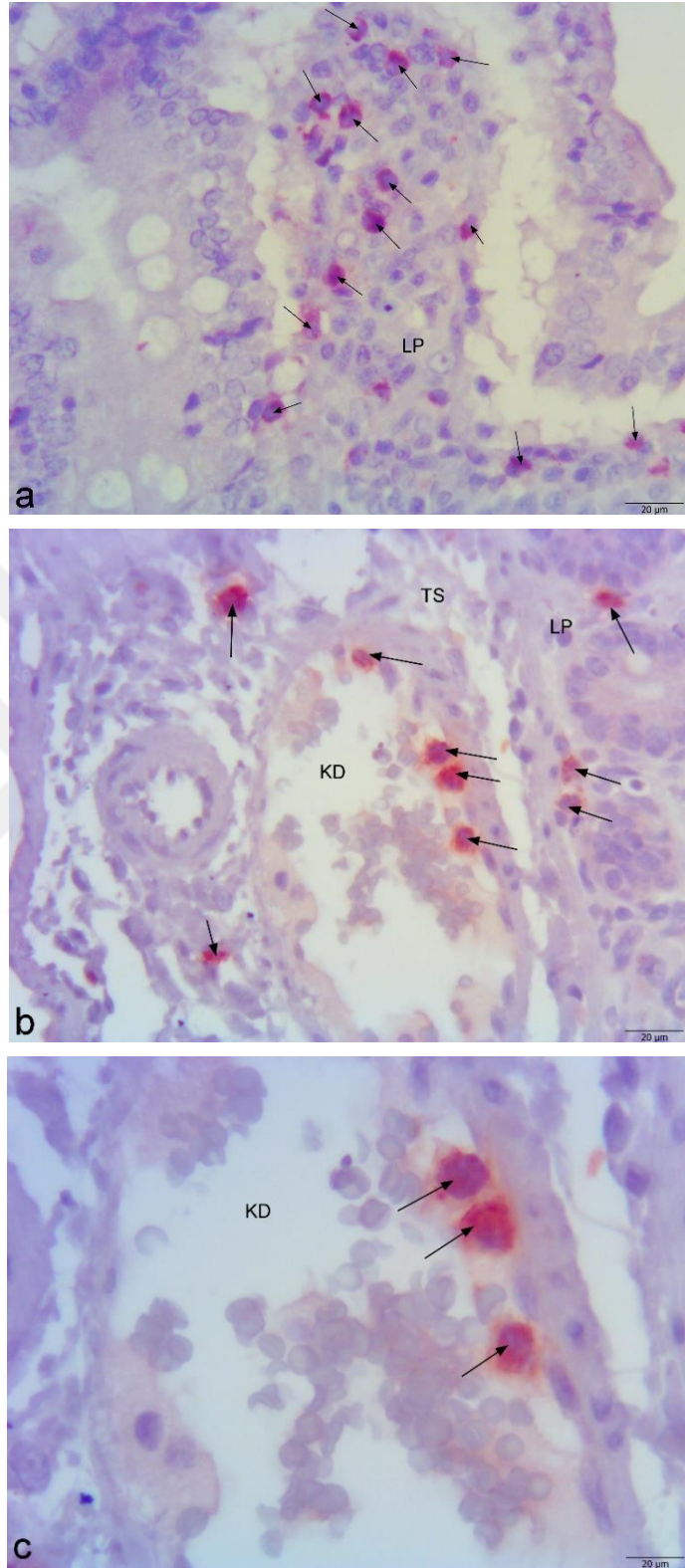
Şekil 4.1.18: Kontrol grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→).
Lamina propria (LP). a-b) Bar: 20 µm.



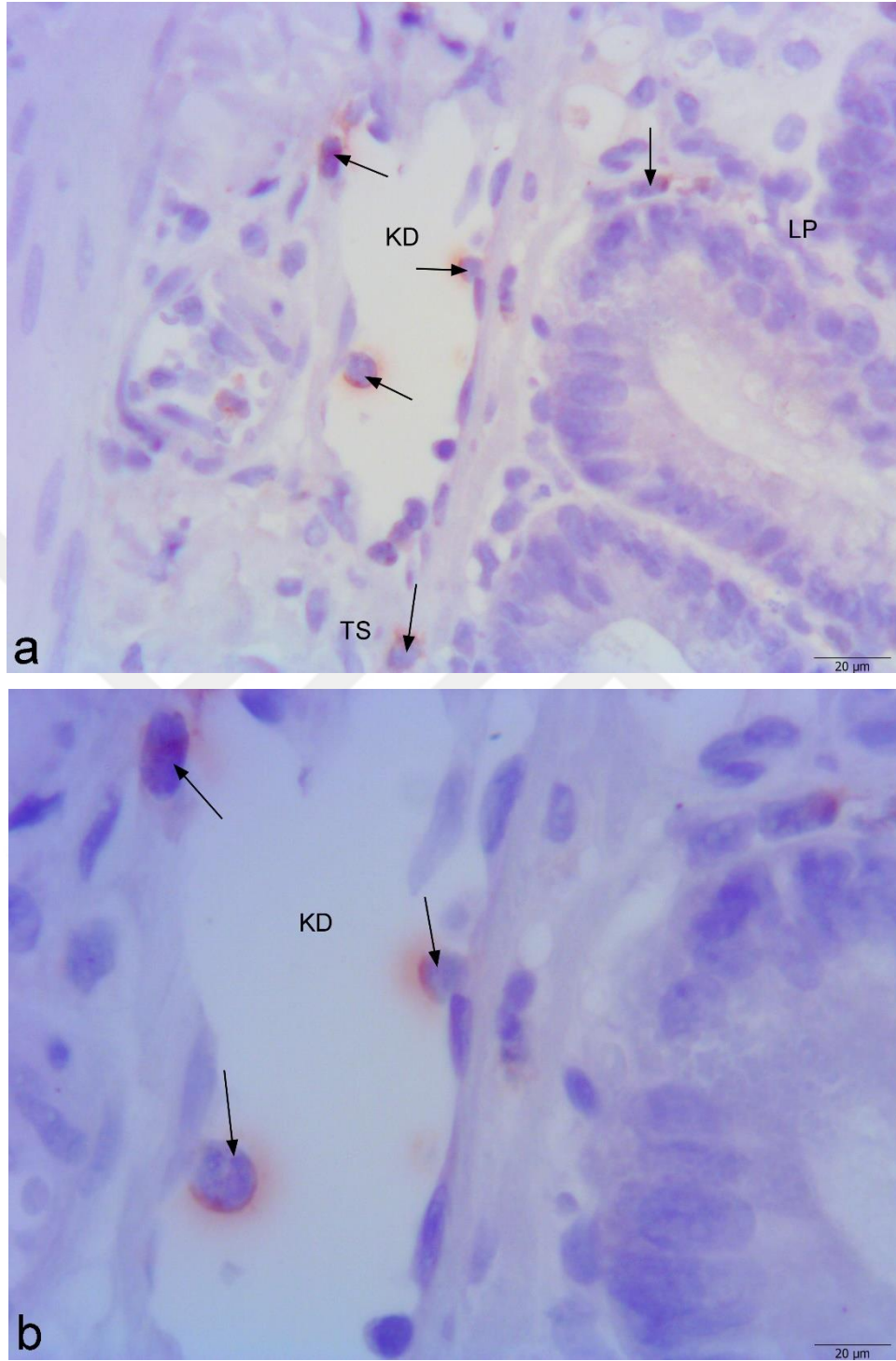
Şekil 4.2.19: Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP). a-b) Bar: 20 µm.



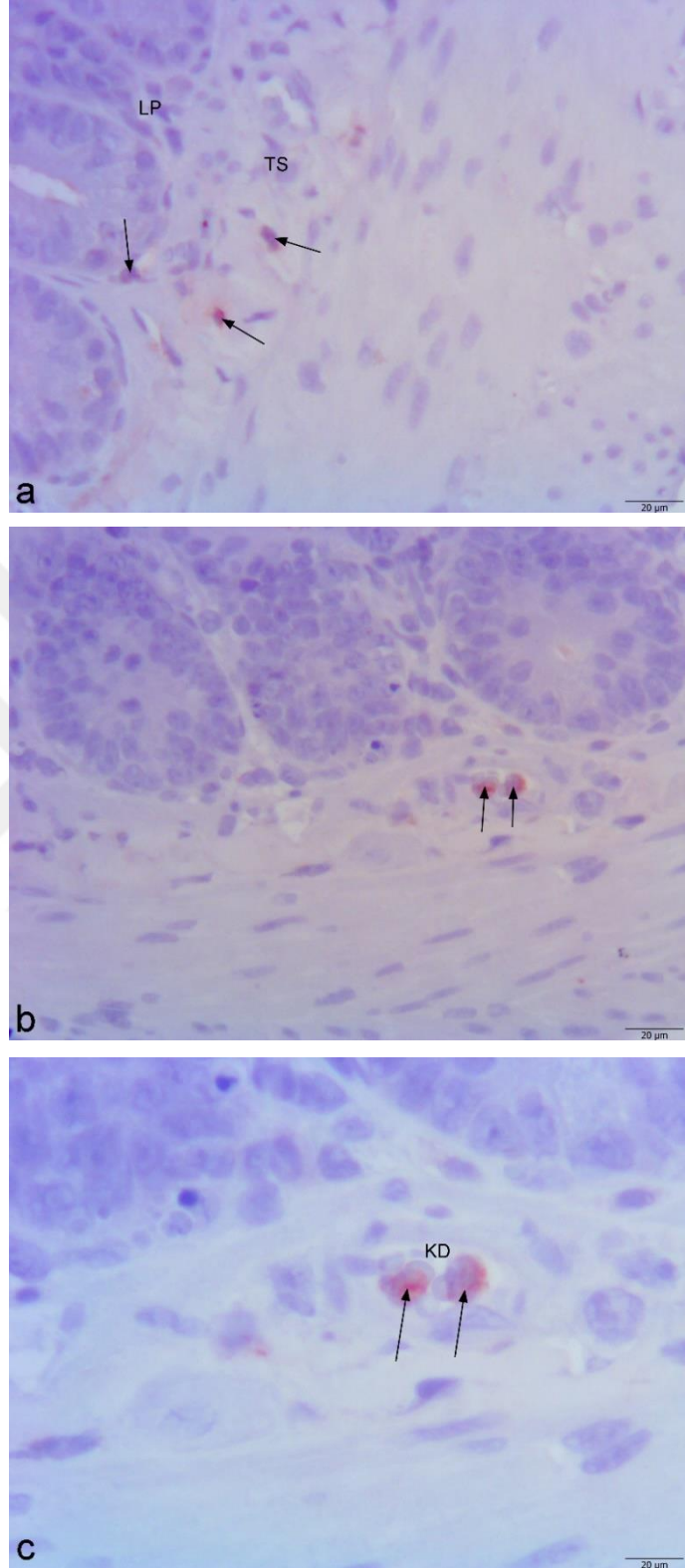
Şekil 4.1.20: Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP) ve tunika submukoza (TS). a-b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.21: LPS grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-c) Bar: 20 µm.

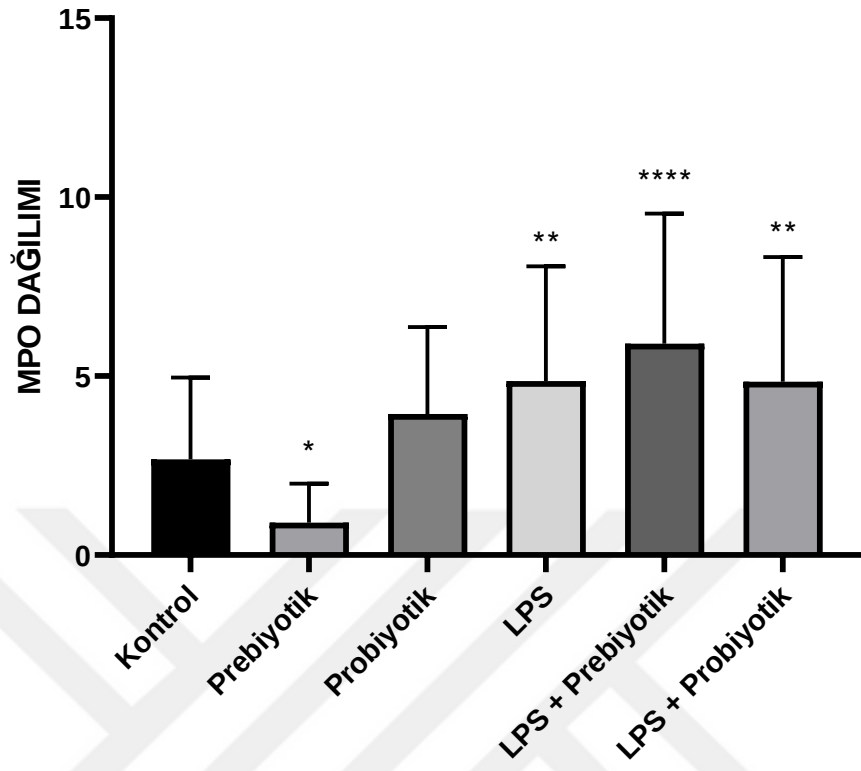


Şekil 4.1.22: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.

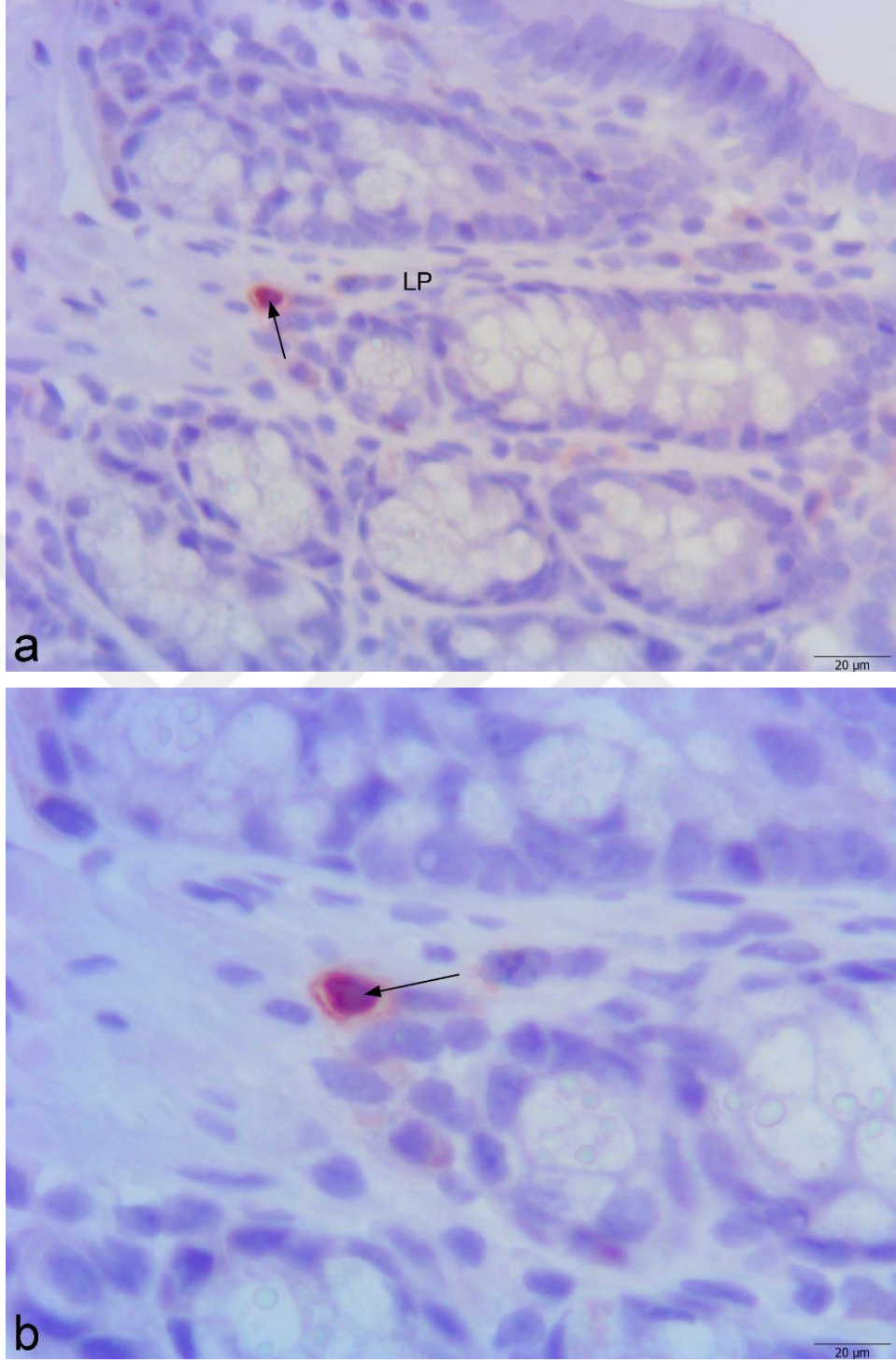


Şekil 4.1.23: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların ince bağırsak MPO reaksiyonu (→). Lamina proplea (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-c) Bar: 20 µm.

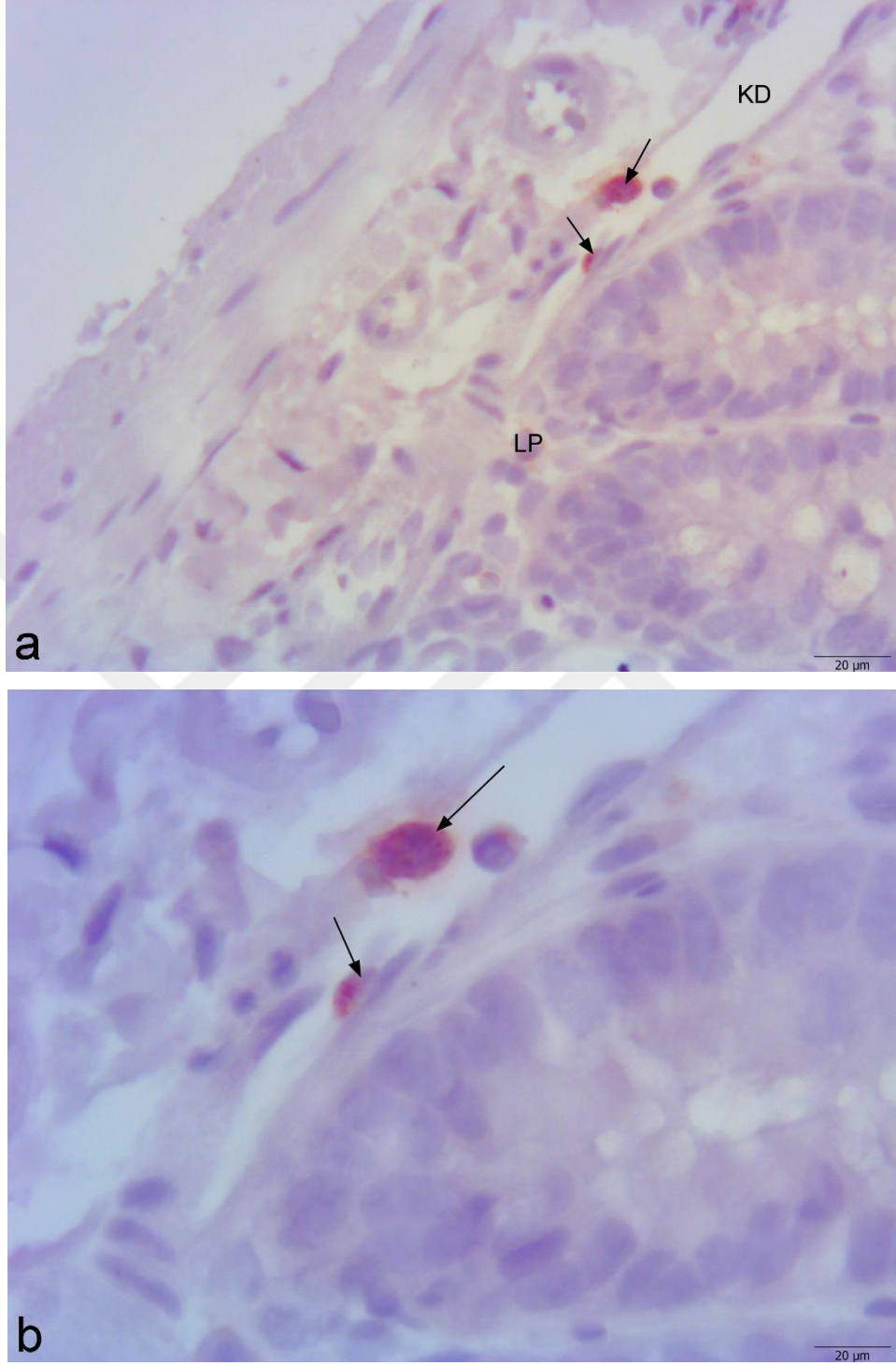
Deney gruplarının kalın bağırsak dokusunda MPO ile işaretli lökositler incelendiğinde, antikor uygulanmayan negatif kontrollere göre (Şekil 4.1.10), kontrol grubunda MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea'da çok az bir alanda olduğu görüldü (Şekil 4.1.25). Prebiyotik uygulanan grupta MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea ve kan damarlarında mevcut olduğu ve kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 4.1.24, 4.1.26). Probiyotik uygulanan grupta MPO ile işaretli lökositlerin lamina proprea, tunika submukoza ve kan damarlarında olduğu ve kontrole benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.27). LPS ($p<0,01$), LPS + Prebiyotik ($p<0,001$) ve LPS + Probiyotik ($p<0,01$) gruplarında MPO ile işaretli lökositlerin kontrole göre arttığı, ancak LPS grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Lökositlerin lamina proprea, tunika submukoza ve özellikle kan damarlarında olduğu belirlendi (Şekil 4.1.24, 4.1.28, 4.1.29, 4.1.30).



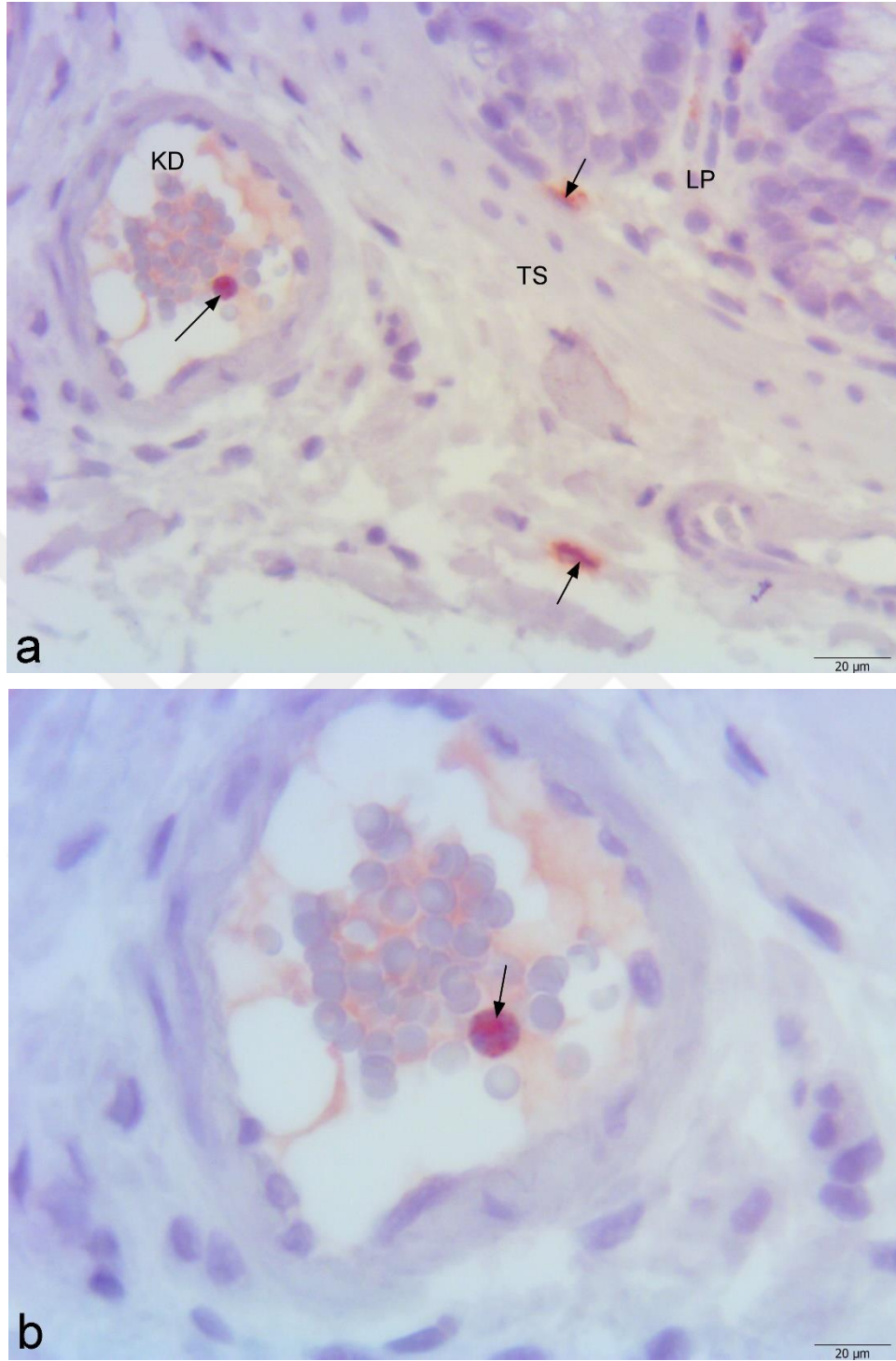
Şekil 4.1.24: Deney gruplarına ait hayvanların kalın bağırsak dokusunda MPO reaksiyonu dağılımı.
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve **** $p < 0,001$: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



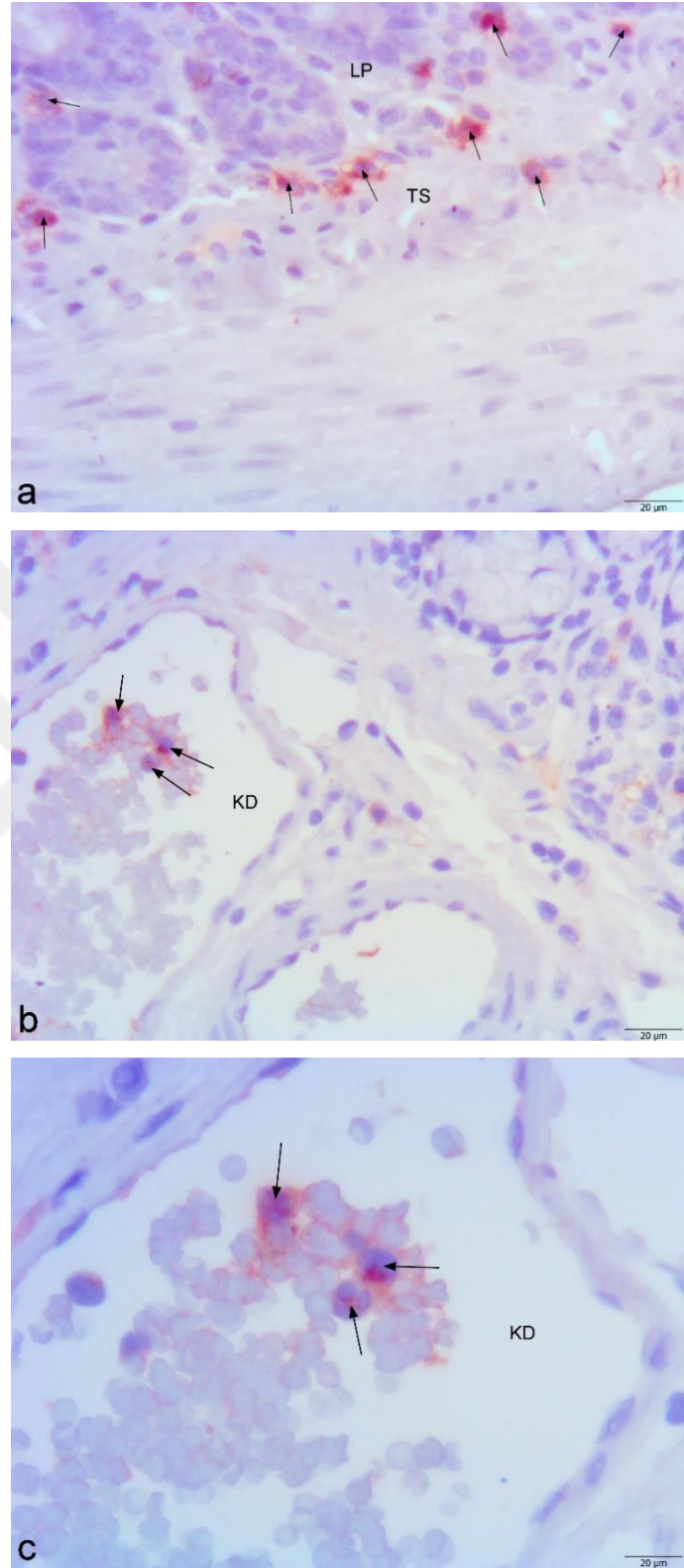
Şekil 4.1.25: Kontrol grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde lamina propreada (LP) MPO reaksiyonu (→). a-b) Bar: 20 µm.



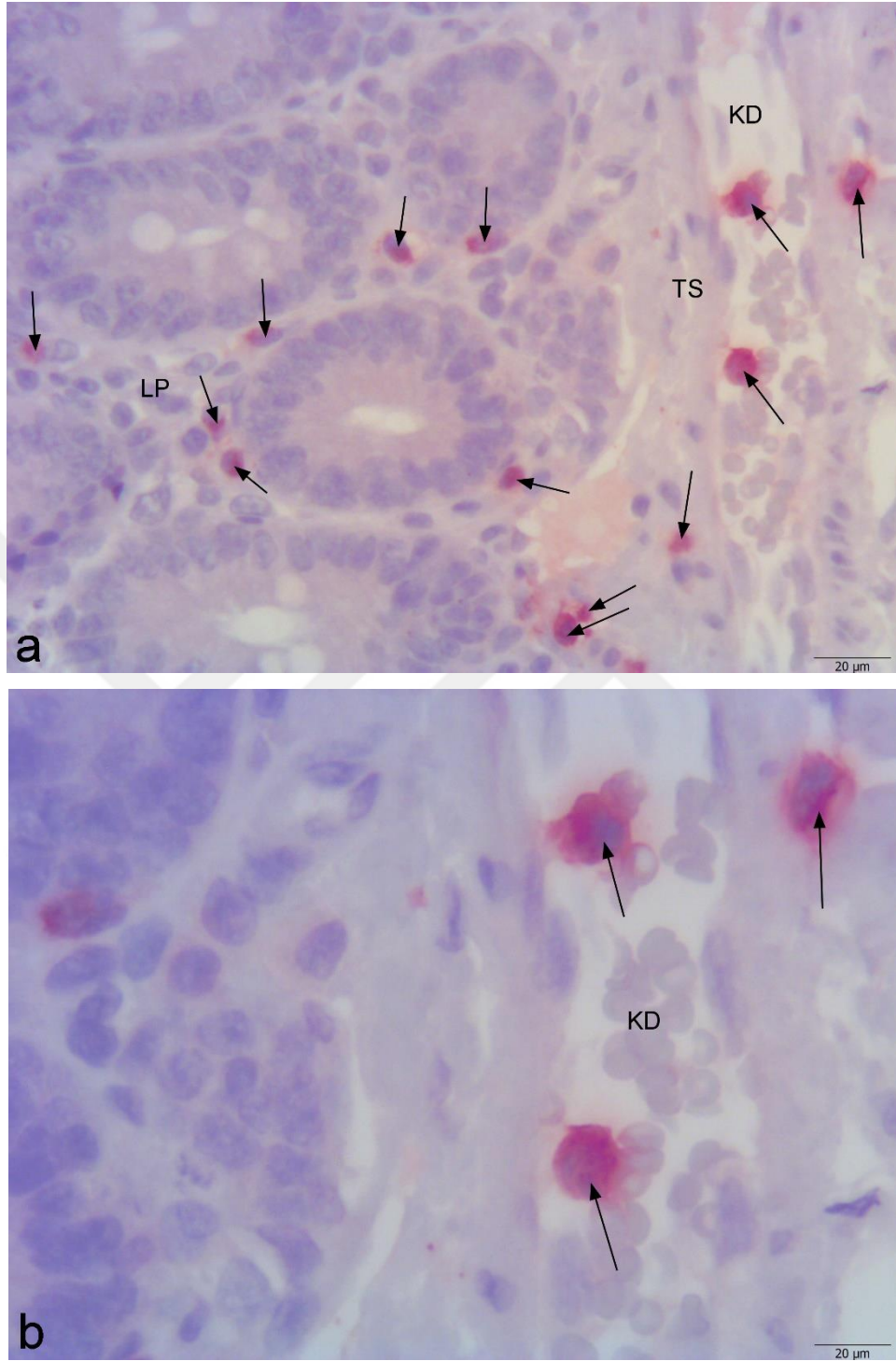
Şekil 4.1.26: Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.



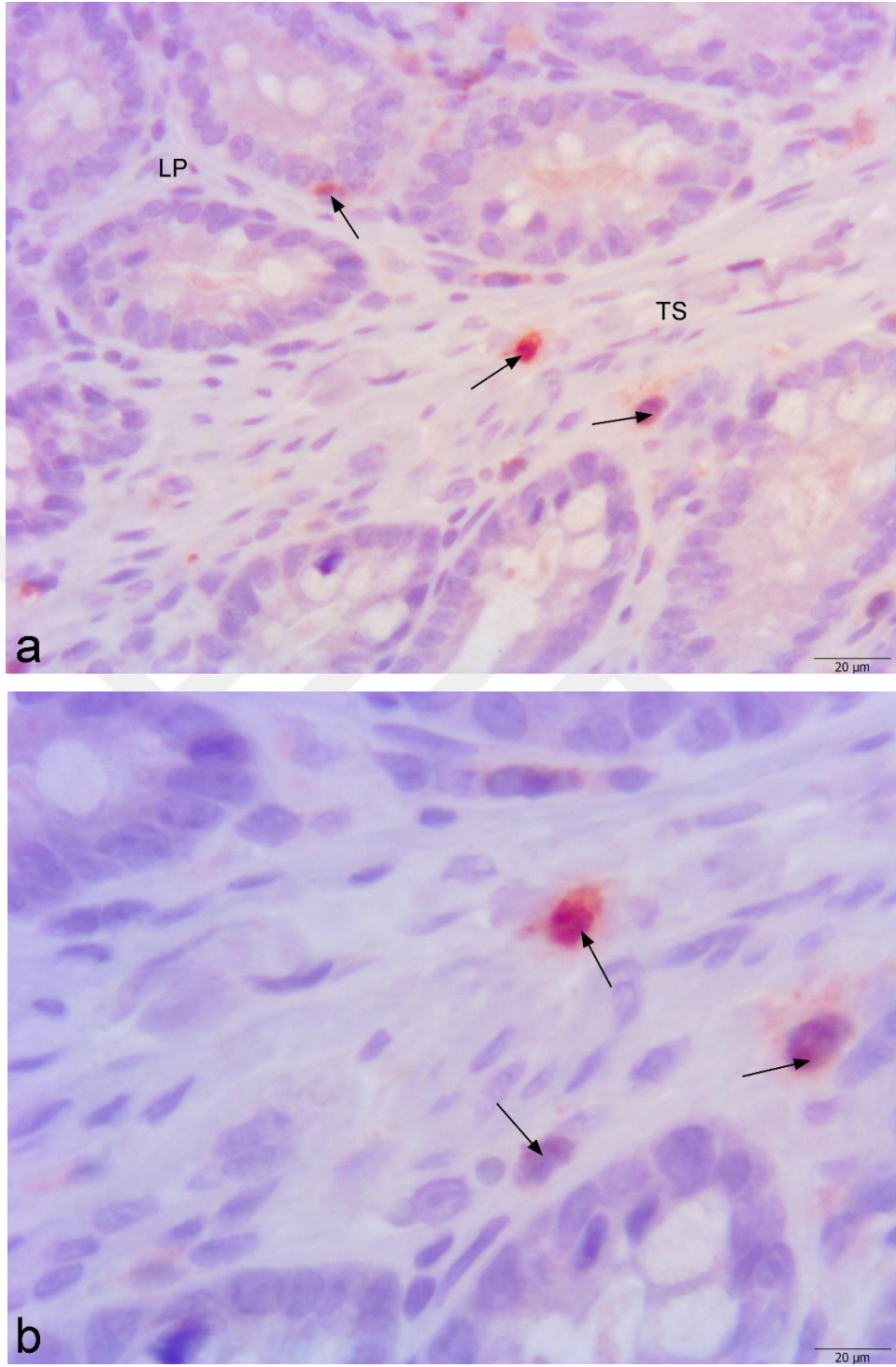
Şekil 4.1.27: Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP), tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.28: LPS grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea (LP), kan damarı (KD) ve tunika submukoza (TS). a-c) Bar: 20 μm.



Şekil 4.1.29: LPS + Prebiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina propria (LP), kan damarı (KD) ve tunika submukoza (TS). a-b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.1.30: LPS + Probiyotik grubuna ait hayvanların kalın bağırsak kesitlerinde MPO reaksiyonu (→). Lamina proprea, tunika submukoza (TS) ve kan damarı (KD). a-b) Bar 20 µm.

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

Deney gruplarından alınan ince ve kalın bağırsak kesitlerine PAS ve HE+PAS boyaları uygulanıp, ışık mikroskopunda histolojik hasar skoru hesaplandı ve goblet hücrelerinin dağılımına bakıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı histolojik değişiklikler görüldü.

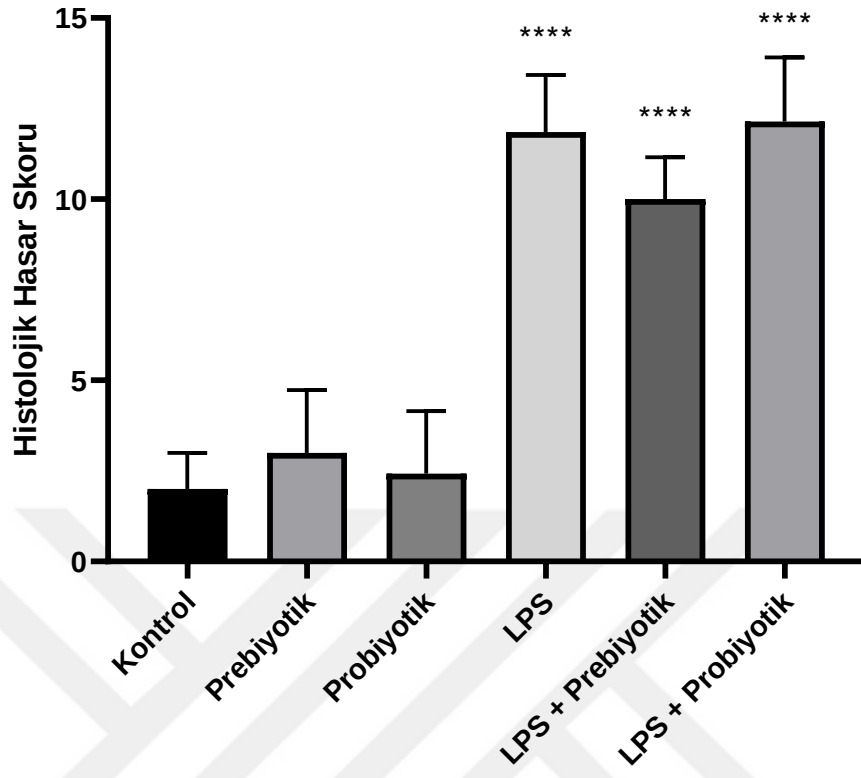
Histolojik hasar skoru değerlendirmesinde; çizgili kenarda devamsızlık, bazal membran hasarı, villus bütünlüğünde bozulma, epitel bütünlüğünün bozulması, villusların lamina propreasında ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve epitel ile bazal membran bağlantısının kopması gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak, her bir bireye ait ince bağırsağın ileum bölgesinin kesitleri skorlandı. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar) veya 3 (şiddetli hasar) şeklinde derecelendirildi.

Işık mikroskobu ile tespit edilen yarı-kantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 4.2.1’de ve istatistiksel olarak değerlendirilen bulgular Şekil 4.2.1’de gösterilmiştir. İnce bağırsakta hasar derecesi en yüksek olan LPS + Probiyotik grubu olmuştur. Kontrol bireyler ile kıyaslandığında, LPS ve LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik verilen gruplarda histolojik hasar skoru istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,0001$). LPS grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir.

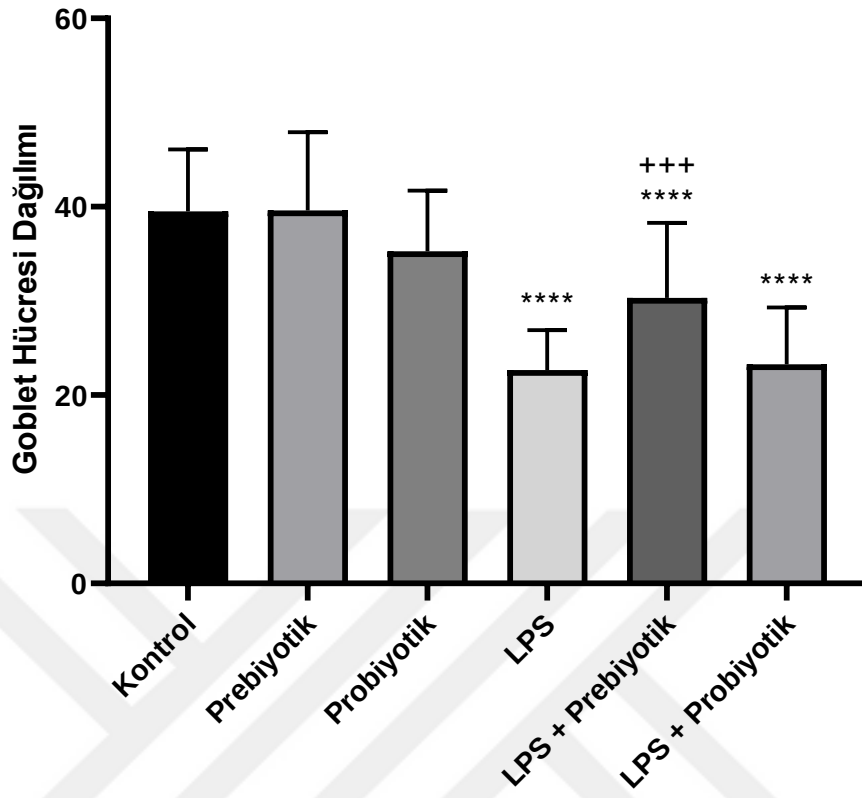
PAS boyası ile boyanan ince bağırsaktaki goblet hücrelerinin dağılımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında LPS, LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik gruplarında, goblet hücrelerinin dağılımı anlamlı bir düşüş gösterdi ($p<0,0001$). LPS grubuna göre LPS + Prebiyotik grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,005$) (Şekil 4.2.2).

Tablo 4.2.1: İnce bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.

Histolojik Kriterler	Kontrol (n=6)	Prebiyotik (n=6)	Probiyotik (n=8)	LPS (n=7)	LPS + Prebiyotik (n=6)	LPS + Probiyotik (n=6)
Çizgili kenarda devamsızlık	2	2	3	10	9	15
Bazal membran hasarı	3	3	2	14	11	13
Villus bütünlüğünde bozulma	3	1	4	12	9	13
Epitel bütünlüğünün bozulması	3	1	5	10	10	10
Lamina propreada ödem	1	5	2	13	10	10
Epitel hücrelerinde vakuolizasyon	1	5	1	11	12	12
Epitel ile bazal membran bağlantısının kopması	1	4	0	13	9	12
Ortalama Değer	2	3	2,42	11,85	10	12,14



Şekil 4.2.1: İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. **** $p < 0,0001$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

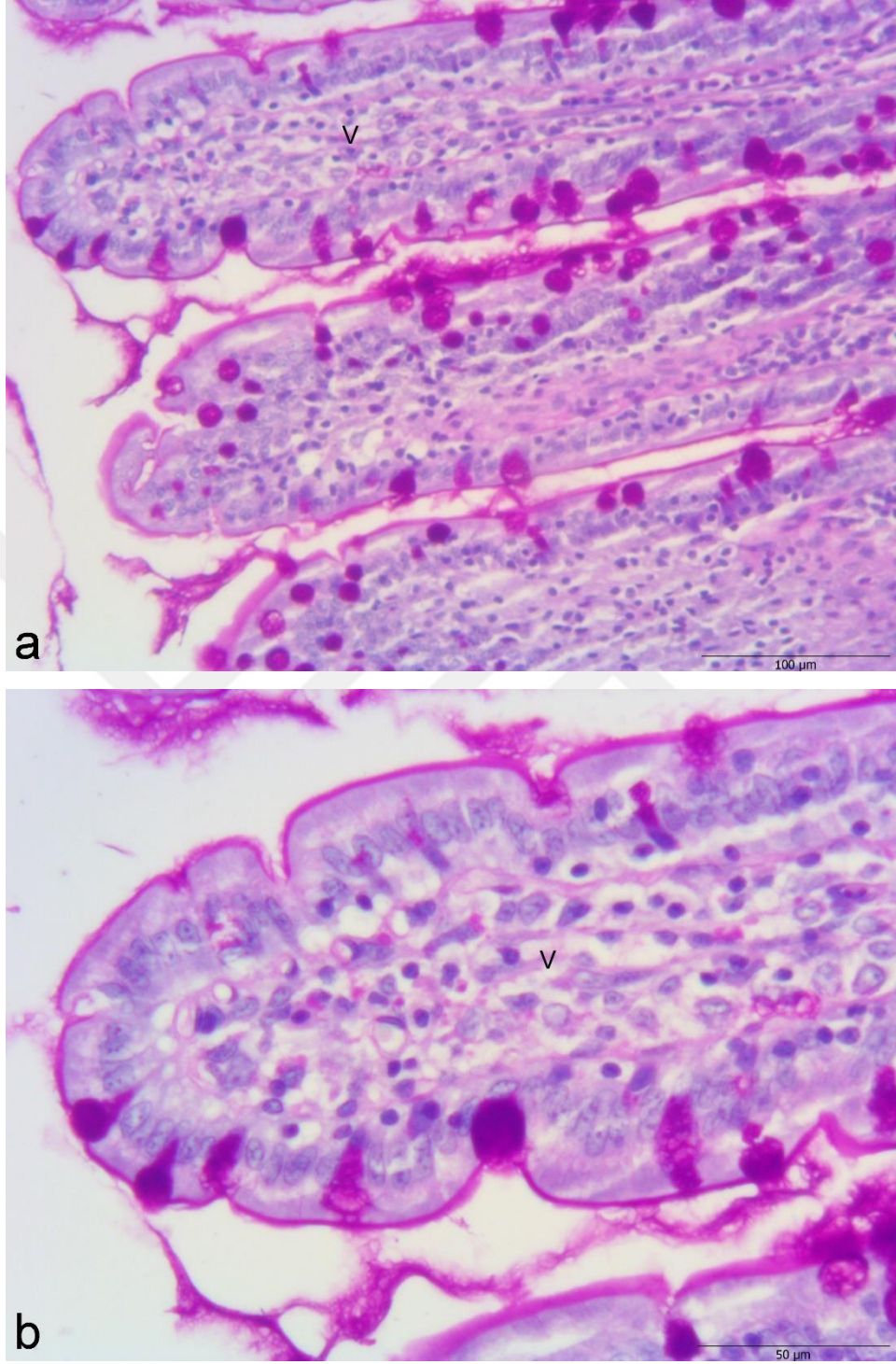


Şekil 4.2.2: İnce bağırsağa ait goblet hücresi dağılımı. ****p<0,0001 Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, +++p<0,005 LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

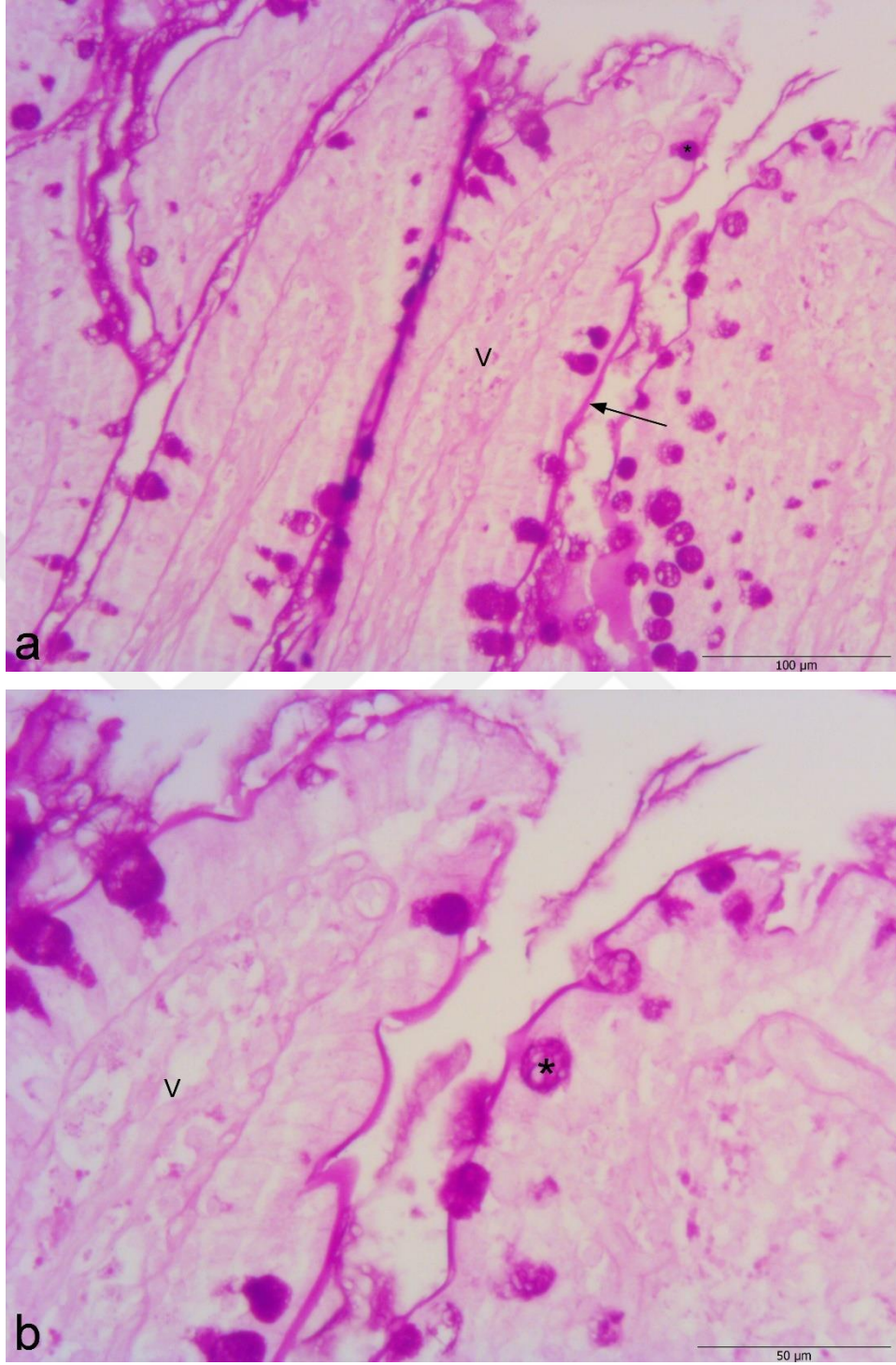
Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde, ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi (Şekil 4.2.3). PAS ve HE-PAS boyalarının uygulandığı kesitlerde, ince bağırsağın ileum bölgesinde lümeneye doğru epitel ve lamina propreanın yaptığı çıkıntılar olan ince uzun villuslarda epitel, tek katlı silindirik epiteldir. Villuslar arasında yer alan kriptlerde de villus epitelini devam ettirmektedir. Bu epitel uzun, silindirik, absorptif (emici) hücreler ile bu hücreler arasında yer alan goblet hücrelerinden oluşmuştur.

Epitel hücreleri, apikallerinde çizgili kenarı içerirler. Goblet hücreleri ise absorptif hücreler arasında yer alan, mukus içeren ve salgılayan hücrelerdir. Bu hücrelerin mukus salgısı ve absorptif hücrelerin çizgili kenarı, şiddetli PAS pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.2.4). Prebiyotik ve Probiyotik uygulanan gruplarda genel olarak kontrol grubuna benzer bir yapı hakimdi (Şekil 4.2.5, 4.2.7). Goblet hücreleri ve çizgili kenarda PAS reaksiyonu kuvvetliydi (Şekil 4.2.6, 4.2.8).

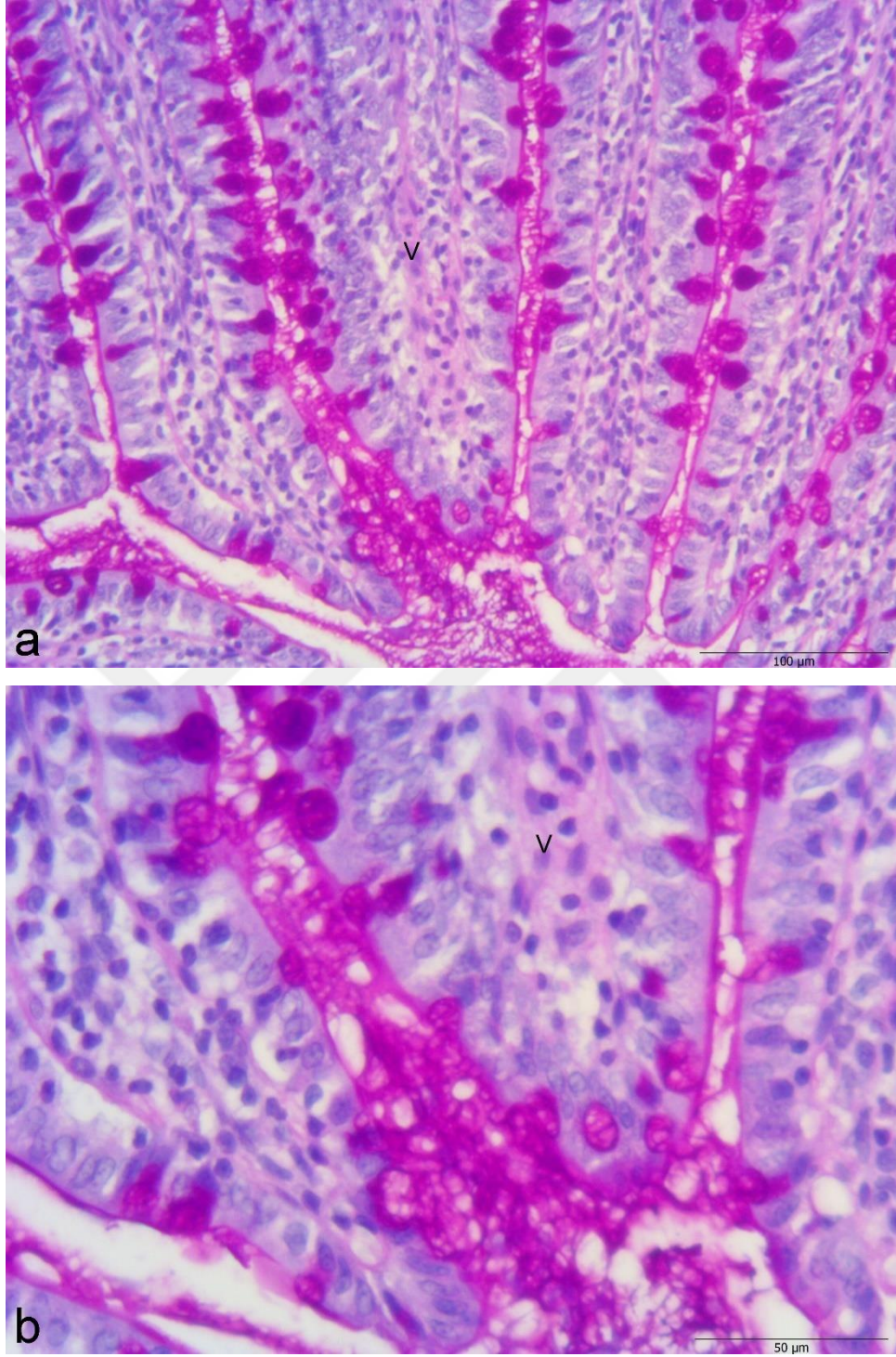
LPS grubuna ait kesitlerde kontrol grubundaki bireylerle karşılaştırıldığında mikroskobik olarak belirgin bir hasar tespit edilmiştir. Epitelde parçalanma, bazal membranın devamsızlığı ve hasarı, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, çizgili kenarlarda devamsızlık, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, villusların lamina propreasında ödem bu grupta belirgin olarak gözlenen bulgulardır (Şekil 4.2.9). Goblet hücrelerinde gözlenen PAS reaksiyon şiddetinin ve goblet hücre sayısının ise kontrol bireylerine göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.10). LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik gruplarının da LPS grubu ile benzer histolojik hasarlar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.11, 4.2.13). Goblet hücrelerinde gözlenen PAS reaksiyon şiddetinin ve goblet hücre sayısının ise LPS + Prebiyotik grubunda, LPS grubuna göre daha fazla olsa da (Şekil 4.2.12), LPS + Probiyotik grubunda benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.14).



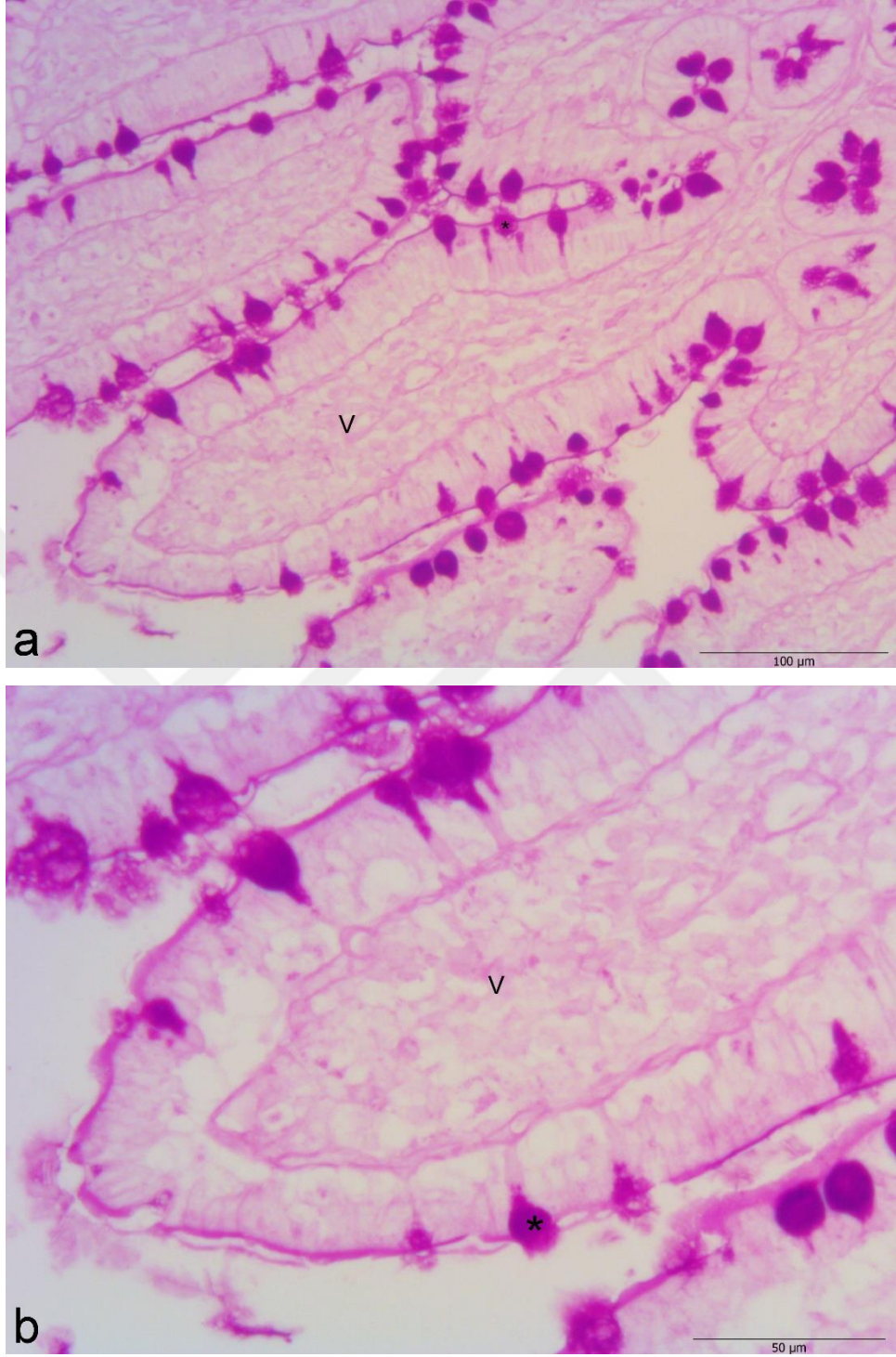
Şekil 4.2.3: Kontrol grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



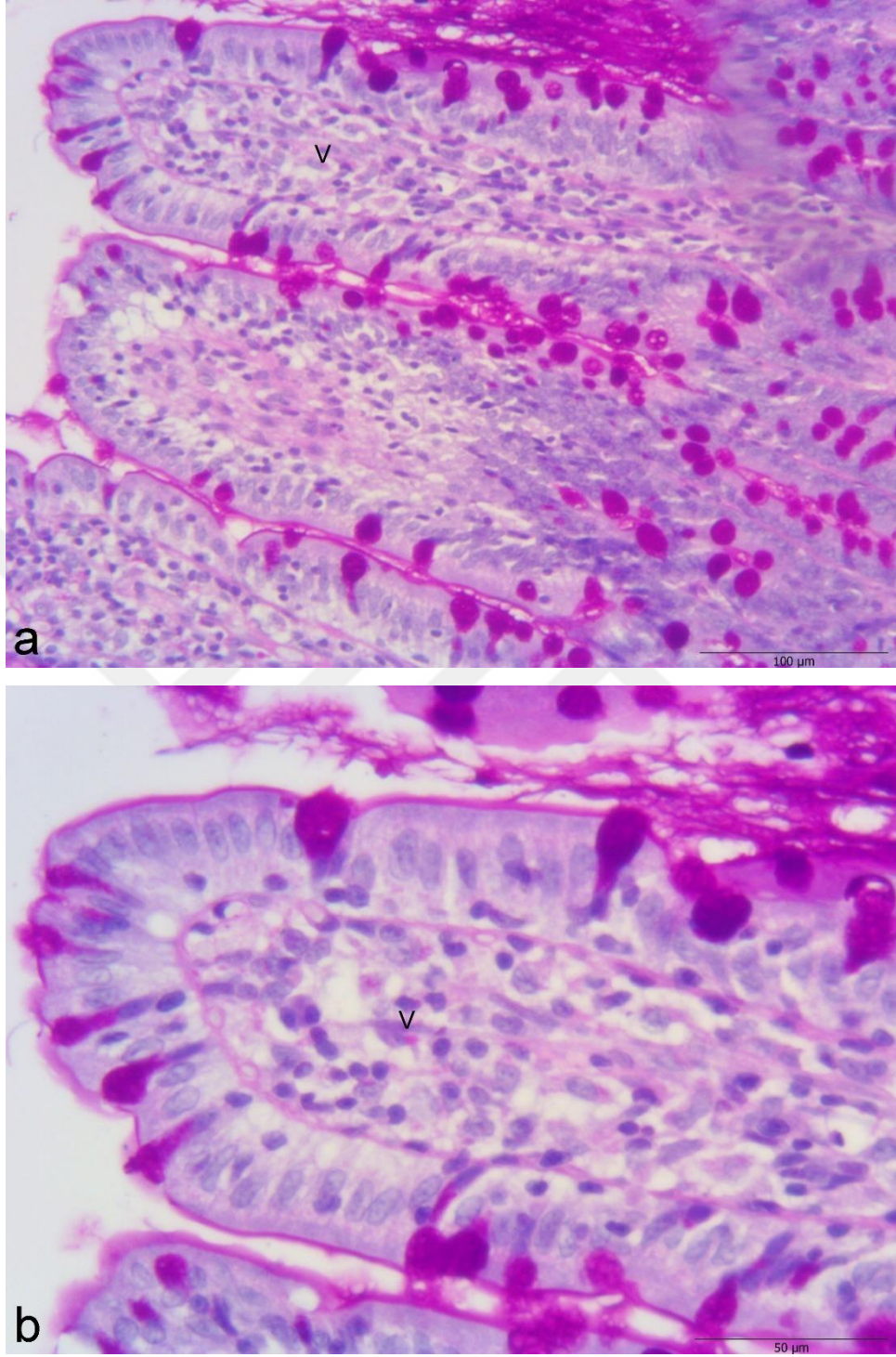
Şekil 4.2.4: Kontrol grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu (→). Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 μm, b) Bar: 50 μm.



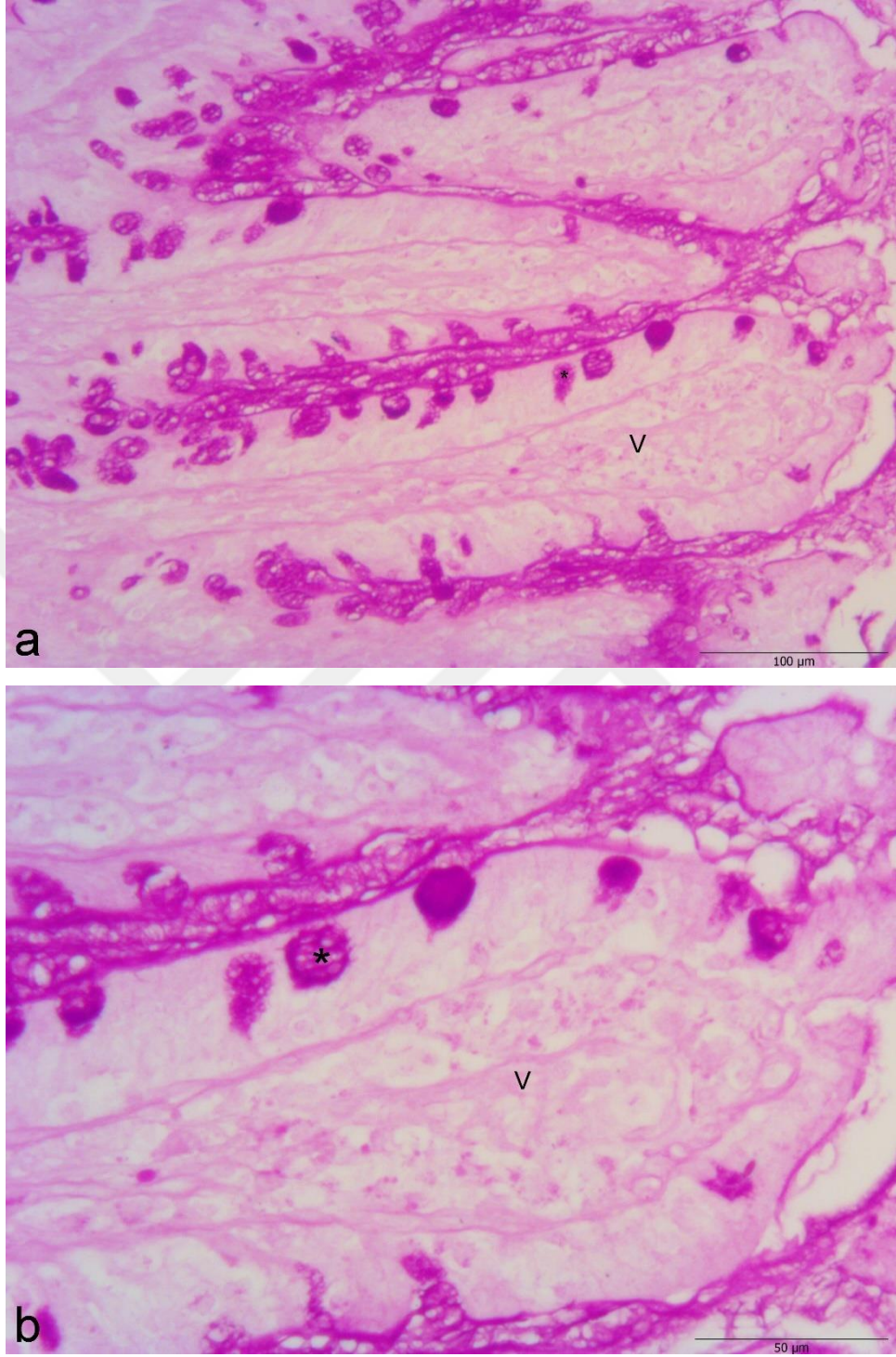
Şekil 4.2.5: Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



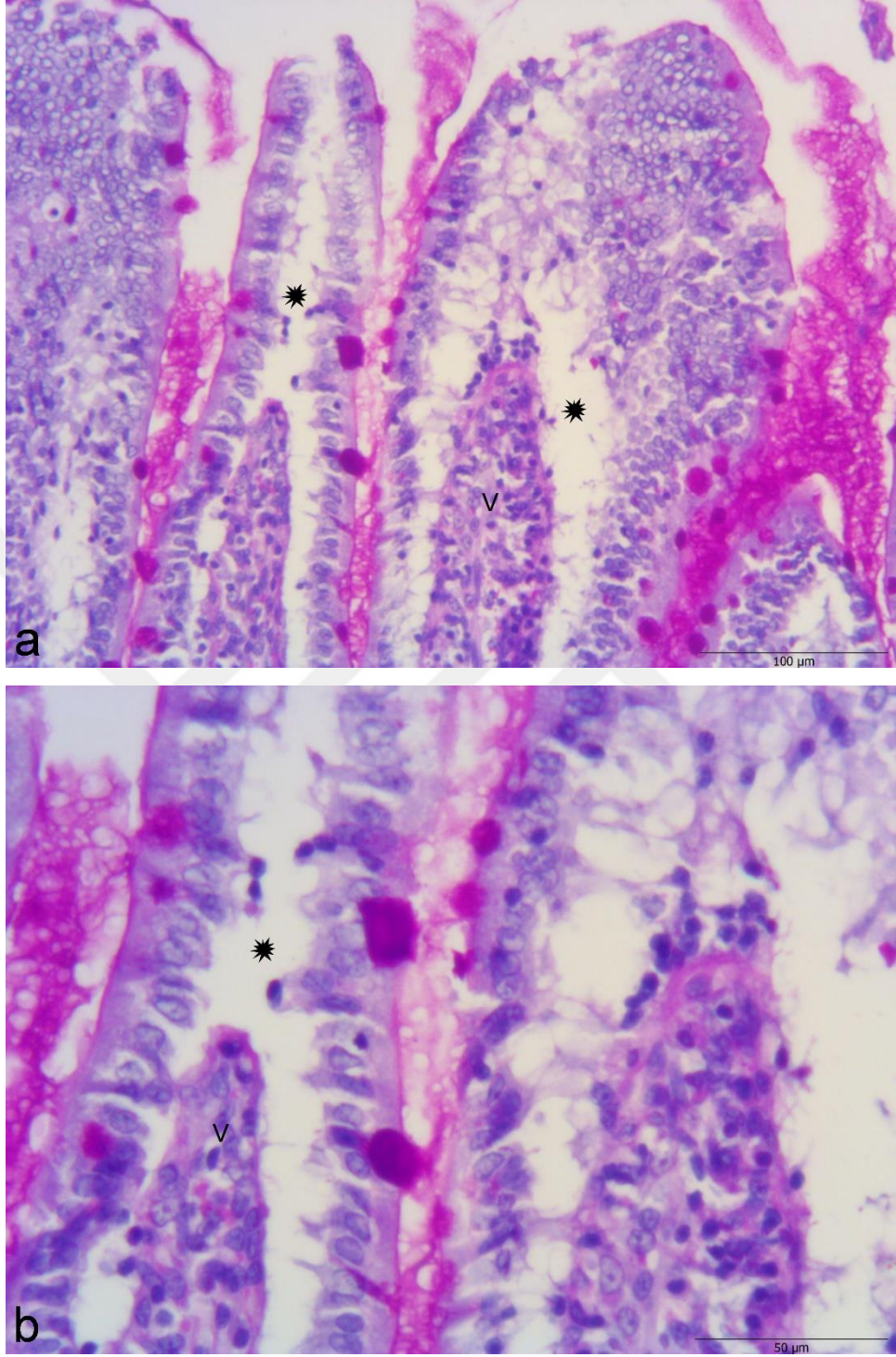
Şekil 4.2.6: Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



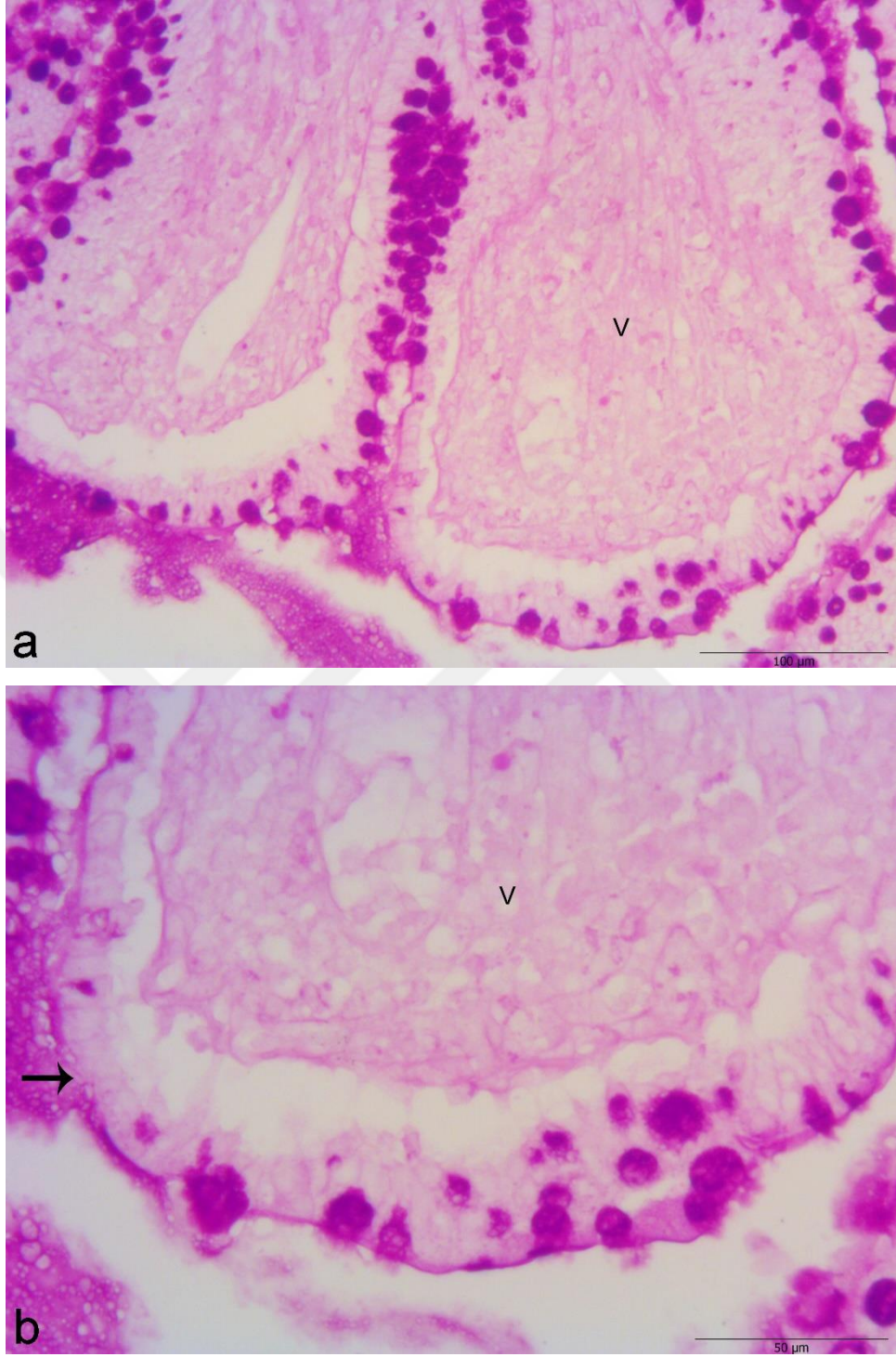
Şekil 4.2.7: Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında villusların (V) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



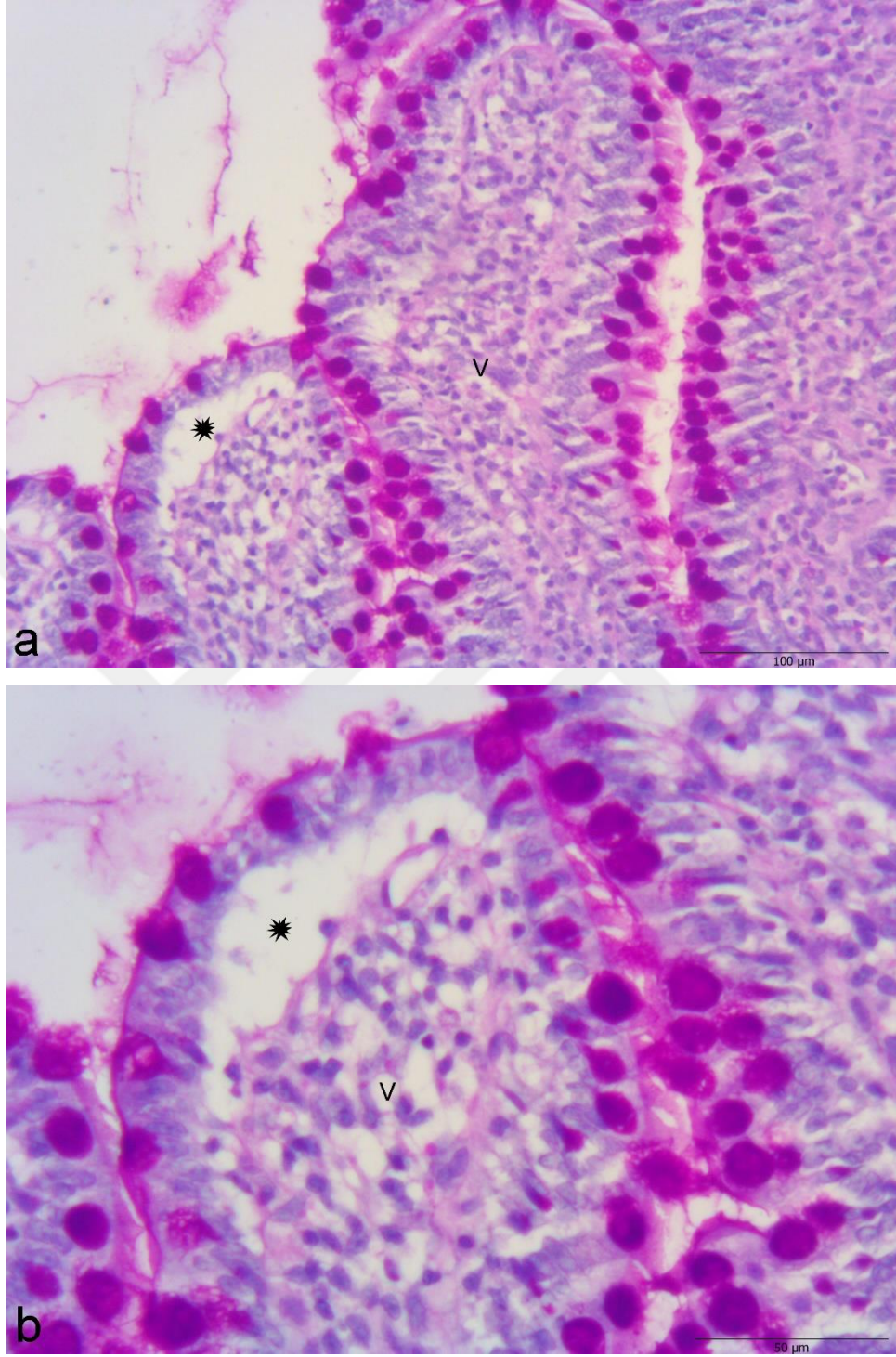
Şekil 4.2.8: Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



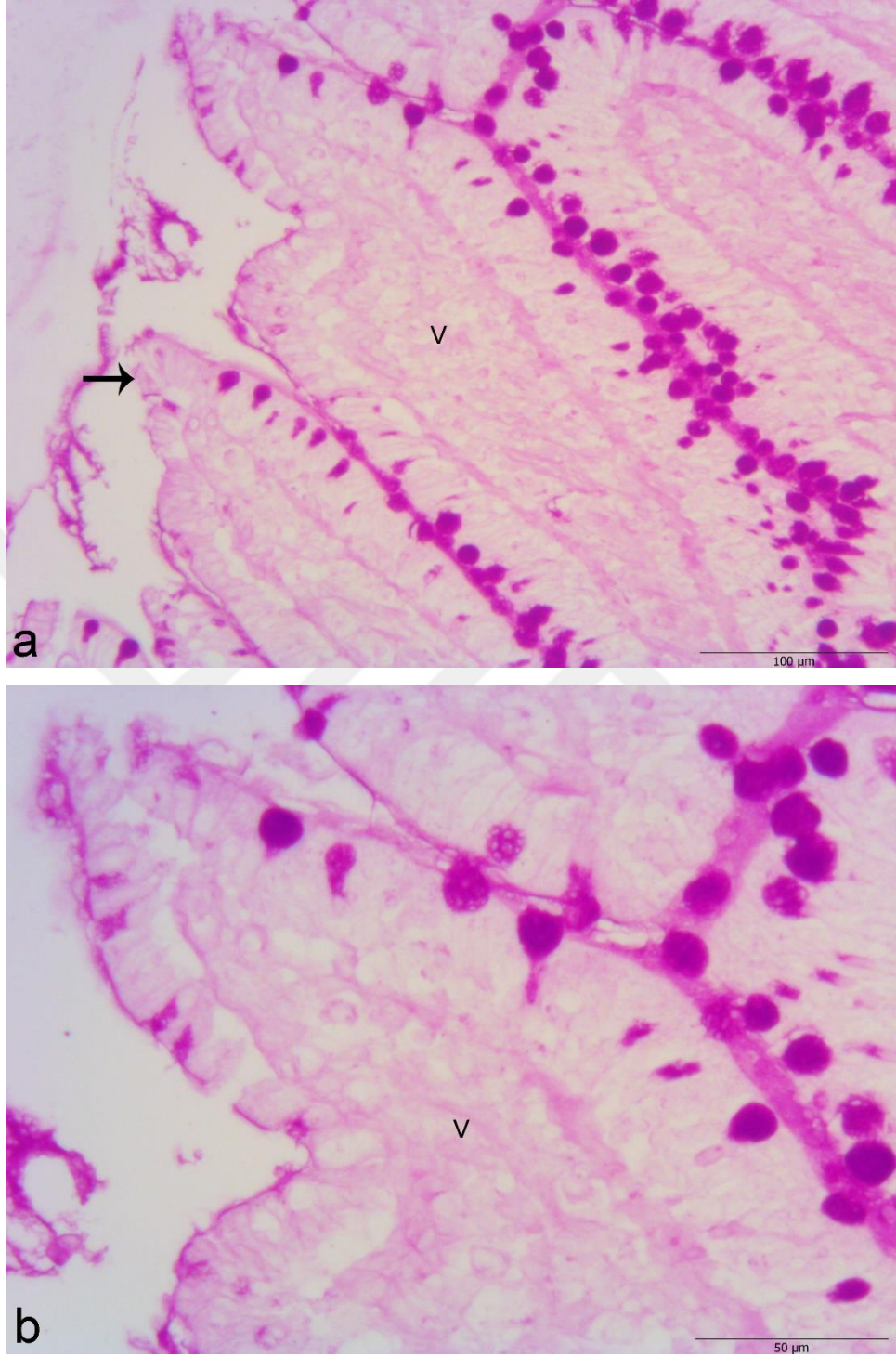
Şekil 4.2.9: LPS grubuna ait ince bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propriasında ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



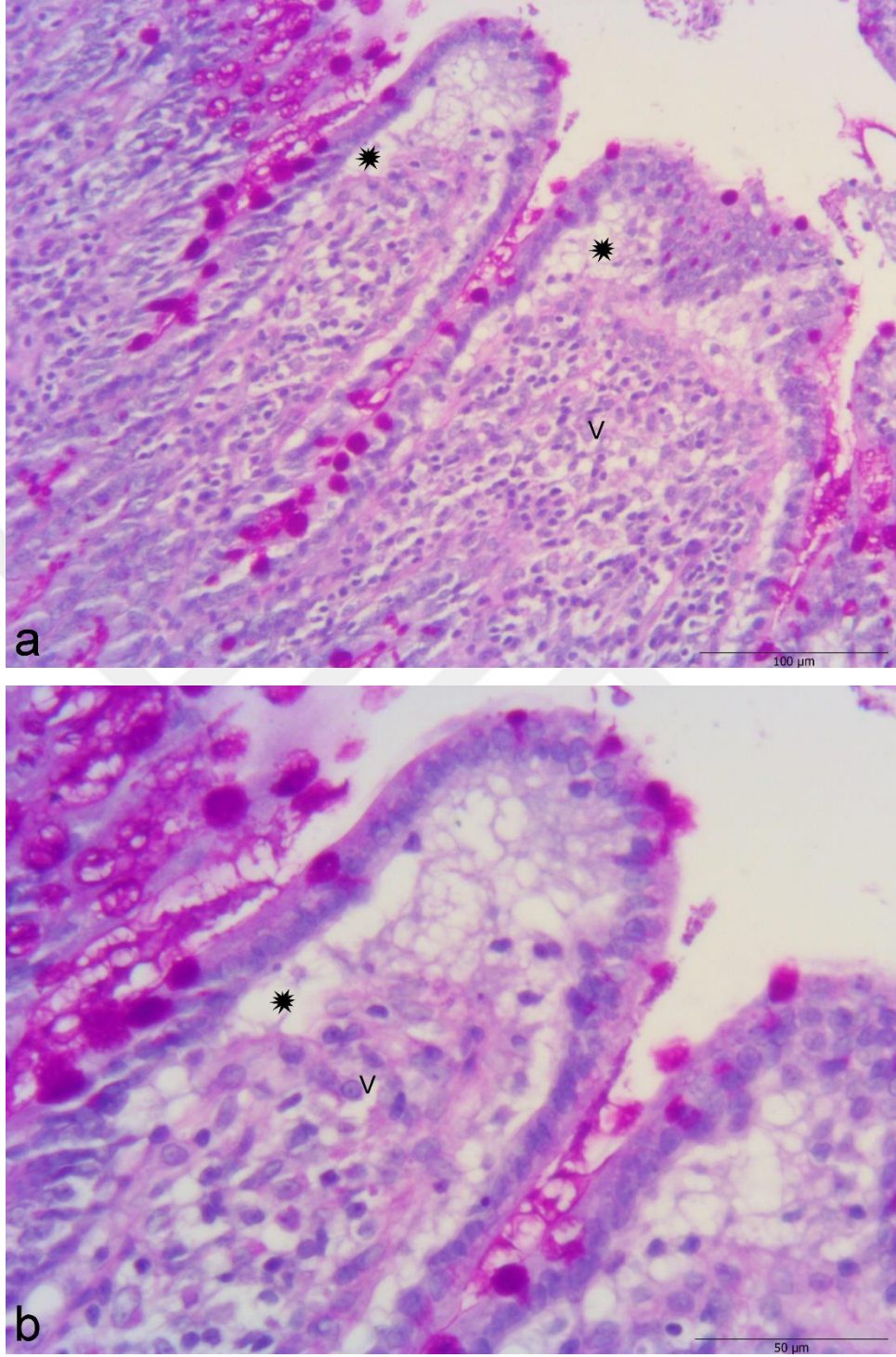
Şekil 4.2.10: LPS grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



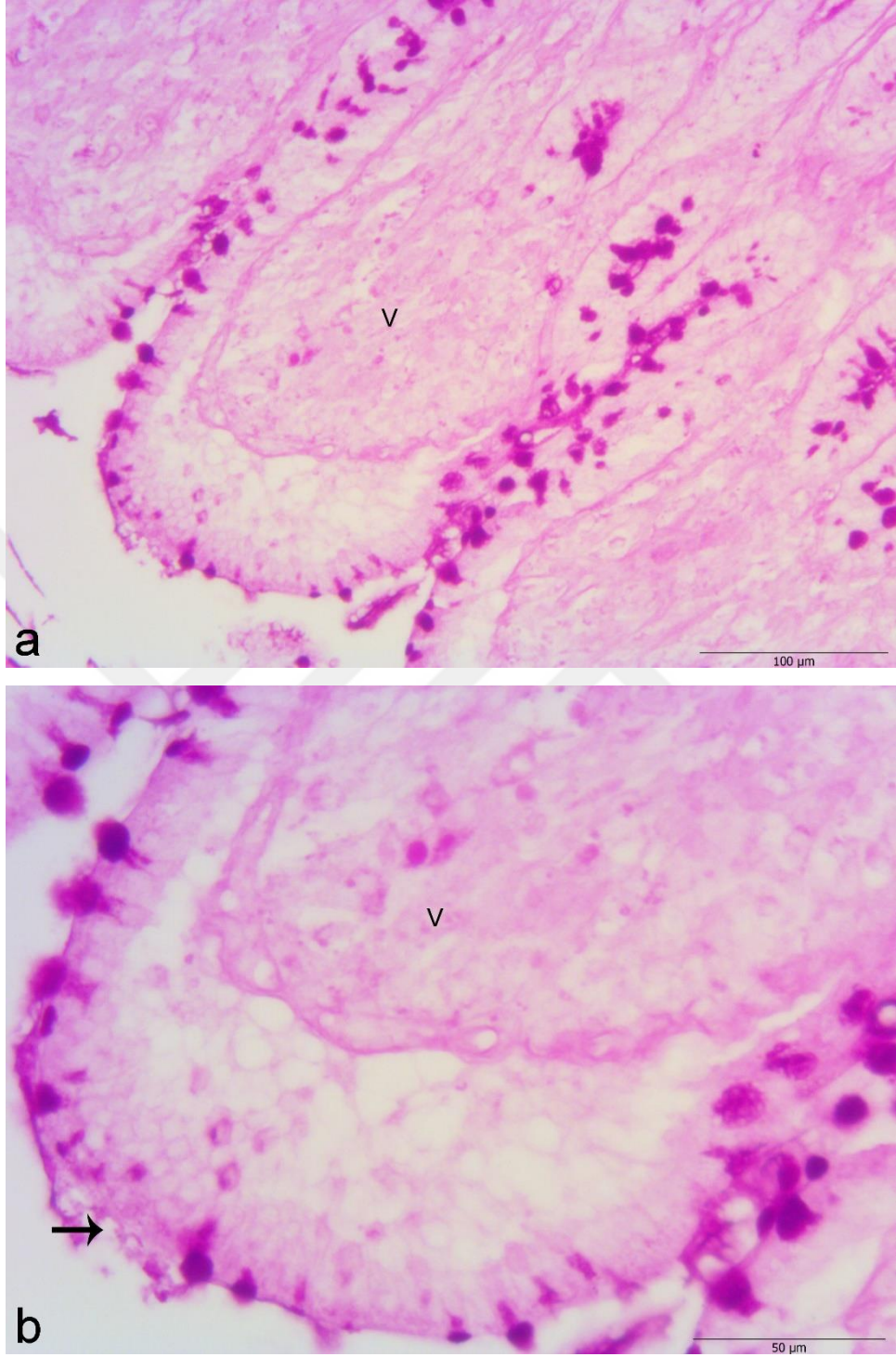
Şekil 4.2.11: LPS + Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitinin, H + PAS boyamasında, epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propriasında ödem (*).
a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.12: LPS + Prebiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.13: LPS + Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitinin, H + PAS boyamasında, epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve villuslarının lamina propriasında ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.14: LPS + Probiyotik grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde villusların (V) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.

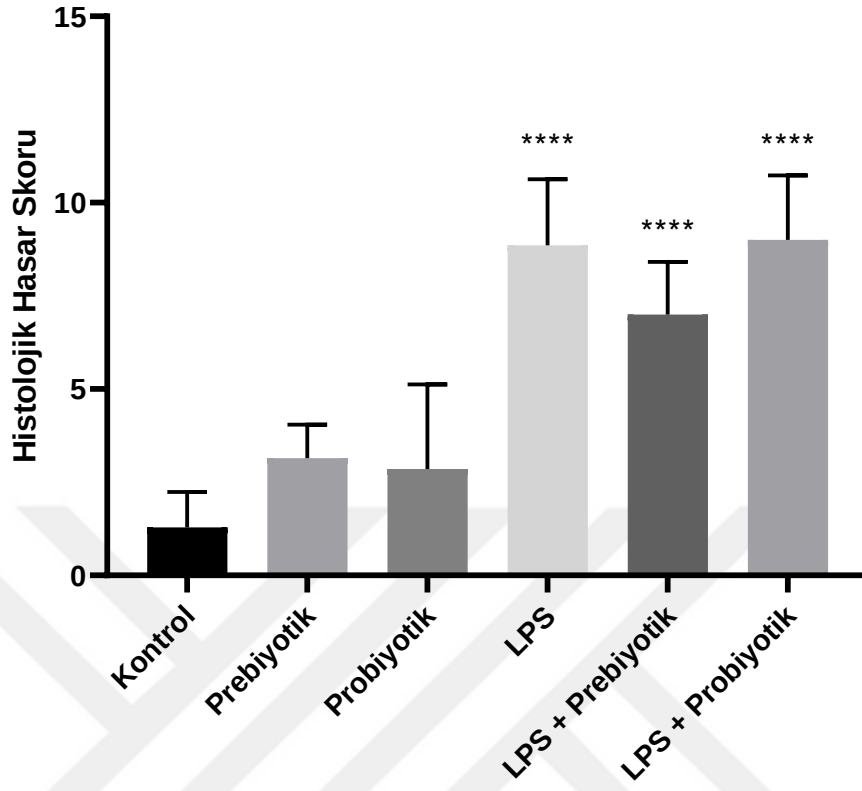
Kalın bağırsağın histolojik hasar skoru değerlendirmesinde; çizgili kenarda devamsızlık, bazal membran hasarı, kript bütünlüğünde bozulma, epitel bütünlüğünün bozulması, lamina propriada ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve epitel ile bazal membranın bağlantısının kopması gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak, her bir bireye ait kesitler skorlandı. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar) veya 3 (şiddetli hasar) şeklinde derecelendirildi.

Işık mikroskobu ile tespit edilen yarı-kantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 4.2.2’de ve istatistiksel olarak değerlendirilen bulgular Şekil 4.2.15’te gösterilmiştir. Kalın bağırsakta hasar derecesi en yüksek olan LPS + Probiyotik grubu olmuştur. Kontrol bireyler ile kıyaslandığında LPS ve LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik verilen gruplarda histolojik hasar skoru istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,0001$). LPS grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir.

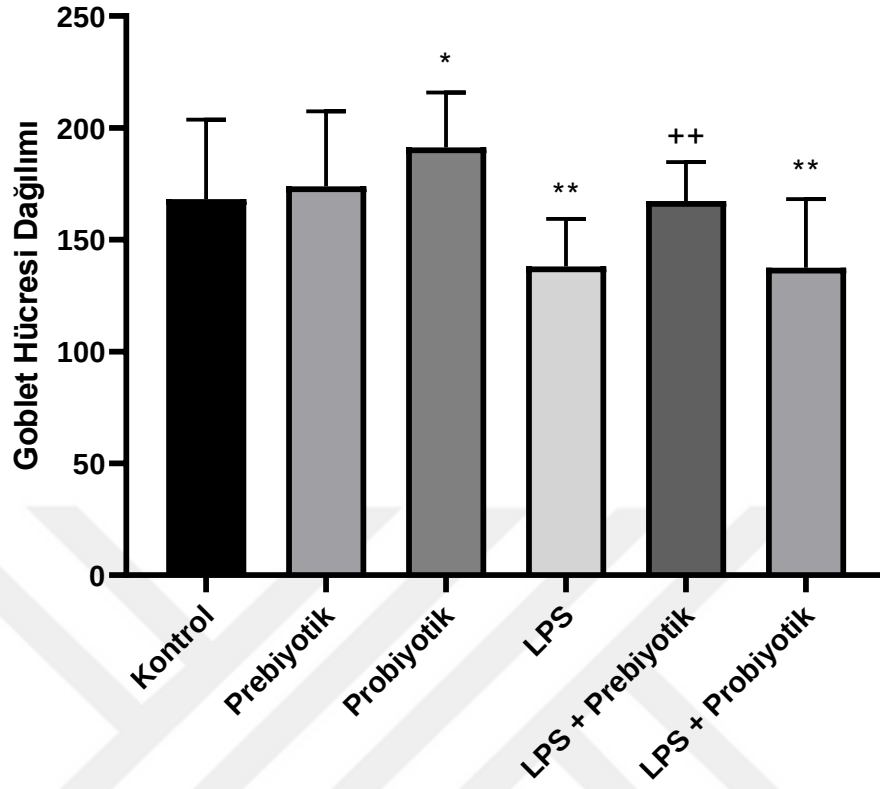
PAS boyası ile boyanan kalın bağırsaktaki goblet hücrelerinin dağılımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi (Şekil 4.2.16). Kontrol grubu ile kıyaslandığında Probiyotik ($p<0,05$) grubunda goblet hücrelerinin dağılımı anlamlı bir şekilde artarken, LPS ve LPS + Probiyotik ($p<0,01$) gruplarında, goblet hücrelerinin dağılımı anlamlı bir düşüş gösterdi. LPS grubuna göre LPS + Prebiyotik grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,01$).

Tablo 4.1.2: Kalın bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.

Histolojik Kriterler	Kontrol (n=6)	Prebiyotik (n=6)	Probiyotik (n=8)	LPS (n=7)	LPS + Prebiyotik (n=6)	LPS + Probiyotik (n=6)
Çizgili kenarda devamsızlık	0	2	5	8	8	10
Bazal membran hasarı	0	3	2	9	8	9
Kript bütünlüğünde bozulma	2	3	0	12	9	11
Epitel bütünlüğünün bozulması	2	2	0	9	5	8
Lamina propreada ödem	2	4	5	6	6	7
Epitel hücrelerinde vakuolizasyon	2	4	5	9	7	11
Epitel ile bazal membran bağlantısının kopması	1	4	3	9	6	7
Ortalama Değer	1,28	3,14	2,85	8,85	7	9



Şekil 4.2.15: Kalın bağırsağa ait histolojik hasar skoru. **** $p < 0,0001$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

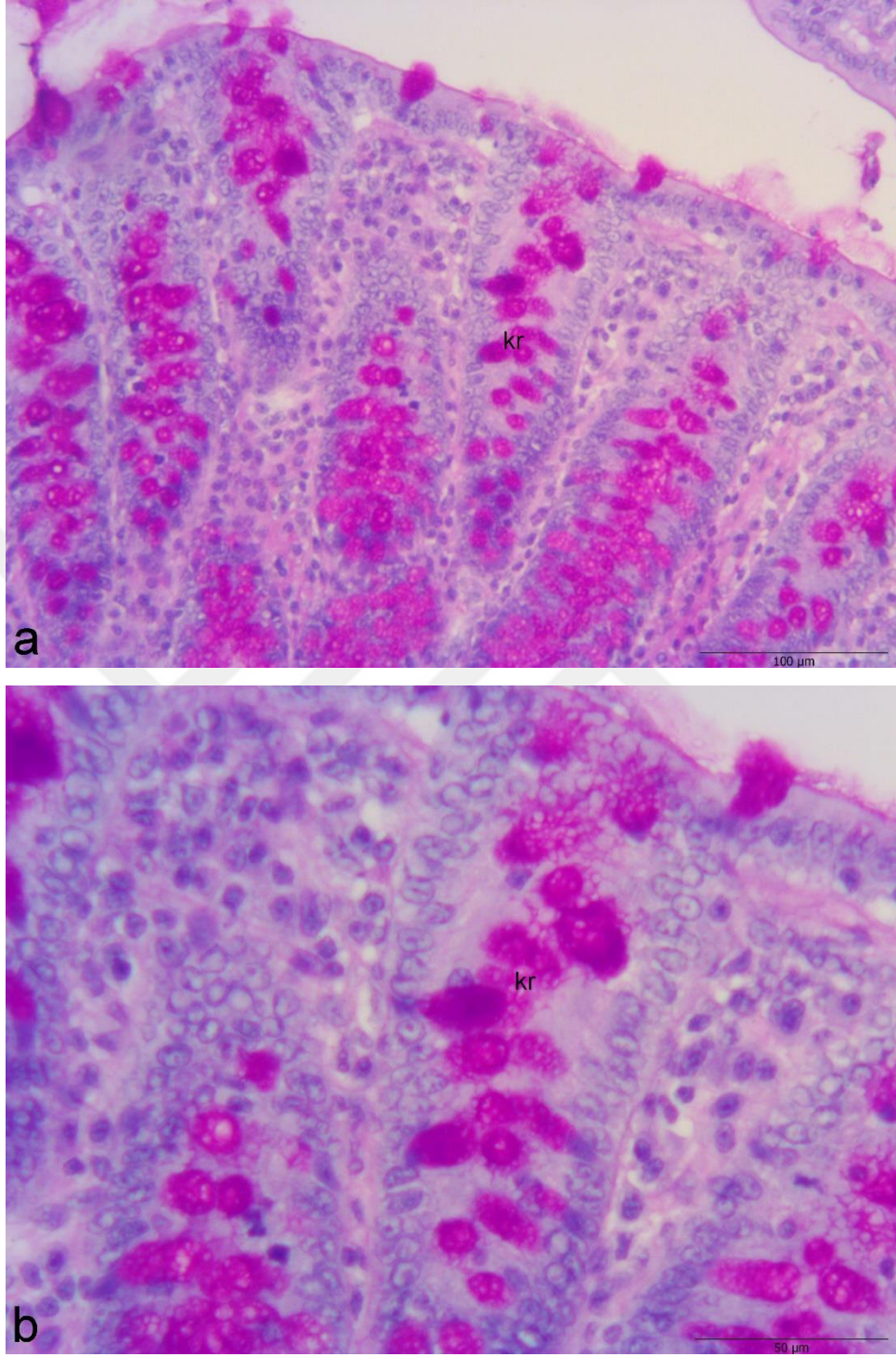


Şekil 4.2.16: Kalın bağırsağa ait goblet hücresi dağılımı. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, ++ $p < 0,01$ LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

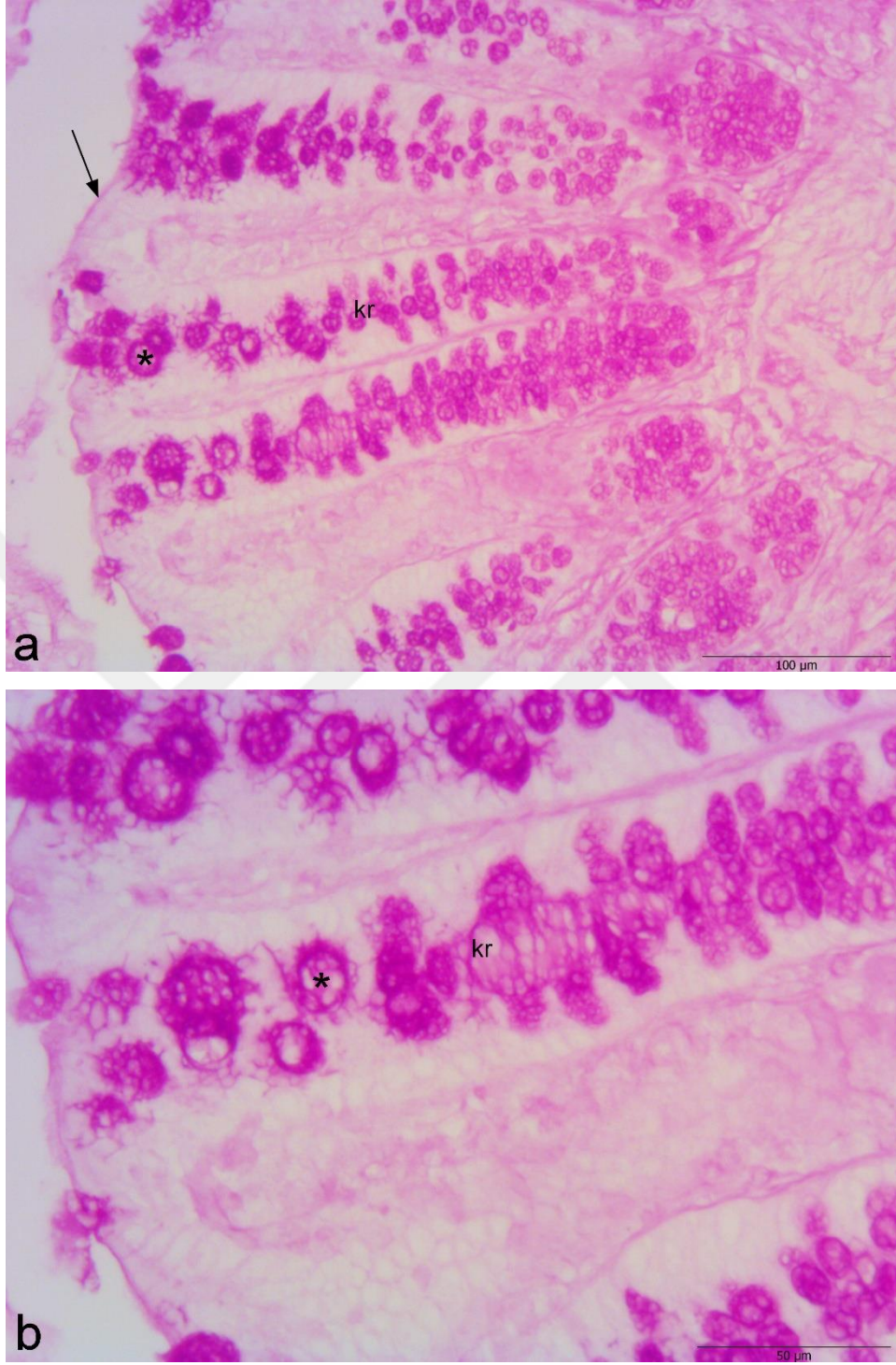
Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde kalın bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi (Şekil 4.2.17). Kolonda epitel, tek katlı silindirik epitel olmakla birlikte, sadece kript yapısı bulunmaktadır. Bu epitel uzun, silindirik, absorptif (emici) hücreler ile bu hücreler arasında yer alan goblet hücrelerinden oluşmuştur.

Epitel hücreleri, apikallerinde çizgili kenarı içerirler. Goblet hücreleri ise absorptif hücreler arasında yer alan, mukus içeren ve salgılayan hücrelerdir. Bu hücrelerin mukus salgısı ve absorptif hücrelerin çizgili kenarı şiddetli PAS pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.2.18). Prebiyotik ve Probiyotik uygulanan gruplarda genel olarak kontrol grubuna benzer bir yapı hakimdi (Şekil 4.2.19, 4.2.21). Goblet hücreleri ve çizgili kenarda PAS reaksiyonu kuvvetliydi (Şekil 4.2.20, 4.2.22).

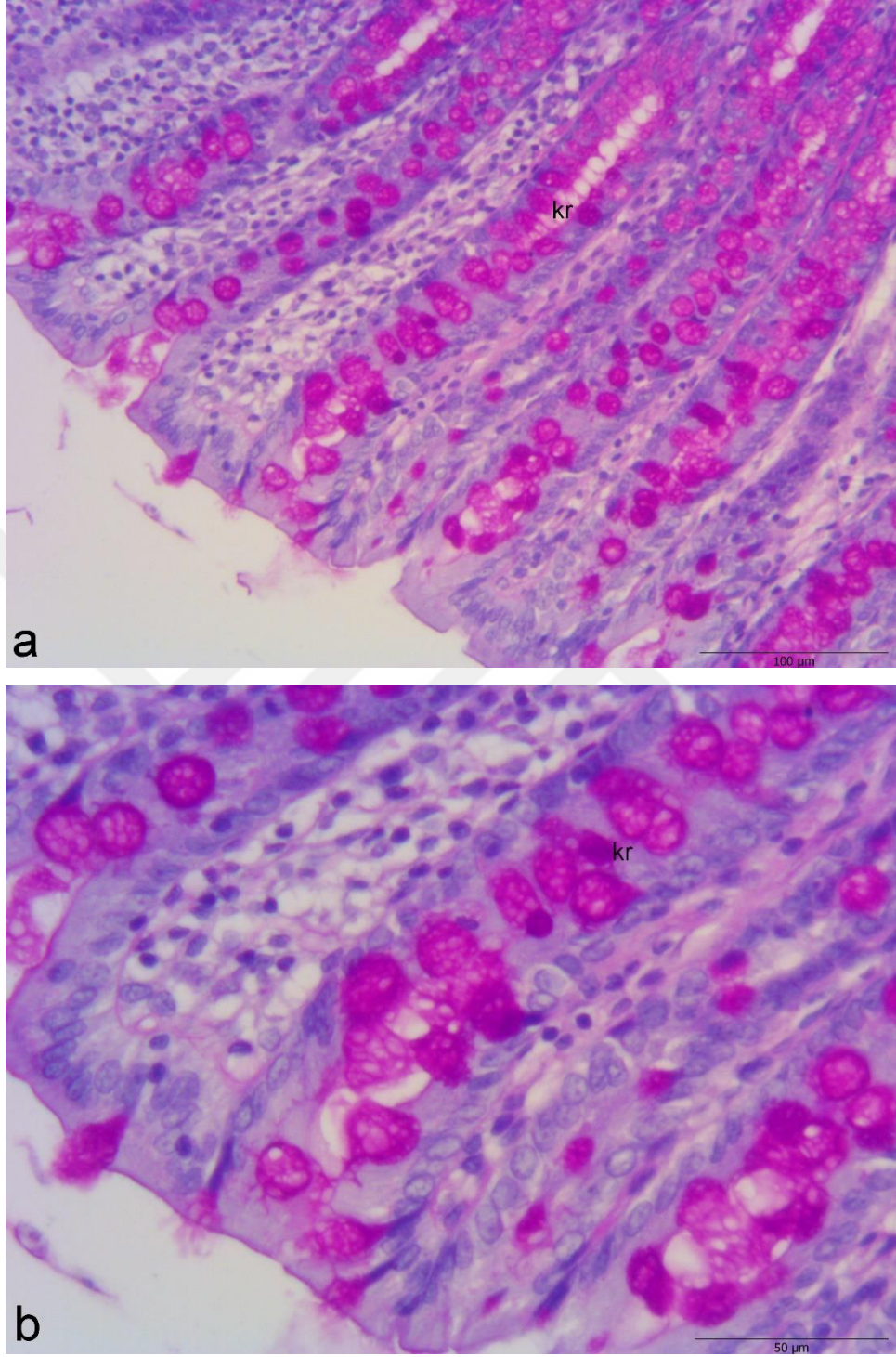
LPS grubuna ait kesitlerde kontrol grubundaki bireylerle karşılaştırıldığında mikroskopik olarak belirgin bir hasar tespit edilmiştir. Epitelde parçalanma, bazal membranın devamsızlığı ve hasarı, kript bütünlüğünde bozulma ve kayıp, çizgili kenarlarda devamsızlık, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, lamina propriada ödem bu grupta belirgin olarak gözlenen bulgulardır (Şekil 4.2.23). Goblet hücrelerinde gözlenen PAS reaksiyon şiddetinin ve goblet hücre sayısının ise kontrol bireylerine göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.24). LPS + Prebiyotik ve LPS + Probiyotik gruplarının da LPS grubu ile benzer histolojik hasarlar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.25, 4.2.27). Goblet hücrelerinde gözlenen PAS reaksiyon şiddetinin ve goblet hücre sayısının ise LPS + Prebiyotik grubunda, LPS grubuna göre daha fazla olsa da (Şekil 4.2.26), LPS + Probiyotik grubunda benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.28).



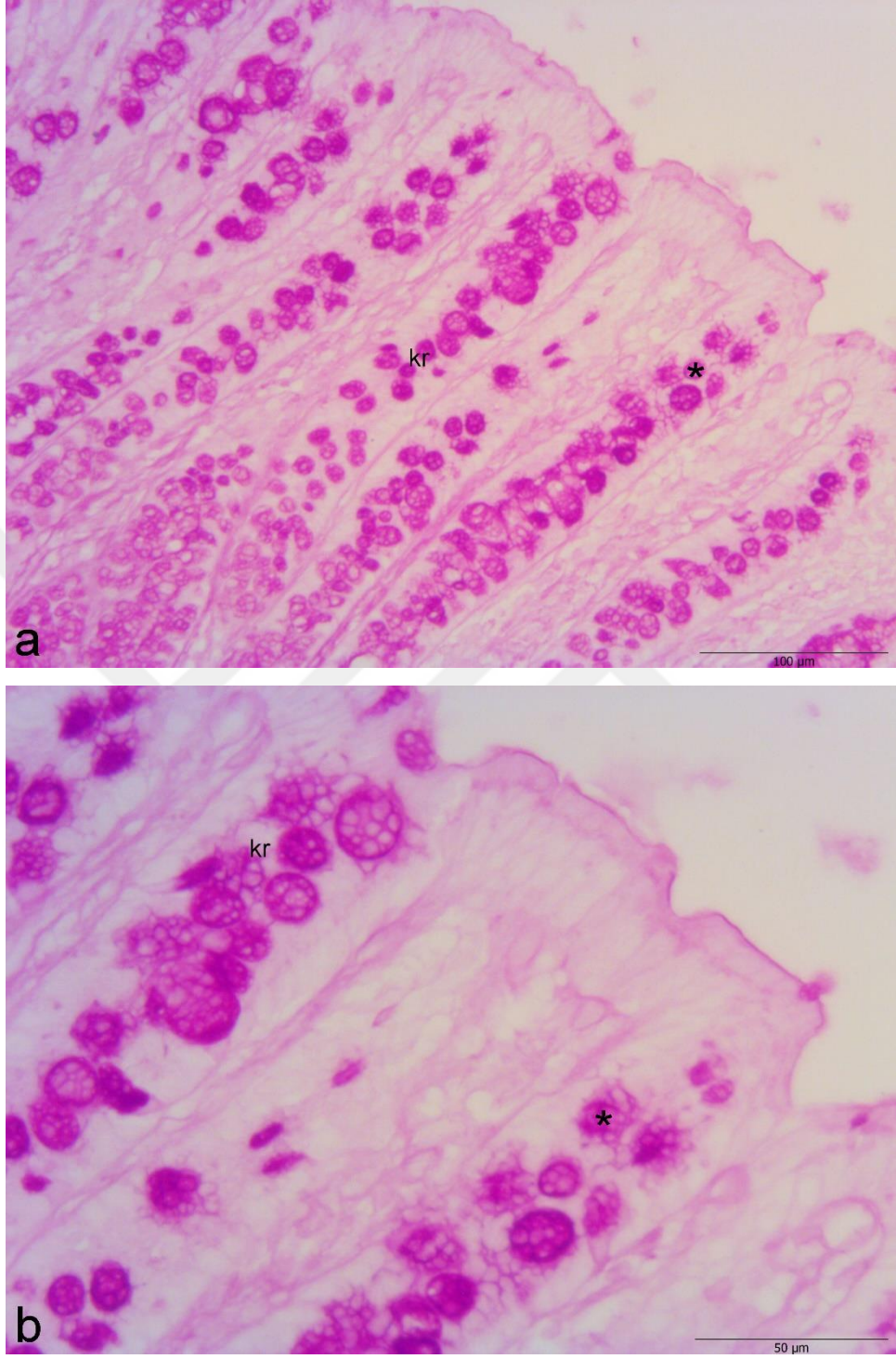
Şekil 4.2.17: Kontrol grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



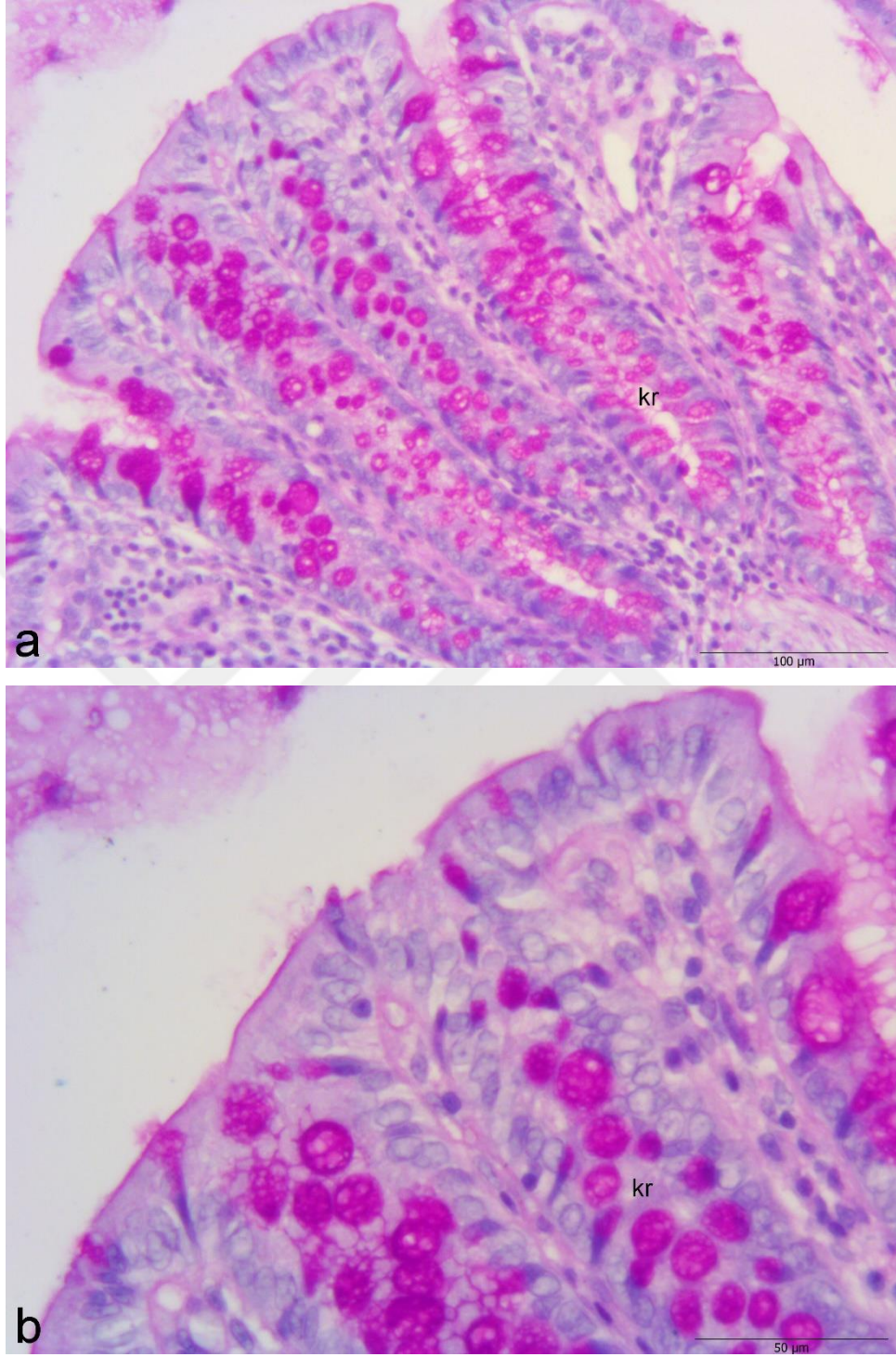
Şekil 4.2.18: Kontrol grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu (→). Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



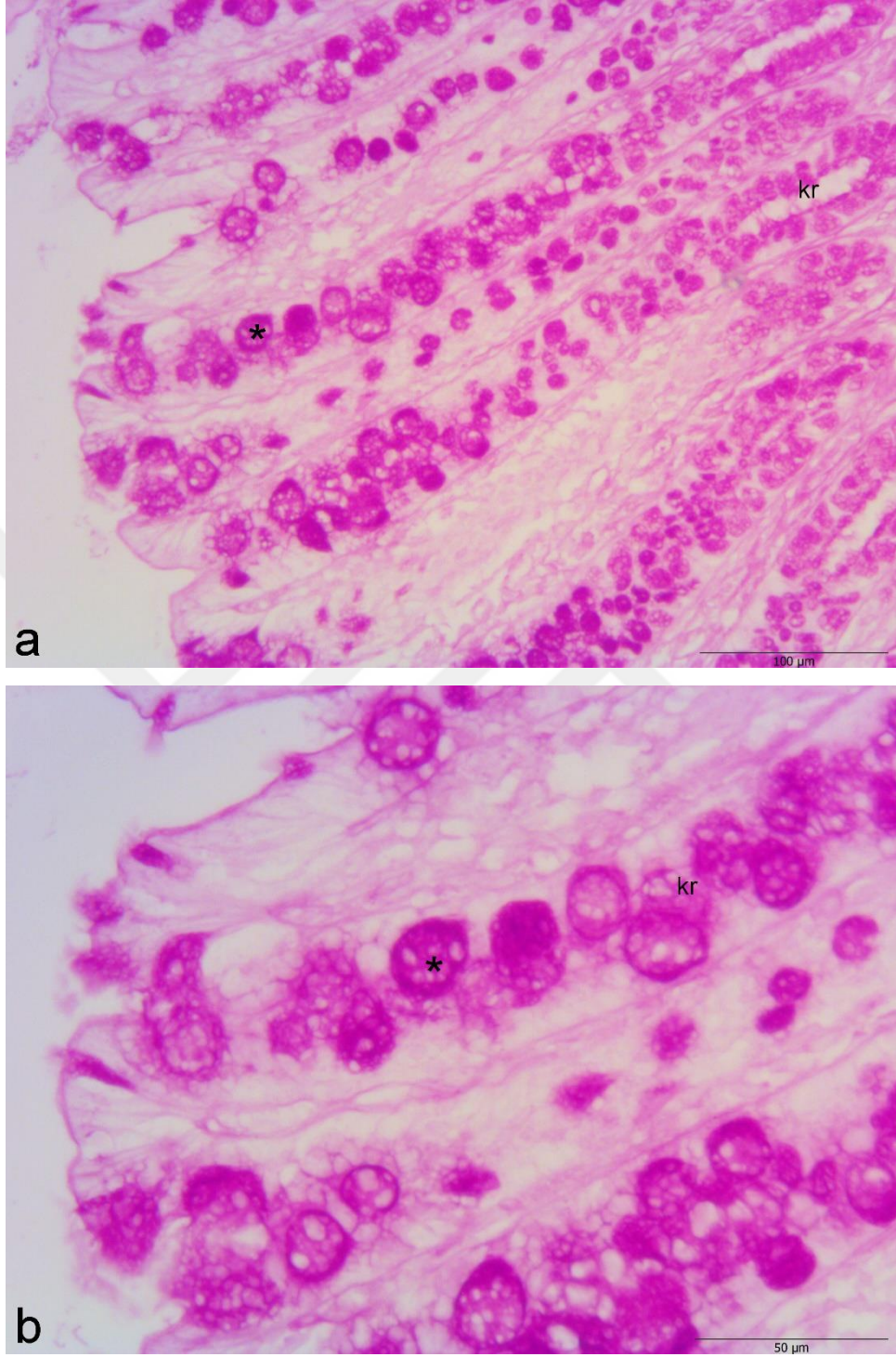
Şekil 4.2.19: Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



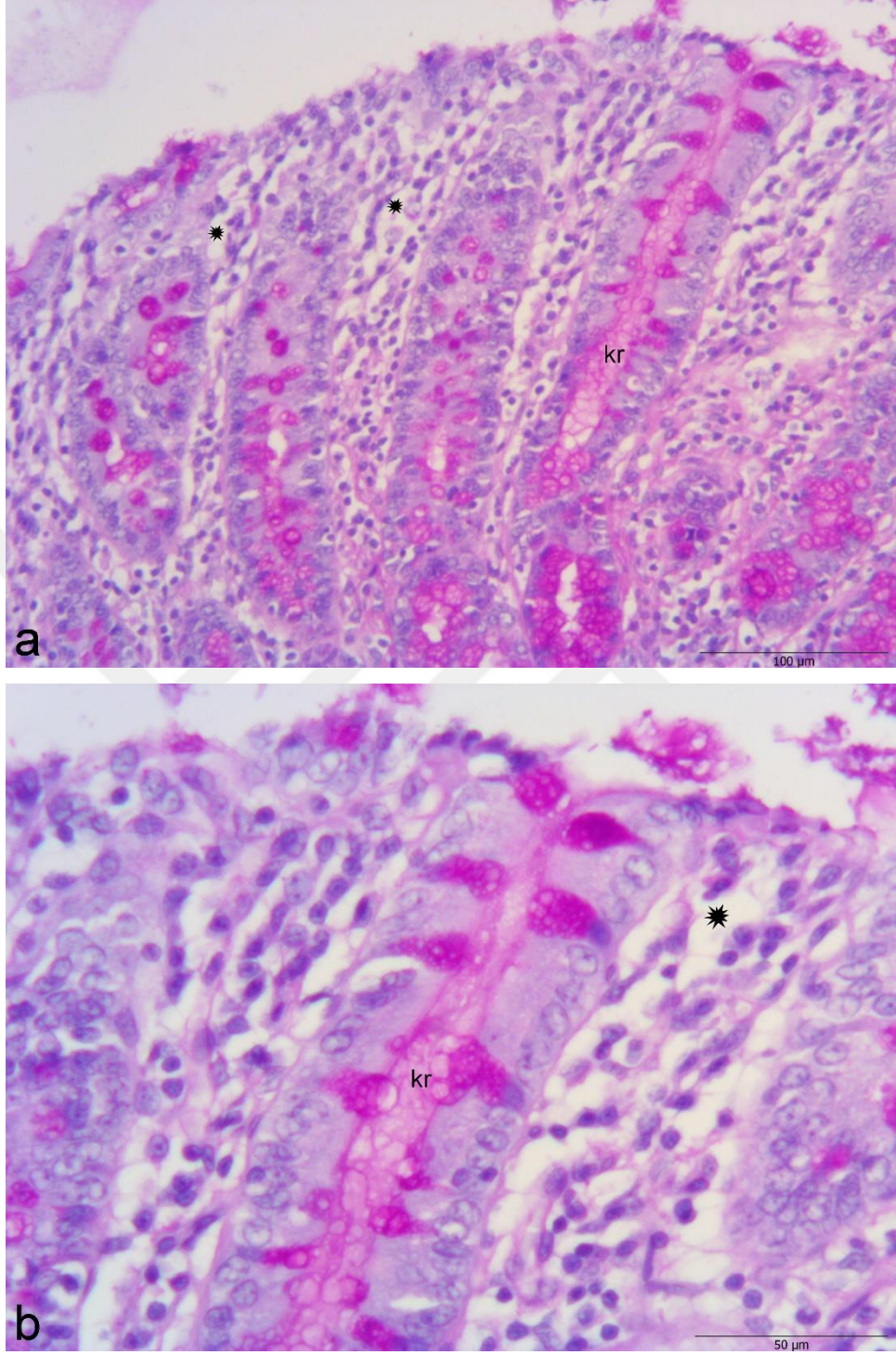
Şekil 4.2.20: Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu. Goblet hücreleri (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



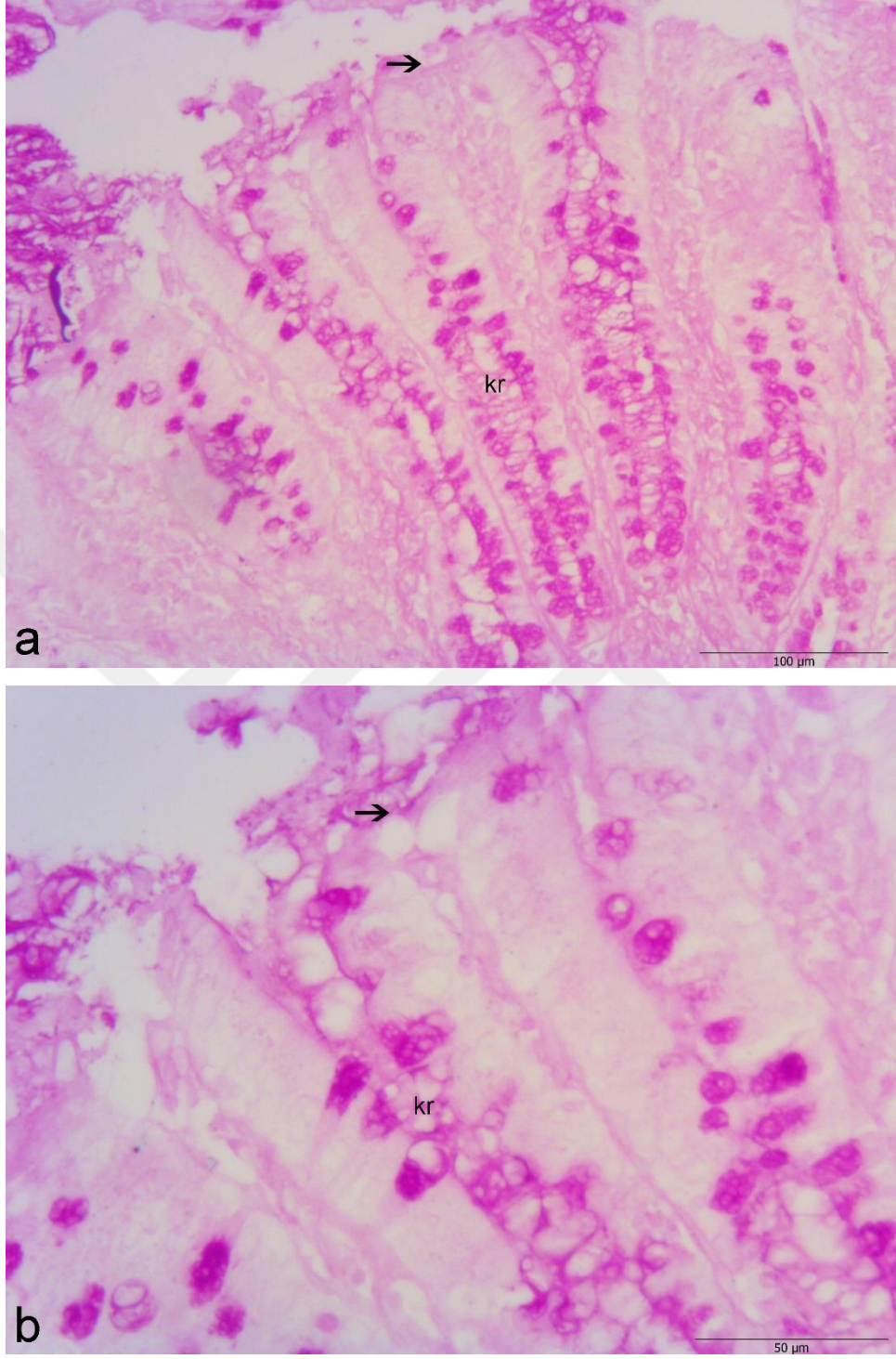
Şekil 4.2.21: Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde H + PAS boyamasında kriptlerin (kr) genel görünümü. a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



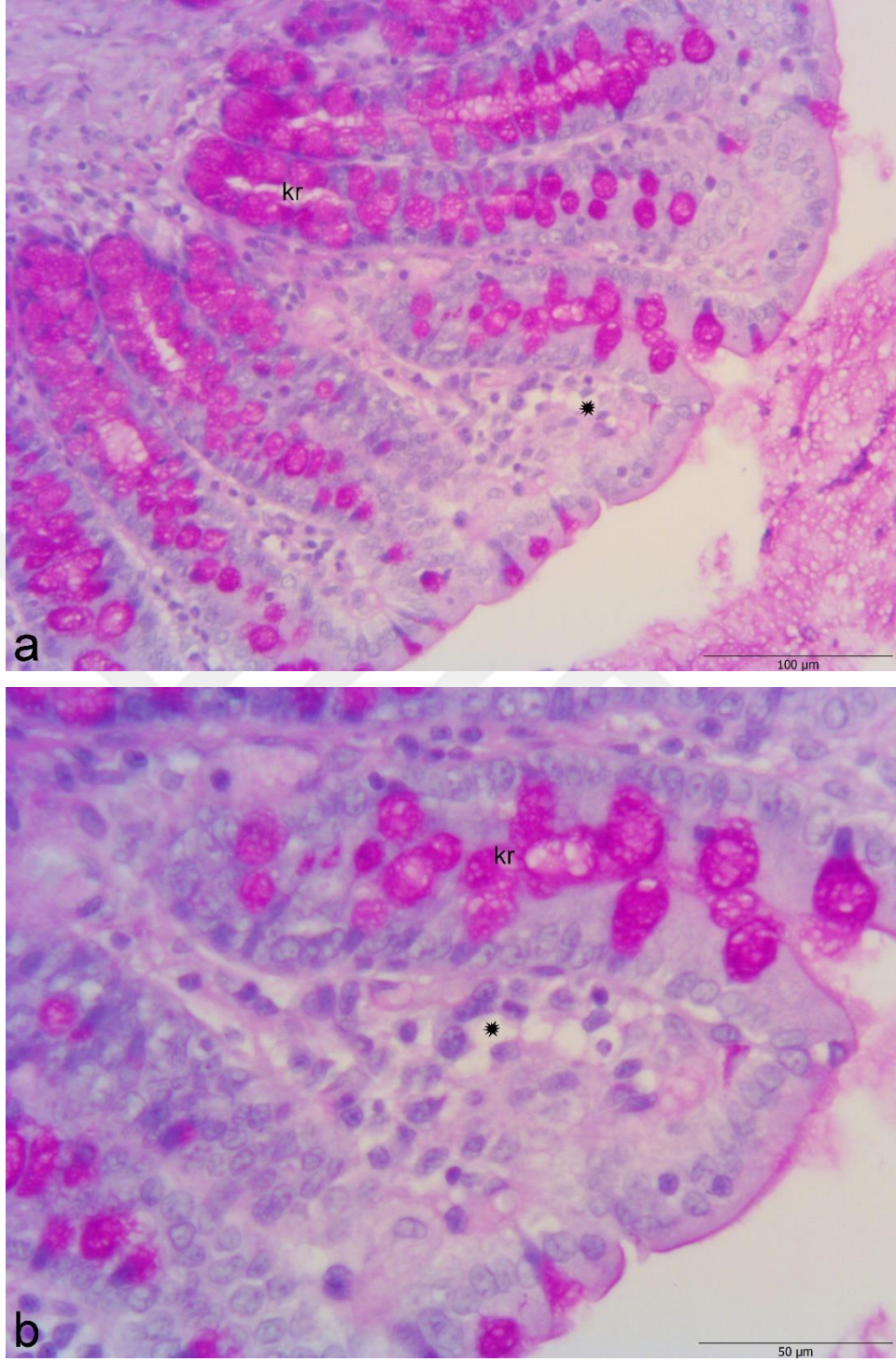
Şekil 4.2.22: Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) PAS reaksiyonu. Goblet hücresi (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



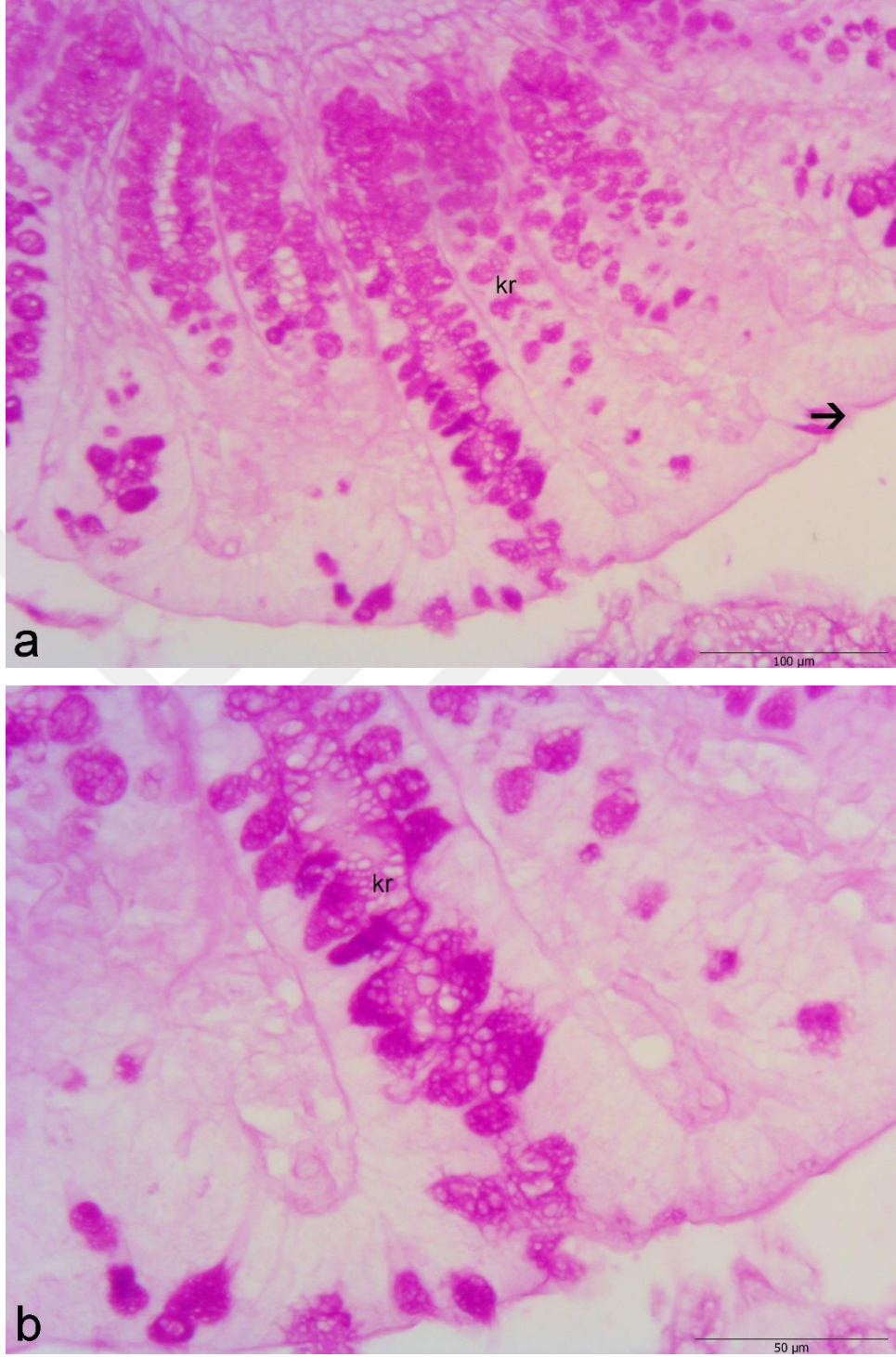
Şekil 4.2.23: LPS grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propriada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



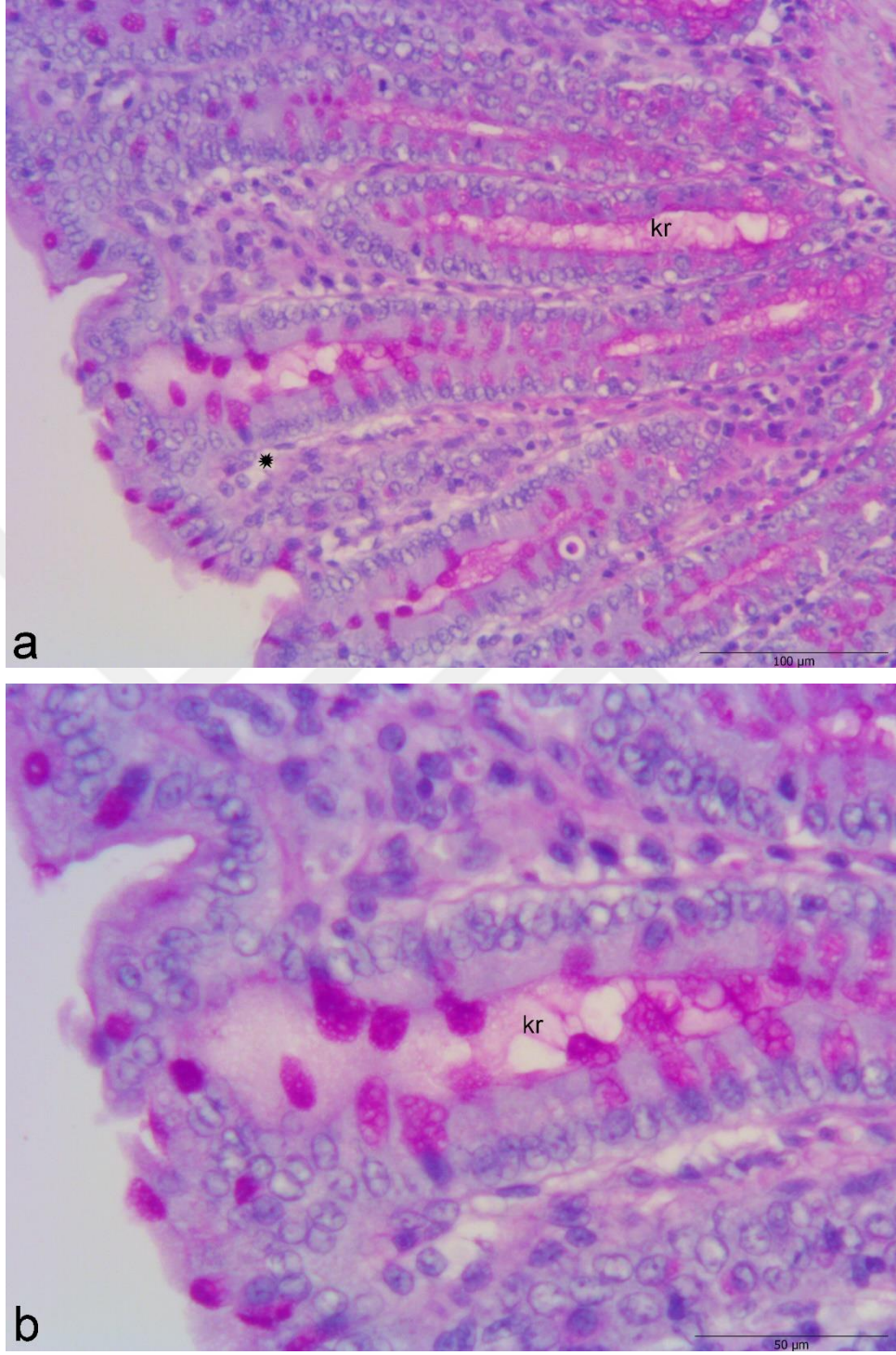
Şekil 4.2.24: LPS grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



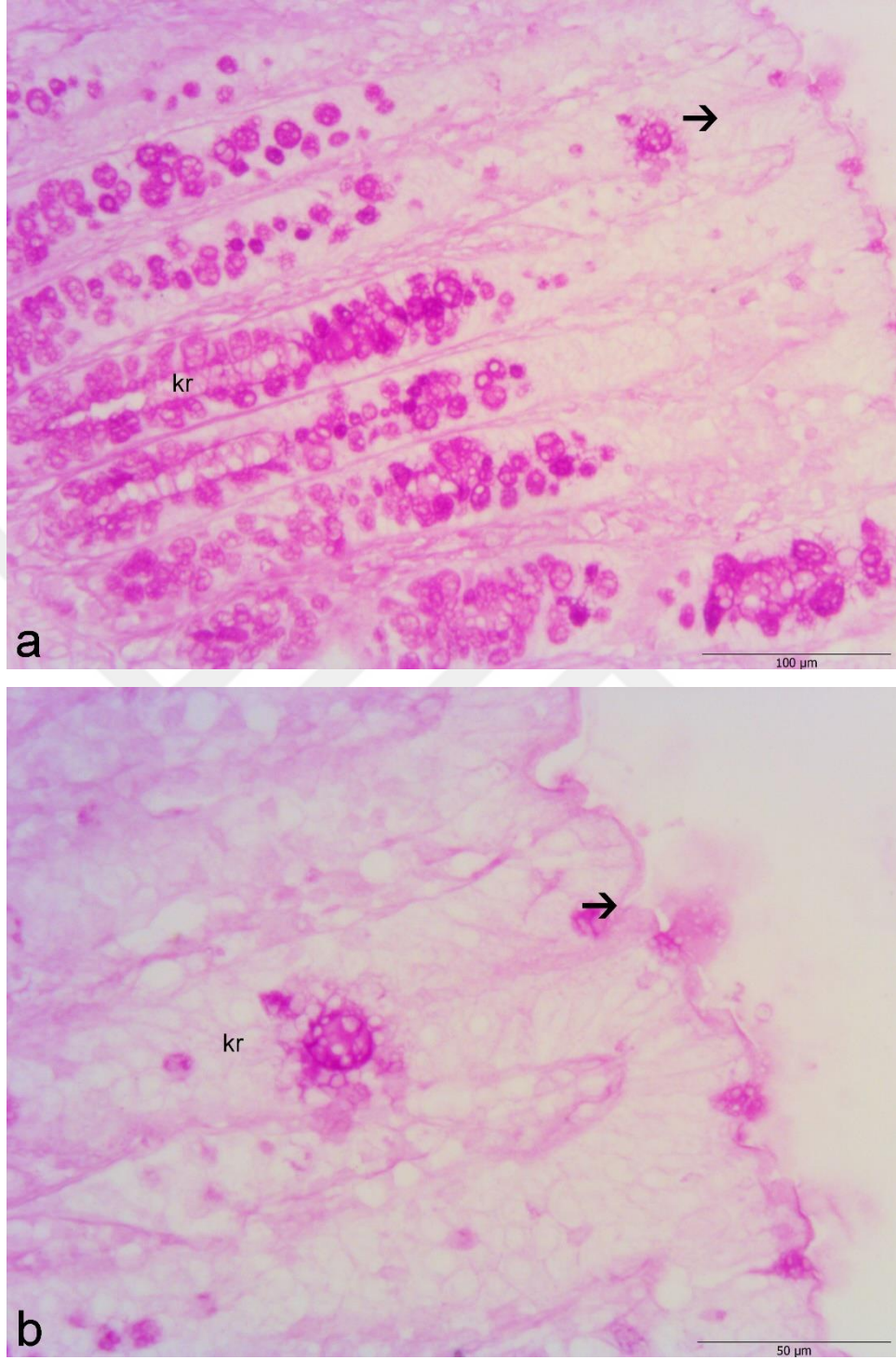
Şekil 4.2.25: LPS + Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propriada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.26: LPS + Prebiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.27: LPS + Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitinin H + PAS boyamasında kript (kr) bütünlüğünde bozulma, epitelinde parçalanma ve lamina propriada ödem (*). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.



Şekil 4.2.28: LPS + Probiyotik grubuna ait kalın bağırsak kesitlerinde kriptlerin (kr) çizgili kenarlarında devamsızlık (→). a) Bar: 100 µm, b) Bar: 50 µm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, son yıllarda prebiyotik ve probiyotiklerin mikrobiyotaya, dolayısıyla insan sağlığına etkileri üzerine yapılan çalışmaların artmış olması nedeniyle, sağlıklı mikrobiyotaya sahip canlıların endotoksemi karşısında nasıl davranacağını araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, sağlıklı deney hayvanlarına 21 gün boyunca prebiyotik ve probiyotik uygulandığında, mikrobiyotanın yararlı mikroorganizmalar bakımından daha zengin bir duruma geleceği ve endotoksemi ajanı olarak uyguladığımız LPS karşısında daha dayanıklı olabilecekleri düşünülmüştür. Bu doğrultuda, prebiyotik olarak uyguladığımız inülinin, hayvanların hem ince hem de kalın bağırsaklarında bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Bu grupta, ince bağırsak kesitlerinin kontrol hayvanlardaki gibi sağlıklı bir histolojik yapıya sahip olduğu, hücresel yapının, mukus üretiminin inülininden etkilenmediği, hatta bağırsak hücreleri arasında yer alan okludin proteinin immünohistokimyasal dağılımına bakıldığında, kontrol grubuna nazaran artmış olduğu belirlendi. Kalın bağırsakta da yapının korunumu devam etmekle birlikte, okludinde bir artış söz konusu değildi. Bunun yanı sıra, mukus üretimine etkisi açısından bakıldığında, inülinin mukusu artırma ya da azaltma yönünde bir etkisi olmadığı belirlendi. Bu da, prebiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını koruyarak, ince bağırsak geçirgenliğinin sağlıklı ilerlemesi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Son 10 yıldır yapılan pek çok çalışma ile inülinin diğer prebiyotiklerden daha etkili olduğu, bağırsak geçirgenliğinde ve enfeksiyon ajanlarına karşı olumlu katkılarının bulunduğu gösterilmiştir (Pourghassem Gargari ve diğ., 2013, Zou ve diğ., 2018; Wang ve diğ., 2020). İnülinin metabolik etkilerini genel olarak SCFA'lar üzerinden gösterdiği yönünde bir görüş birliği hakimdir ve SCFA'ların bağırsak bütünlüğünü korumada çok önemli roller üstlendiği gösterilmiştir. İnülinin genel SCFA üretimine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, günde 24 g inülinin oral yolla alımının 4 ile 6 saat sonra kandaki asetat, propiyonat ve bütirat seviyesini yükselttiği belirtilmiş, bu yolla inülin fermentasyonunun genel metabolik duruma pozitif katkı sağlayabileceği düşünülmüştür (Tarini ve Wolever, 2010). Biz her ne kadar SCFA'ları ölçememiş olsak da, histolojik olarak sağlıklı bağırsak kesitleri ve en önemlisi de ince bağırsaktaki okludin immünohistokimyasındaki artışın, geçirgenliğin korunmasında inülin destekli SCFA artışının etkili olabileceğini düşündürmektedir. İnülin ve SCFA'lar üzerine yapılan birçok çalışmada, bu kısa zincirli yağ asitlerinden bütiratın, çözünmüş

materyallerin bağırsak epitelinden parasellüler geçişini kontrol eden sıkı bağlantı proteinlerinin üretimini düzenleyerek (Mörkl ve diğ., 2018) epitel bütünlüğünün sürdürülmesinde anahtar role sahip olduğu kabul edilmiştir (Feng ve diğ., 2018; Gonzalez ve diğ., 2019). Cani ve diğ., (2009)'nin obez sıçanlarda yaptığı bir araştırmada, sıkı bağlantı proteinleri olan okludin ve ZO-1 üzerine prebiyotiklerin etkisine bakılmış ve ince bağırsak dokularında okludin ile ZO-1 proteinlerinin mRNA konsantrasyonlarında obez gruba göre bir artış olduğu belirlenmiştir. Hamilton ve diğ. (2017)'nin çalışmasında da hem ince hem de kalın bağırsakta inülinin, bağırsak geçirgenliğine olan etkisi *ex vivo* olarak incelenmiş, transsellüler ve parasellüler geçirgenliğin her iki bağırsak bölümünde de azalmış olduğu tespit edilmiştir. İnülin ve stevianın karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, sadece inülin ile beslenen sıçanlarda, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunda değişikliğe yol açarak SCFA'lar aracılığı ile bağırsak geçirgenliğinin azaltılabildiği, stevia grubunda ise böyle bir etkinin olmadığı görülmüştür (Nettleton ve diğ., 2019). Çalışmamızda, sadece inülin verdiğimiz grupta gördüğümüz okludin artışı, bütün bu çalışmalar ışığında düşünüldüğünde, bağırsak geçirgenliğinin korunmasında prebiyotiklerin önemini göstermektedir. Ancak, inülin ile beslenen farelerin kalın bağırsaklarında sıkı bağlantı proteinleri olan okludin ve ZO-1'in azaldığını gösteren 2 çalışmada ince bağırsağa değinilmemiştir (Liu ve diğ., 2016, Hamilton ve diğ., 2017). Bizim çalışmamızda ise ilginç bir şekilde, inülin kalın bağırsakta bir değişikliğe neden olmazken, ince bağırsağın bağlantı komplekslerinin artışına neden olmuştur. Bu da, emilimin gerçekleştiği ince bağırsakta bağlantı komplekslerinin daha önemli olduğunu ve çok daha çabuk etkilenebildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, prebiyotik beslenmenin mukus üretimi ile ilişkisine bakıldığında, inülinin mukus dağılımını etkilemediği görüldü. Ancak, Desai ve diğ. (2016) ile Everard ve diğ. (2013)'nin çalışmalarında, diyet fibrilinden yoksun beslenme sonucu insan bağırsağında yer alan 14 bakteri türünün, bakteriyel besin yoksunluğundan dolayı bağırsak mukus tabakasını sindirmeye başladığı ve böylece mukus üretiminin azalması sonucu mukus tabakasının incelmeye yol açtığı belirtilmiştir. Aynı çalışmalarda, mukus proteinlerinin yapısının veya konfigürasyonunun değişmesi ile bakteri penetrasyonunun arttığı da gösterilmiştir. Bunun yanı sıra Cornick ve diğ. (2015)'nin çalışmasında inülin sayesinde artan SCFA'lar mukus üretimini de arttırarak, lümendeki bakteriler ile bağırsak epiteli arasında fiziksel bir bariyer oluşturulmasına da yardımcı olmuştur. Schroeder ve diğ. (2018)'nin çalışmasında ise, inülin uygulaması bağırsak mukus üretimi üzerinde değişime yol açmazken, bakterilerin mukus

penetrasyonunu azaltmıştır. Bizim çalışmamızda ise, mukus üretiminde prebiyotik uygulamasının Schroeder ve diğ. (2018)'nin çalışmasına benzer şekilde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu da prebiyotiklerin sağlıklı bireylerde bakterilerin ürettiği SCFA'lar yoluyla bağlantı komplekslerinin artışına neden olarak, bağırsak bariyerinin dayanıklılığını arttırması sebebiyle, bakterilerin mukusu tüketmelerine gerek kalmadığını, normal miktarlarda mukus üretiminin devam ettiğini göstermektedir.

Prebiyotik uygulaması ile mevcut yararlı bakterilerin beslenmesi yoluyla bağırsak, dolayısıyla canlının sağlığı korunurken, sadece probiyotik uygulamasının nasıl bir etkisinin olacağını da görmek ve prebiyotikler ile probiyotiklerin bir karşılaştırmasını yapılabilmek amacı ile 21 gün boyunca deney hayvanlarına *Bacillus clausii* uygulandı. Bu probiyotiğin verildiği grubun ince bağırsaklarında prebiyotik grubunda olduğu gibi okludin seviyesinin arttığı, bağırsak epitelinin bütünlüğünün ve geçirgenliğinin korunmasında olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür. Kalın bağırsakta da okludin düzeylerinde artış görülmekle birlikte, bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte, *Bacillus clausii*'nin histolojik olarak ince bağırsaktaki villus yapısını koruduğu, hatta bazı bölgelerde villus yapısının daha düzenli olduğu görüldü. Benzer şekilde, kalın bağırsakta da kriptlerin yapısı korunurken, ince bağırsaktan farklı olarak mukus üretiminin kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edildi. Bir probiyotik türü olan *Bacillus clausii*'nin kullanımı, türün özellikleri göz önüne alındığında, ayrı bir tür olarak tayin edildiği 2001 yılından beri yaygın olarak kabul görmüştür (Senesi ve diğ., 2001). Di Caro ve diğ. (2005)'nin yaptığı çalışmada, *Bacillus clausii* probiyotiğinin etkilediği genleri tayin edilmiştir. Toplamda 158 genin transkripsiyonunun arttığı, 265 genin ise azaldığı görülmüştür. Bu gen aileleri hücre adezyonunu, bağırsak geçirgenliğini düzenleme, inflamasyon, immün cevap, hücre-hücre sinyalizasyonu ve diğer birçok görevi yerine getiren proteinlerin gen aileleridir. Böylece bu probiyotiğin bağırsak üzerindeki etkileri hakkında görece az bilgi sahibi olunmasına rağmen, probiyotik özelliklerini taşıması üzerinde hemfikir olunması ve birçok genin transkripsiyonunu etkileyebilmesi dolayısıyla, daha yaygın olarak kullanılan prebiyotikler ile kıyaslanması anlamlı sonuçlar ortaya koymuştur. Paparo ve diğ. (2020)'nin son zamanlarda *in vitro*'da Caco-2 hücre soyunu kullanarak *Bacillus clausii*'nin etkilerini ölçmek amacıyla yaptıkları çalışmada bu bakterinin, sıkı bağlantı proteinleri olan okludin ve ZO-1'de kontrole göre artışa neden olduğunu görmüşler, ancak sonuç anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, ince bağırsakta okludin düzeyleri kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi.

Bu farklılığın nedeni Paparo ve diğ. (2020)'nin çalışmasında *in vitro* yöntemlerin kullanılması, bizim çalışmamızda ise *in vivo* yöntemlerin kullanılmış olması olarak düşünülebilir. Aynı çalışmada, bağırsak fonksiyonunun devamlılığında çok önemli yeri olan mukusu oluşturan musin proteinin ekspresyonunun da *Bacillus clausii* uygulaması ile arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla paralel olarak bizim çalışmamızda da *Bacillus clausii*'nin kalın bağırsakta goblet hücrelerinin sayısının artışı ile mukus artışına yol açtığı gözlemlenmiş, ince bağırsakta ise kontrole göre anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Otoimmün hastalıklar, obezite, diyabet, gibi pek çok durumda, dolaşıma karışan gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS, endotoksemiye yol açabilmektedir. Bu durum pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Raetz ve Whitfield, 2002; Takeda ve diğ., 2003; Abbas, 2006; Cario ve diğ., 2007; Silva ve diğ., 2008; Castellheim ve diğ., 2009; Opal, 2010; Valentini ve diğ., 2014). Bizim çalışmamızda, LPS uyguladığımız hayvanlarda kontrol grubuna göre okludin seviyelerinde düşüş, mukus salgısında azalma, villus yapısında bozulma, villuslarda ve kriptlerde epitel hasarı, ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, bazal laminanın ve çizgili kenarın bozulması gibi ciddi hasarlar görülmüştür. Bunun yanı sıra, dokuda çok ciddi düzeylerde lökosit infiltrasyonu tespit edilmiştir.

Endotoksemi üzerine yapılan çalışmalarda, endotoksemi esnasında bağırsaktaki bakteri türlerinin kompozisyonunda bozulmalar olduğu gösterilmiştir (Zaborin ve diğ., 2014; Ojima ve diğ., 2016). Endotoksemi esnasında azaldığı bilinen bakteri türlerinden bazıları, SCFA ürettiği bilinen *Faecalibacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Blautia spp.*, ve *Ruminococcaceae spp.*, 'dir (Rajilic-Stojanovic ve de Vos, 2014). Bağırsak mikrobiyotası, LPS ve peptidoglikan gibi, vücudun periferik dokularında inflamasyona sebebiyet verebilen moleküller açısından zengin olduğu için (Tremaroli ve Bäckhed, 2012) bağırsak epiteli, bu noktada kritik bir rol oynar. Bağırsak bariyerinin geçirgen hale gelmesinden dolayı LPS gibi mikrobiyal ürünler dolaşıma katılarak pek çok farklı organda düşük seviyeli inflamasyona neden olarak, hasara yol açabilir (Valentini ve diğ., 2014). Bağırsak bariyerindeki bozukluklar ve artan geçirgenlik inflamatuvar bağırsak hastalığı, huzursuz bağırsak sendromu, alkolik karaciğer hastalığı, steatohepatitis, karaciğer sirozu, pankreatitis, tip 1 ve tip 2 diyabet, obezite, depresyon gibi birçok hastalık ve sendromda sıklıkla görülmektedir. Örneğin, inflamatuvar bağırsak hastalığında dikey sıkı bağlantı iplikçiklerinin sayısının azalması, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun değişimi gibi epitel sıkı bağlantılarındaki değişimler, bağırsak

geçirgenliğinin arttığını göstermektedir (Petit ve diğ., 2012). Cani ve diğ. (2008)'nin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yaptığı çalışmada, obezitenin bağırsak mikrobiyotasını değiştirmesi ile bağırsakta LPS üreten bakterilerin ve bağırsak duvarının geçirgenliğinin artmasıyla birlikte inflamatuvar sitokinlerin yükseldiği ve metabolik endotoksemiye yol açtığı gösterilmiştir. Bu örnekler, LPS maruziyetinden sonra artan inflamasyon esnasında çok fazla eksprese edilen TNF- α , INF- γ , IL-1 β ve IL-13 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin artmış aktivitesinin, bağırsak geçirgenliğinin artmasında rol oynadığını düşündürmektedir (Bischoff ve diğ., 2014). Aynı zamanda bu hastalık tablolarının çoğuna, diğer organların da etkilendiği sistemik endotoksemi de eşlik etmektedir (Pastor Rojo ve diğ., 2007). Bizim çalışmamızda da okludin azalmasıyla birlikte sıkı bağlantılarda hasar, epitelin yapısında bozulmalar gözlemlendi. Yüksek derecede görülen lökosit infiltrasyonu ve okludininin azalması, bağırsak geçirgenliğinin de arttığına işaret etmektedir. Yukarıdaki kaynaklar doğrultusunda artan lökositler sebebiyle pro-inflamatuvar sitokinlerin artmasının, bu bozulmanın nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, 21 gün boyunca inülin takviyesi ile beslenen sıçanlara LPS uygulandığında, LPS grubuna benzer şekilde villus ve kript hasarı, ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, bazal laminanın ve çizgili kenarın bozulması gibi ciddi hasarlar gördük. Bu hasar tablosunda LPS grubuna göre yer yer iyileşme gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Okludin seviyesi, kalın bağırsakta LPS grubuna benzerken, ince bağırsakta LPS grubuna göre anlamlı bir artış belirlendi. Bunun yanı sıra, ince ve kalın bağırsakta goblet hücre sayısı da LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı. Bu sonuçlar, inülinin endotoksemi tablosunda kısmi olarak iyileşme sağlayabileceğini düşündürdü. Lökosit dağılımında ise anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Kolit modelinde yapılan çalışmalarda, kolonda *Lactobacillus* türlerinde azalmalar görülmüştür (Femia ve diğ., 2002). Kennedy ve diğ. (2000)'nin çalışmasında inülin, kolonda *Lactobacillus* artışını tetiklemiş, mukozal inflamasyonda ve histolojik hasar skorunda azalmaya sebebiyet vermiştir. Ancak aynı çalışmada inülin uygulaması, kolit sebebiyle artan bağırsak geçirgenliği üzerinde bir etki göstermemiştir. Zou ve diğ. (2018)'nin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yaptığı çalışmada inülin, obez farelerde görülen kolon hasarının tersine çevirilmesinde yardımcı olmuştur. Bu çalışmada inülinin, metabolik sendrom belirtilerini SCFA gerekmeden, bazı bakteriyel türleri arttırıp, IL-22 yükselmesini teşvik

ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde azalan sıkı bağlantı proteinlerinden olan okludin ve klaudin-2, inülin uygulaması ile artmış, böylece kolon geçirgenliğini azaltmıştır. Kolonun aksine, ince bağırsakta ise sıkı bağlantı proteinleri ile ilgili herhangi bir değişim görülmemiştir. Li ve diğ. (2020)'nin yakın zamanlardaki çalışmasında obez sıçanlarda görüldüğü bilinen endotoksemi, inülin uygulaması ile anlamlı şekilde azaltılmıştır. Bu çalışmada, inülin uygulaması ile arttığı bilinen bakteri çeşitleri olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*'un endotoksin seviyeleri ile negatif korelasyonda olduğu gösterilmiş, IL-6 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar olduğu bilinen sitokinlerin de inülin yardımıyla anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Videla ve diğ. (2001)'nin çalışmasında, sıçanlarda DSS ile oluşturulan kolit çalışmasında oral yolla inülin uygulanması, inflamasyon belirteçlerini, mukozal hasar ve kript hasar skorunu kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde düşürmüştür. Buradaki hastalık modelinde de, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* artışı bu durumla paralel olarak gözlenmiş, pro-inflamatuvar sitokinlerde düşüşe yol açmıştır. Hamilton ve diğ. (2007)'nin yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda yaptığı çalışmada, inülin hem ince hem kalın bağırsakta yüksek yağlı diyetten ötürü artan parasellüler ve transsellüler bağırsak geçirgenliğini düşürmüştür. Aynı zamanda ölçülen musin gen ekspresyonunun, 6 haftalık yüksek yağlı diyetten sonra arttığı, inülinin ise bu gen üzerinde herhangi bir değişim oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyet kaynaklı artan bağırsak geçirgenliğinin, dolaşıma daha fazla LPS'nin karışmasını tetikleyerek, endotoksemi oluşmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ancak inülin uygulaması, bağırsak yapısını koruyarak bu akışı düzeltmekte rol oynamıştır. Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin Caco-2 hücrelerini kullanarak *in vitro* ortamda *E. coli* enfeksiyonu meydana getirdikleri çalışmada, inülin bağırsak bariyerinin fonksiyonunu arttırıcı etki göstermiştir. Yine aynı çalışmada, inülinin kolonda oluşan hasar üzerinde arttırıcı veya azaltıcı bir etkisi olmamıştır. Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin *in vivo* ortamda farelerde *C. rodentium* enfeksiyonunda yaptıkları çalışmada, prebiyotik inülin uygulaması enfeksiyon tablosunda herhangi bir değişime yol açmamıştır. Bunların yanı sıra bazı çalışmalarda prebiyotiklerin ters etkiler de oluşturabileceği gösterilmiştir. Örneğin, *Salmonella typhimurium* enfeksiyonu öncesi FOS ile beslenen farelerde, karaciğer, dalak ve mezenterik lenf düğümlerinde bakteri translokasyonu artmıştır (Petersen ve diğ., 2009). Ek olarak, prebiyotik uygulamasının, konağın patojen bakterilerine besin sağlayarak, onların üreme ve virülansının artmasına yol açarak etkileyebileceği de bildirilmiştir. Ten Bruggencate ve diğ.

(2005)'nin çalışmasında ise, FOS uygulaması bağırsak geçirgenliğini arttırmış, mukozada hasara sebebiyet vermiştir. Aynı zamanda bu çalışmada, enfeksiyon esnasında mukus miktarının da arttığı tespit edilmiştir.

Kennedy ve diğ. (2000), Zou ve diğ. (2018), Videla ve diğ. (2001)'nin çalışmalarında gözlenen histolojik hasar tablosundaki düşüş, bizim çalışmamızda da görüldü. Ancak, Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin çalışması ile paralel olarak, bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Zou ve diğ. (2018), Hamilton ve diğ. (2007) ve Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin çalışmalarında artan bağırsak geçirgenliği, inülin uygulaması ile tersine çevrilebilmiştir. Bizim çalışmamızda ise kalın bağırsakta Kennedy ve diğ. (2000)'nin çalışmasına paralel olarak okludin seviyesi LPS grubuna benzer iken, ince bağırsakta Hamilton ve diğ. (2007) ve Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin çalışmalarına paralel olarak LPS grubuna göre anlamlı bir artış gösterdi.

Kennedy ve diğ. (2000), Li ve diğ. (2020), Videla ve diğ. (2001)'nin çalışmalarında bildirilen inülin uygulamasının inflamatuvar duruma olan pozitif etkisi bizim çalışmamızda görülmedi. Ten Bruggencate ve diğ. (2005)'nin çalışmasında görülen, inülinin enfeksiyon durumunda, enfeksiyonu daha da şiddetlendiren etkisi de bizim çalışmamızda gözlemlenmedi. Bizim çalışmamızda Johnson-Henry ve diğ. (2014)'nin çalışmasına paralel olarak inülin inflamasyonda artış veya azalmaya yol açmadı. Bu verilerden yola çıkarak inülinin kullanımının inflamatuvar durumlarda herhangi bir negatif etki oluşturmadığı düşünüldü. Aynı zamanda bizim çalışmamızda inülin uygulaması, Ten Bruggencate ve diğ. (2005)'nin çalışması ile paralel olarak, mukus miktarını LPS grubuna göre anlamlı olarak arttırdı. Bağırsağın patojenler (Arnold ve diğ., 1993), endotoksinler (Moore ve diğ., 1993) veya safra asitleri (Klinkspoor ve diğ., 1995) gibi bağırsakta irritasyona neden olabilecek maddelere karşı epitelin kendini koruma amaçlı olarak mukus üretimini arttığı düşünülmüştür. Ancak, LPS tarafından oluşturulan enfeksiyonda bağırsağın tüm yapısının hasar görmesi sebebiyle mukus üretici hücreler de zarar görmüştür. İnülin uygulaması ile kısmi olarak bağırsağın yapısının iyileştirilmesinin, LPS grubuna göre prebiyotik uygulanmış hayvanlarda mukus artışını açıklayabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, 21 gün boyunca *Bacillus clausii* takviyesi ile beslenen sıçanlara LPS uygulandığında, LPS grubuna benzer şekilde villus ve kript hasarı, ödem, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, mukus üretiminin azalması, bazal laminanın ve çizgili kenarın bozulması gibi ciddi hasarlar belirlendi. Lökosit dağılımında ise, LPS grubuna göre kısmi bir düşme görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Okludin seviyesi, kalın bağırsakta LPS grubuna benzer iken, ince bağırsakta LPS grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. Bunun yanı sıra ince ve kalın bağırsakta goblet hücre sayısı da LPS grubuna benzerdi. Bu nedenle *Bacillus clausii*'nin endotoksemi tablosunda kısmi olarak iyileşme sağladığı düşünülmüştür.

Paparo ve diğ. (2020)'nin rotavirüs enfeksiyonu ile ilgili yaptığı *in vitro* çalışmalarında *Bacillus clausii*'nin, enfeksiyon grubuna göre okludin ve ZO-1 seviyelerini arttırarak, bariyer bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda *Bacillus clausii* türü probiyotik, ROT oluşumunu engellemiş ve IL-8 ve IFN- β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını da azaltmıştır. Bunların yanında, mûsin ekspresyonu da enfeksiyon grubuna göre artış göstermiştir. Çalışmada kullanılan Caco-2 hücre soyunun *in vitro* çalışmalarda ince bağırsak epitel özellikleri göstermesi sebebiyle, bizim çalışmamızda da benzer şekilde LPS grubuna göre ince bağırsakta okludin seviyelerinin artışı anlam kazanmıştır. İnflamatuvar durumda ise, bizim çalışmamızda LPS grubuna göre bir düşüş gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Dar ve diğ., (2018)'nin post menapoz dönemindeki farelerde yaptıkları osteoporoz ile ilgili çalışmada *Bacillus clausii* uygulamasının T hücreleri oranı üzerinde etkili olduğu, pro-inflamatuvar sitokinler ile ilişkili olan Th17 hücrelerinin sayısının kontrole göre azaldığı, anti-inflamatuvar sitokinler ile ilişkili olan Treg hücrelerinin arttığı gösterilmiştir. Böylece *Bacillus clausii* uygulaması IL-6, IL-17, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerde düşüşe yol açarken, IL-10 ve IFN- γ gibi anti-inflamatuvar sitokinlerde yükselişe neden olmuştur. Ciprandi ve diğ. (2004)'nin çalışmasında *Bacillus clausii*'nin immün düzenleyici etkileri alerjik çocuklarda ölçülmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada 4 haftalık *Bacillus clausii* uygulamasının nazal sıvılardan alınan örneklerde IFN- γ , IL-12, TGF- β ve IL-10 sitokinlerinde belirgin bir artışa, IL-4 seviyesinde ise belirgin bir düşüşe yol açtığı gözlemlenmiştir. Diyet kaynaklı endotoksin artışının önlenmesi üzerine insanlarda yürütülen çalışmada, *Bacillus clausii*'nin de içerisinde bulunduğu *Bacillus* türlerinden oluşan probiyotik kokteyli, yemek sonrası endotoksin oranını düşürmüş, inflamatuvar biyomarkerların da önemli ölçüde

azalmasını sağlamış ya da düşüş eğilimine sokmuştur (McFarlin ve diğ., 2017). Bizim çalışmamızda ise, bu sitokinlerin değişiminin doğal bir sonucu olarak beklenen inflamatuvar durumda azalma gözlemlenmemiştir.

Tewari ve diğ. (2015)'nin erken doğan bebekler üzerinde yapılan çalışmalarında, erken doğmuş bebeklerin mikrobiyotasının, normalde doğum esnasında anneden aldığı mikrobiyotadan farklı olarak hastane şartları ile oluşmasından dolayı çok sık olarak sepsis geliştiği belirtilmiştir. Bu şartlar altında, *Bacillus clausii* uygulamasının sepsis gelişiminde önemli bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla paralel olarak, endoksemik şartlarda *Bacillus clausii* uygulaması inflamasyon durumunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır.

Pradhan ve diğ., (2019)'nin sıçanlarda yaptığı *Salmonella* enfeksiyonu çalışmalarında, *Bacillus clausii* uygulamasının enfeksiyon grubuna göre mikrobiyotanın daha çok bozulmasına yol açtığı, ancak tek başına *Bacillus clausii* uygulamasının bir değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada Hdac1, Hdac3, Hdac6, Hdac7, Hdac8 ve Hdac9 gibi histon deasetilazlar *Bacillus clausii* tarafından aktive edilmiş, bu da inflamasyonu artırmış ve immün hücre filtrasyonunu yükseltmiştir (Pradhan ve diğ., 2019). Bizim çalışmamızda ise, inflamatuvar durumda LPS grubuna göre anlamlı olmasa da kısmi bir düşüş görülmüştür. Çalışmalardaki farklılığın sebebinin *Salmonella enterica* ile *Bacillus clausii*'nin birbirlerine sinerjistik etkileri olabileceğini düşündürmüş, bizim çalışmamıza göre *Bacillus clausii*'nin LPS tarafından oluşturulan entoksemi modelinde kullanımının herhangi bir negatif sonuç oluşturmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, prebiyotik ve probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasının dengesini sürdürmesinde önemli olduğu, özellikle ince bağırsakta bağlantı komplekslerinin korunmasına bağlı olarak, bağırsağın patojenlere geçirgenliğinin önlenebileceği gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerin prebiyotik ve probiyotik beslenmesinin, pek çok patolojik durumda ortaya çıkabilecek LPS geçişini kısmen azaltabileceği, ancak tamamen koruyamadığı görülmüştür. Bu durum da, kullanılan LPS dozu ve süresinden kaynaklanabilir. Bu çalışma ile prebiyotik ve probiyotik beslenmenin önemi bir kez daha ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- Abbas, A., 2006, Basic Immunology. Direktör: Gruliow, R. Philadelphia: Elsevier.
- Allen-Vercoe, E., Daigneault, M., White, A., Panaccione, R., Duncan, S. H., Flint, H. J., O'Neal, L., Lawson, P. A., 2012, *Anaerostipes hadrus* comb. nov., a dominant species within the human colonic microbiota; reclassification of *Eubacterium hadrum* Moore et al. 1976, *Anaerobe*, 18(5), 523–529.
- Al-Sheraji, S., Ismail, A., Manap, M., Mustafa, S., Yusof, R., Hassan, F., 2013, Prebiotics as functional foods: A review, *Journal of Functional Foods*, 5, 1542–1553.
- Amaral, L., Morgan, D., Stephen, A.M., Whiting, S., 1992, Effect of propionate on lipid-metabolism in healthy-human subjects, *FASEB Journal*, 6:1655–6.
- Apolinário, A. C., de Lima Damasceno, B. P., de Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., da Silva, J. A., 2014, Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology, *Carbohydrate polymers*, 101, 368–378.
- Arnold, J. W., Klimpel, G. R., Niesel, D. W., 1993, Tumor necrosis factor (TNF alpha) regulates intestinal mucus production during salmonellosis, *Cell Immunol*, 151, 336–344.
- Arthur, L. G., Kuenzler, K. A., Schwartz, M. Z., 2003, Hepatocyte growth factor ameliorates inflammatory bowel disease in a rat model, *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 7(8), 1062–1068.
- Bach Knudsen, K. E., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K. S., 2003, New insight into butyrate metabolism, *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 81–86.
- Baumgart, D. C., Dignass, A. U., 2002, Intestinal barrier function, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 5(6), 685–694.
- Beaumont, M., Neyrinck, A. M., Olivares, M., Rodriguez, J., de Rocca Serra, A., Roumain, M., Bindels, L. B., Cani, P. D., Evenepoel, P., Muccioli, G. G., Demoulin, J. B., Delzenne, N. M., 2018, The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(12), fj201800544. Advance online publication.
- Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G. E., Flint, H. J., 2006, Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3593.
- Benjdia, A., Martens, E. C., Gordon, J. I., Berteau, O., 2011, Sulfatases and a radical S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) enzyme are key for mucosal foraging and fitness of

the prominent human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *The Journal of biological chemistry*, 286(29), 25973–25982.

- Berk, M., Williams, L. J., Jacka, F. N., O'Neil, A., Pasco, J. A., Moylan, S., Allen, N. B., Stuart, A. L., Hayley, A. C., Byrne, M. L., Maes, M., 2013, So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from?, *BMC medicine*, 11, 200.
- Bird, A. R., Conlon, M. A., Christophersen, C. T., & Topping, D. L., 2010, Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics, *Beneficial microbes*, 1(4), 423–431.
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, J. M., 2014, Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy, *BMC gastroenterology*, 14, 189.
- Boets, E., Gomand, S.V., Deroover, L., Preston, T., Vermeulen, K., De Preter, V., ve diğ., 2017, Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study, *The Journal of Physiology*, 595(2), 541–555.
- Bonnema, A. L., Kolberg, L. W., Thomas, W., Slavin, J. L., 2010, Gastrointestinal tolerance of chicory inulin products, *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 865–868.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., Gershwin, M. E., 2009, Probiotics and immunity, *Journal of gastroenterology*, 44(1), 26–46.
- Brooks, L., Viardot, A., Tsakmaki, A., Stolarczyk, E., Howard, J. K., Cani, P. D., Everard, A., Sleeth, M. L., Psichas, A., Anastasovskaj, J., Bell, J. D., Bell-Anderson, K., Mackay, C. R., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Frost, G., Bewick, G. A., 2016, Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety, *Molecular metabolism*, 6(1), 48–60.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Di Leo, V., Buda, A., Pinzani, M., Palú, G., Martinez, D., 2007, Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, 518–525.
- Bunesova, V., Lacroix, C., Schwab, C., 2017, Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*, *Microbial Ecology*, 75(1), 228–238.
- Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., Mingrone, G., 2010, Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype, *International journal of obesity* (2005), 34(6), 1095–1098.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M.,

- Alessi, M. C., Burcelin, R., 2007, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Burcelin, R., 2008, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes*, 57(6), 1470–1481.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., 2009, Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability, *Gut*, 58(8), 1091–1103.
- Cario, E., Gerken, G., Podolsky, D.K., 2007, Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function, *Gastroenterology*, 132, 1359–1374.
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Hess, J. M., Gould, T. J., Slavin, J. L., 2017, Prebiotic Dietary Fiber and Gut Health: Comparing the in Vitro Fermentations of Beta-Glucan, Inulin and Xylooligosaccharide, *Nutrients*, 9(12), 1361.
- Castellheim, A., Brekke, O. L., Espevik, T., Harboe, M., Mollnes, T. E., 2009, Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis, *Scand J. Immunol*, 69(6):479-91.
- Casula, G., Cutting, S. M., 2002, Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract, *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2344–2352.
- Cecchini, D.A., Laville, E., Laguerre, S., Robe, P., Leclerc, M., Doré, J., Henrissat, B., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., Potocki-Véronèse, G., 2013, Functional metagenomics reveals novel pathways of prebiotic breakdown by human gut bacteria, *PLoS ONE*, 8, e72766.
- Chambers, E. S., Byrne, C. S., Aspey, K., Chen, Y., Khan, S., Morrison, D. J., Frost, G., 2018, Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy expenditure and lipid oxidation in fasted humans, *Diabetes, obesity & metabolism*, 20(4), 1034–1039.
- Chambers, E. S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Zac-Varghese, S. E. K., ... Frost, G. S., 2014, Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults, *Gut*, 64(11).
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R., 2014, The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2247–2252.
- Chassaing, B., Miles-Brown, J., Pellizzon, M., Ulman, E., Ricci, M., Zhang, L., Patterson, A. D., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A. T., 2015, Lack of soluble fiber drives diet-induced

- adiposity in mice. *American journal of physiology, Gastrointestinal and liver physiology*, 309(7), G528–G541.
- Cherbut, C., 2002, Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept, *The British journal of nutrition*, 87 Suppl 2, S159–S162.
- Christiansen, C.B., Gabe, M.B.N., Svendsen, B., Dragsted, L.O., Rosenkilde, M.M., Holst, J.J., 2018, The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon, *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 315, G53–65.
- Ciffo, F., 1984, Determination of the spectrum of antibiotic resistance of the "Bacillus subtilis" strains of Enterogermina, *Chemioterapia : international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy*, 3(1), 45–52.
- Ciprandi, G., Tosca, M. A., Milanese, M., Caligo, G., Ricca, V., 2004, Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after Bacillus clausii administration: a pilot study, *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 15(2), 148–151.
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., & Gabrielli, O., 2006, Prebiotics in human milk: a review, *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 38 (Suppl 2), S291–S294.
- Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K., 2015, Roles and regulation of the mucus barrier in the gut, *Tissue barriers*, 3(1-2), e982426.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. Paul., 2006, What's in a name? Class distinction for bacteriocins, *Nature Review Microbiology*, 4, 160.
- Cotter, P. D., Hill, C., 2003, Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(3), 429–453.
- Crombach, A., Hogeweg, P., 2009, Evolution of resource cycling in ecosystems and individuals, *BMC Evolutionary Biology*, 9, 122.
- Crouse, J. R., Gerson, C. D., DeCarli, L. M., Lieber, C. S., 1968, Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man, *Journal of lipid research*, 9(4), 509–512.
- Cullen, J.J., Mercer, D., Hinkhouse, M., Ephgrave, K.S., Conklin, J.L., 1999, Effects of endotoxin on regulation of intestinal smooth muscle nitric oxide synthase and intestinal transit, *Surgery*, 125, 399–44.
- Cummings, J., Pomare, E., Branch, W., Naylor, C., Macfarlane, G., 1987, Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood, *Gut*, 28, 1221–1227.
- Cutting S. M., 2011, Bacillus probiotics, *Food microbiology*, 28(2), 214–220.

- Dar, H. Y., Pal, S., Shukla, P., Mishra, P. K., Tomar, G. B., Chattopadhyay, N., Srivastava, R. K., 2018, *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice model, *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 54, 118–128.
- Dar, H. Y., Pal, S., Shukla, P., Mishra, P. K., Tomar, G. B., Chattopadhyay, N., Srivastava, R. K., 2018, *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice model, *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 54, 118–128.
- Davie, J. R., 2003, Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *The Journal of nutrition*, 133(7 Suppl), 2485S–2493S.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., Bäckhed, F., Mithieux, G., 2014, Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits, *Cell*, 156(1-2), 84–96.
- De Winter, B.Y., De Man, J.G., 2010, Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: effect on gastrointestinal motility, *World Journal of Gastroenterology*, 16, 5523–35.
- Demigné, C., Morand, C., Levrat, M. A., Besson, C., Moundras, C., Rémésy, C., 1995, Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes, *The British journal of nutrition*, 74(2), 209–219.
- den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., Gerding, A., van Eunen, K., Müller, M., Groen, A. K., Hooiveld, G. J., Bakker, B. M., Reijngoud, D. J., 2013, Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 305(12), G900–G910.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., 2016, A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility, *Cell*, 167(5), 1339-1353.e21.
- Deshpande, G., Rao, S., Patole, S., Bulsara, M., 2010, Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates, *Pediatrics*, 125(5), 921–930.
- Dewulf, E. M., Cani, P. D., Claus, S. P., Fuentes, S., Puylaert, P. G., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., de Vos, W. M., Gibson, G. R., Thissen, J. P., Delzenne, N. M., 2013, Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women, *Gut*, 62(8), 1112–1121.
- Di Caro, S., Tao, H., Grillo, A., Franceschi, F., Elia, C., Zocco, M. A., Gasbarrini, G., Sepulveda, A. R., Gasbarrini, A., 2005, *Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis, *European journal of gastroenterology & hepatology*, 17(9), 951–960.
- Dodd, D., Spitzer, M. H., Van Treuren, W., Merrill, B. D., Hryckowian, A. J., Higginbottom, S. K., Le, A., Cowan, T. M., Nolan, G. P., Fischbach, M. A., Sonnenburg, J. L., 2017, A

- gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites, *Nature*, 551(7682), 648–652.
- Doebeli, M., 2002, A model for the evolutionary dynamics of cross-feeding polymorphisms in microorganisms, *Population Ecology*, 44, 59–70.
- D'Souza, W.N, Douangpanya, J., Mu, S., Jaeckel, P., Zhang, M., Maxwell, J.R., ve diğ., 2017, Differing roles for short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses, *PLoS ONE*, 12, e0180190.
- Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2007, Cultivable bacterial diversity from the human colon, *Lett Appl Microbiol*, 44: 343–350.
- Duncan, S.H., Louis, P., Thomson, J.M., Flint, H.J., 2009, The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota, *Environmental Microbiology*, 11, 2112–2122
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005, Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science*, 308, 1635– 1638.
- Egorin, M. J., Yuan, Z. M., Sentz, D. L., Plaisance, K., & Eiseman, J. L., 1999, Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43(6), 445–453.
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M., Webb, D. J., 2007, A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation, *The American journal of clinical nutrition*, 86(5), 1286–1292.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., 2013, Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 110(22), 9066-9071.
- Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K., De Vuyst, L., 2006 Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose, *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7835–7841.
- Femia, A.P., Luceri, C., Dolaro, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M., Caderni, G., 2002, Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 23, 1953-1960.
- Feng, W., Wu, Y., Chen, G., Fu, S., Li, B., Huang, B., Wang, D., Wang, W., & Liu, J., 2018, Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 47(4), 1617–1629.

- Field, D., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P., 2015, Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success, *Frontiers in microbiology*, 6, 1363.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., Duncan, S. H., 2012, The role of the gut microbiota in nutrition and health, *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*, 9, 577–589.
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P., 2007, Interactions and competition within the microbial community of the human colon: Links between diet and health, *Environmental Microbiology*, 9, 1101–1111.
- Flores, A. C., Morlett, J. A., & Rodríguez, R., 2016, Inulin Potential for Enzymatic Obtaining of Prebiotic Oligosaccharides, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(11), 1893–1902.
- Food and Agriculture Organization (FAO) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; FAO: London, ON, Canada, 2002.
- Förster, C., 2008, Tight junctions and the modulation of barrier function in disease, *Histochemistry and cell biology*, 130(1), 55–70.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E., Bell, J. D., 2014, The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism, *Nature communications*, 5, 3611.
- Fukui, H., 2015, Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia, *World journal of hepatology*, 7(3), 425–442.
- Fuller, R., 1989, Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1998, Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *The Journal of Cell Biology*, 141, 1539–1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., 1993, Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, *The Journal of Cell Biology*, 123, 1777–1788.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Lupetti, A., Senesi, S., 2015, Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation, *Journal of applied microbiology*, 119(2), 552–559.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W., Eckhardt, E., 2009, Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides, *Journal of lipid research*, 50(1), 90–97.

- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., Cummings, J. H., 1995, Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin, *Gastroenterology*, 108(4), 975–982.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *The Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A.T., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M.G., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N.M., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R.S., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C.D., Buddington, R.K., 2010, *Dietary prebiotics: current status and new definition*, *Food Science & Technology Bulletin Functional Foods*, 7, 1–19.
- Goldin, B. R., 1990, Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens, *Annals of medicine*, 22(1), 43–48.
- Gonzalez, A., Krieg, R., Massey, H. D., Carl, D., Ghosh, S., Gehr, T., & Ghosh, S. S., 2019, Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression, *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 34(5), 783–794.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., Losick, R., 2003, Cannibalism by sporulating bacteria, *Science (New York, N.Y.)*, 301(5632), 510–513.
- Guarino, M.P., Sessa, R., Altomare, A., Cocca, S., Di Pietro, M., 2013, Human colonic myogenic dysfunction induced by mucosal lipopolysaccharide translocation and oxidative stress, *Digestive and Liver Disease*, 45, 1011–6.
- Gulhane, M., Murray, L., Lourie, R., Tong, H., Sheng, Y. H., Wang, R., Kang, A., Schreiber, V., Wong, K. Y., Magor, G., Denman, S., Begun, J., Florin, T. H., Perkins, A., Cuív, P. Ó., McGuckin, M. A., Hasnain, S. Z., 2016, High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22, *Scientific reports*, 6, 28990.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2007, Dolaşım Şoku ve Şok Tedavisinin Fizyolojisi, Tıbbi Fizyoloji, Çeviri Editörleri: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.C., Bölüm 24, Nobel Tıp Kitapevleri, 978-975-420-558-9, 278-287.
- Hamilton, M. K., Ronveaux, C. C., Rust, B. M., Newman, J. W., Hawley, M., Barile, D., Mills, D. A., & Raybould, H. E., 2017, Prebiotic milk oligosaccharides prevent development of obese phenotype, impairment of gut permeability, and microbial dysbiosis in high fat-fed mice, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 312(5), G474–G487.
- Hammad, A. M., Shimamoto, T., 2010, Towards a compatible probiotic-antibiotic combination therapy: assessment of antimicrobial resistance in the Japanese probiotics, *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1349–1360.

- Han, X., Song, H., Wang, Y., Sheng, Y., & Chen, J., 2015, Sodium butyrate protects the intestinal barrier function in peritonitic mice, *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(3), 4000–4007.
- Helling, R. B., Vargas, C. N., Adams, J., 1987, Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment, *Genetics*, 116(3), 349–358.
- Heng, N., Tagg, J., 2006, What's in a name? Class distinction for bacteriocins, *Nature Review Microbiology*, 4, 160.
- Hu, E. D., Chen, D. Z., Wu, J. L., Lu, F. B., Chen, L., Zheng, M. H., Li, H., Huang, Y., Li, J., Jin, X. Y., Gong, Y. W., Lin, Z., Wang, X. D., Xu, L. M., & Chen, Y. P., 2018, High fiber dietary and sodium butyrate attenuate experimental autoimmune hepatitis through regulation of immune regulatory cells and intestinal barrier, *Cellular immunology*, 328, 24–32.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Gibson, G. R., McCleary, B. V., Rastall, R. A., 2008, In vitro fermentation of oat and barley derived beta-glucans by human faecal microbiota, *FEMS microbiology ecology*, 64(3), 482–493.
- Husted, A.S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S.A., Schwartz, T.W., 2017, GPCR-mediated signaling of metabolites, *Cell Metabolism*, 25,777–96.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., 2005, Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *The Journal of Cell Biology*, 171, 939–945.
- Itoh, H., Kataoka, H., 2002, Roles of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and its inhibitor HAI-1 in the regeneration of injured gastrointestinal mucosa, *Journal of gastroenterology*, 37 Suppl 14, 15–21.
- Javadi, L., Khoshbaten, M., Safaiyan, A., Ghavami, M., Abbasi, M. M., Gargari, B. P., 2018, Pro- and prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease, *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 27(5), 1031–1039.
- Ji, Y., Sakata, Y., Tso, P., 2011, Nutrient-induced inflammation in the intestine, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(4), 315–321.
- Johnson-Henry, K. C., Pinnell, L. J., Waskow, A. M., Irrazabal, T., Martin, A., Hausner, M., & Sherman, P. M., 2014, Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury, *The Journal of nutrition*, 144(11), 1725–1733.
- Joshi, S., Udani, S., Sen, S., Kirolikar, S., Shetty, A., 2019, *Bacillus Clausii* Septicemia in a Pediatric Patient After Treatment With Probiotics, *The Pediatric infectious disease journal*, 38(9), e228–e230.

- Kennedy, R.J., Hoper, M., Deodhar, K., Kirk, S.J., Gardiner, K.R., 2000, Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis, *Scand J Gastroenterol*, 35, 1266-1271.
- Keshavarzian, A., Fields, J. Z., Vaeth, J., Holmes, E. W., 1994, The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability, *The American journal of gastroenterology*, 89(12), 2205–2211.
- Khan, W.I., Collins, S.M., 2006, Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation, *Clinical & Experimental Immunology*, 143, 389–397.
- Khatri, I., Sharma, G., Subramanian, S., 2019, Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties, *BMC Microbiology*, 19, 307.
- Kim, M., Qie, Y., Park, J., & Kim, C. H., 2016, Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses, *Cell host & microbe*, 20(2), 202–214.
- Kim, M.H., Kang, S.G., Park, J.H., Yanagisawa, M., Kim, C.H., 2013, Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice, *Gastroenterology*, 145, 396–406.e10.
- Kimura, I., Inoue, D., Hirano, K., & Tsujimoto, G., 2014, The SCFA Receptor GPR43 and Energy Metabolism, *Frontiers in endocrinology*, 5, 85.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H., Tsujimoto, G., 2013, The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43, *Nature communications*, 4, 1829.
- Klinkspoor, J. H., Kuver, R., Savard, C. E., Oda, D., Azzouz, H., Tytgat, G. N., Groen, A. K. & Lee, S. P., 1995, Model bile and bile salts accelerate mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells, *Gastroenterology*, 109, 264–274.
- Knaapen, M., Kootte, R. S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Dallinga-Thie, G. M., Levi, M., Stroes, E. S., Nieuwdorp, M., 2013, Obesity, non-alcoholic fatty liver disease, and atherothrombosis: a role for the intestinal microbiota?, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(4), 331–337.
- Ktsoyan, Z. A., Mkrtchyan, M. S., Zakharyan, M. K., Mnatsakanyan, A. A., Arakelova, K. A., Gevorgyan, Z. U., Sedrakyan, A. M., Hovhannisyan, A. I., Arakelyan, A. A., Aminov, R. I., 2016, Systemic Concentrations of Short Chain Fatty Acids Are Elevated in Salmonellosis and Exacerbation of Familial Mediterranean Fever, *Frontiers in microbiology*, 7, 776.
- Laugerette, F., Vors, C., Gélœn, A., Chauvin, M. A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R., Laville, M., Vidal, H., Michalski, M. C., 2011, Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation, *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(1), 53–59.

- Lederberg, J., McCray, A.T., 2001, Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words, *Scientist*, 15, 8.
- Lee, H.L., 2015, Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases, *Intestinal research*, 13, 11-8.
- Li, L. L., Wang, Y. T., Zhu, L. M., Liu, Z. Y., Ye, C. Q., Qin, S., 2020, Inulin with different degrees of polymerization protects against diet-induced endotoxemia and inflammation in association with gut microbiota regulation in mice, *Scientific reports*, 10(1), 978.
- Li, Z., Yi, C. X., Katiraei, S., Kooijman, S., Zhou, E., Chung, C. K., Gao, Y., van den Heuvel, J. K., Meijer, O. C., Berbée, J., Heijink, M., Giera, M., Willems van Dijk, K., Groen, A. K., Rensen, P., & Wang, Y., 2018, Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit, *Gut*, 67(7), 1269–1279.
- Lin, D., Qu, L. J., Gu, H., Chen, Z., 2001, A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Journal of applied microbiology*, 91(6), 1044–1050.
- Lippolis, R., Siciliano, R. A., Mazzeo, M. F., Abbrescia, A., Gnani, A., Sardanelli, A. M., Papa, S., 2013, Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains, *Proteome science*, 11(1), 28.
- Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, X., Xia, H., Liu, Z., Cui, B., Liang, P., Xi, L., Jin, J., Ying, X., Wang, X., Zhao, X., Li, W., ... Wang, W., 2017, Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention, *Nature medicine*, 23(7), 859–868.
- Liu, W. T., Yang, Y. L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N. M., Yang, J. Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeier, C. D., Straight, P. D., Pevzner, P. A., Pogliano, J., Nizet, V., Pogliano, K., Dorrestein, P. C., 2010, Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16286–16290.
- Liu, T. W., Cephas, K. D., Holscher, H. D., Kerr, K. R., Mangian, H. F., Tappenden, K. A., & Swanson, K. S., 2016, Nondigestible Fructans Alter Gastrointestinal Barrier Function, Gene Expression, Histomorphology, and the Microbiota Profiles of Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice, *The Journal of nutrition*, 146(5), 949–956.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., and Knight, R., 2012, Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota, *Nature*, 489, 220–230.
- Maes, M., Kubera, M., Leunis, J. C., 2008, The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression, *Neuro endocrinology letters*, 29(1), 117–124.
- Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L., Ferenci, T., 2006, Clonal Adaptive Radiation in a Constant Environment, *Science*, 313(5786), 514.

- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., 1998, Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration, *The Journal of Cell Biology*, 142, 117–127.
- Maslowski, K. M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M., Mackay, C.R., 2009, Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43, *Nature*, 461, 1282–1286.
- Matheus, V., Monteiro, L., Oliveira, R., Maschio, D., & Collares-Buzato, C.B., 2017, Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice, *Experimental Biology and Medicine*, 242, 1214–1226.
- Mazza, P., Zani, F., Martelli, P., 1992, Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy, *Bollettino chimico farmaceutico*, 131(11), 401–408.
- McBain, A. J., Macfarlane, G. T., 2001, Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems, *Journal of medical microbiology*, 50(9), 833–842.
- McClain, C. J., Barve, S., Barve, S., Deaciuc, I., Hill, D. B., 1998, Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 22(5 Suppl), 248S–252S.
- McFarlin, B. K., Henning, A. L., Bowman, E. M., Gary, M. A., Carbajal, K. M., 2017, Oral spore-based probiotic supplementation was associated with reduced incidence of post-prandial dietary endotoxin, triglycerides, and disease risk biomarkers, *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 8(3), 117–126.
- Mills, E., O'Neill, L.A., 2014, Succinate: a metabolic signal in inflammation, *Trends in Cell Biology*, 24(5), 313–20.
- Moens, F., Verce, M., De Vuyst, L., 2017, Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans, *International journal of food microbiology*, 241, 225–236.
- Moore, B. A., Sharkey, K. A. & Mantle, M., 1993, Neural mediation of cholera toxin-induced mucin secretion in the rat small intestine, *Am. J. Physiol*, 265, G1050–G1056.
- Mörkl, S., Lackner, S., Meinitzer, A., Mangge, H., Lehofer, M., Halwachs, B., Gorkiewicz, G., Kashofer, K., Painold, A., Holl, A. K., Bengesser, S. A., Müller, W., Holzer, P., & Holasek, S. J., 2018, Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women, *European journal of nutrition*, 57(8), 2985–2997.
- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N., Mai, V., 2010, Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques, *The Journal of pediatrics*, 156(1), 20–25.

- Murphy, O., 2001, Non-polyol low-digestible carbohydrates: Food applications and functional benefits, *British Journal of Nutrition*, 85, 47-53.
- Nachin, L., Nannmark, U., Nyström, T., 2005, Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility, *Journal of bacteriology*, 187(18), 6265–6272.
- Nakamura, J., Kubota, Y., Miyaoka, M., Saitoh, T., Mizuno, F., Benno, Y., 2002, Comparison of four microbial enzymes in *Clostridia* and *Bacteroides* isolated from human feces, *Microbiology and immunology*, 46(7), 487–490.
- Narberhaus, F., 2002, α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 64.
- Nettleton, J. E., Klancic, T., Schick, A., Choo, A. C., Shearer, J., Borgland, S. L., Chleilat, F., Mayengbam, S., & Reimer, R. A., 2019, Low-Dose Stevia (Rebaudioside A) Consumption Perturbs Gut Microbiota and the Mesolimbic Dopamine Reward System. *Nutrients*, 11(6), 1248.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P., 2000, Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548.
- Nishina, P. M., Freedland, R. A., 1990, Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes, *The Journal of nutrition*, 120(7), 668–673.
- Nyman, M., 2002, Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose, *The British journal of nutrition*, 87 Suppl 2, S163–S168.
- Ojima, M., Motooka, D., Shimizu, K., Gotoh K., Shintani, Yoshiya K., Nakamura S., Ogura H., Iida T., Shimazu T., 2016, Metagenomic analysis reveals dynamic changes of whole gut microbiota in the acute phase of intensive care unit patients, *Digestive Diseases and Sciences*, 61, 1628–34.
- Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., Tohya, K., Ishizaki, T., Niki, I., Kimura, T., 2013, Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes, *Biochemical and biophysical research communications*, 442(3-4), 227–233.
- Onami, T. M., Harrington, L. E., Williams, M. A., Galvan, M., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Manjunath, N., Baum, L. G., Pearce, B. D., Ahmed, R., 2002, Dynamic regulation of T cell immunity by CD43, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(12), 6022–6031.
- O'Neil D. A., 2003, Regulation of expression of beta-defensins: endogenous enteric peptide antibiotics, *Molecular immunology*, 40(7), 445–450.
- Opal, S.M., 2010, Endotoxins and other sepsis triggers, *Contributions to Nephrology*, 167, 14-24.

- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R., 2013, Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 33, 345–364.
- Paparo, L., Tripodi, L., Bruno, C., Pisapia, L., Damiano, C., Pastore, L., & Berni Canani, R., 2020, Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an in vitro model of Rotavirus infection. *Scientific reports*, 10(1), 12636.
- Pastor Rojo, O., López San Román, A., Albéniz Arbizu, E., de la Hera Martínez, A., Ripoll Sevillano, E., Albillos Martínez, A., 2007, Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease, *Inflammatory bowel diseases*, 13(3), 269–277.
- Patel, C., Patel, P., Acharya, S., 2020, Therapeutic Prospective of a Spore-Forming Probiotic-*Bacillus clausii* UBBC07 Against Acetaminophen-Induced Uremia in Rats, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(1), 253–258.
- Perry, R. J., Peng, L., Barry, N. A., Cline, G. W., Zhang, D., Cardone, R. L., Petersen, K. F., Kibbey, R. G., Goodman, A. L., Shulman, G. I., 2016, Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome, *Nature*, 534(7606), 213–217.
- Petersen, A., Heegaard, P.M., Pedersen, A.L., Andersen, J.B., Sorensen, R.B., Frokiaer, H., Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Poulsen, M., Licht, T.R., 2009, Some putative prebiotics increase the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice, *BMC Microbiol*, 9, 245.
- Peterson, J., Garges, S., 2009, The NIH Human Microbiome Project, *Genome Research*, 19, 2317–2323.
- Petit, C. S., Barreau, F., Besnier, L., Gandille, P., Riveau, B., Chateau, D., Roy, M., Berrebi, D., Svrcek, M., Cardot, P., Rousset, M., Clair, C., Thenet, S., 2012, Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 143(1), 122–32.e15.
- Pfeiffer, T., Bonhoeffer, S., 2004, Evolution of cross-feeding in microbial populations, *The American naturalist*, 163(6), E126–E135.
- Pingitore, A., Chambers, E. S., Hill, T., Maldonado, I. R., Liu, B., Bewick, G., Morrison, D. J., Preston, T., Wallis, G. A., Tedford, C., Castañera González, R., Huang, G. C., Choudhary, P., Frost, G., Persaud, S. J., 2017, The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro, *Diabetes, obesity & metabolism*, 19(2), 257–265.
- Pourghassem Gargari, B., Dehghan, P., Aliasgharzadeh, A., Asghari Jafar-abadi, M., 2013, Effects of High Performance Inulin Supplementation on Glycemic Control and Antioxidant Status in Women with Type 2 Diabetes, *Diabetes & Metabolism Journal*, 37(2):140-148.
- Pradhan, B., Guha, D., Naik, A. K., Banerjee, A., Tambat, S., Chawla, S., Senapati, S., Aich, P., 2019, Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* Modulate Gut Microbiota in Th1- and

- Th2-Biased Mice to Ameliorate Salmonella Typhimurium-Induced Diarrhea, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(3), 887–904.
- Priebe, M. G., Wang, H., Weening, D., Schepers, M., Preston, T., Vonk, R. J., 2010, Factors related to colonic fermentation of nondigestible carbohydrates of a previous evening meal increase tissue glucose uptake and moderate glucose-associated inflammation, *The American journal of clinical nutrition*, 91(1), 90–97.
- Psichas, A., Sleeth, M. L., Murphy, K. G., Brooks, L., Bewick, G. A., Hanyaloglu, A. C., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Frost, G., 2015, The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents, *International journal of obesity (2005)*, 39(3), 424–429.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., ... Wang, J., 2012, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes, *Nature*, 490(7418), 55–60.
- Rabiu, B. A., Gibson, G. R., 2002, Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77(3), 443–453.
- Raetz, C. R., Whitfield, C., 2002, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annual review of biochemistry*, 71, 635–700.
- Rajilic-Stojanovic, M., de Vos, W.M., 2014, The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota, *The FEMS Microbiology Reviews*, 38, 996–1047.
- Ripert, G., Racedo, S. M., Elie, A. M., Jacquot, C., Bressollier, P., Urdaci, M. C., 2016, Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(6), 3445–3454.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., ... Meheust, A., 2010, Prebiotic effects: metabolic and health benefits, *The British journal of nutrition*, 104 (Suppl 2), S1–S63.
- Robertson, M. D., Bickerton, A. S., Dennis, A. L., Vidal, H., & Frayn, K. N., 2005, Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism, *The American journal of clinical nutrition*, 82(3), 559–567.
- Roediger, W.E.W., 1982, Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon, *Gastroenterology*, 83,424–9.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., 2005, Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6150–6158.

- Rowland, I. R., Mallett, A. K., Wise, A., 1985, The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities, *Critical reviews in toxicology*, 16(1), 31–103.
- Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Wallace, R. J., Duthie, G. G., Flint, H. J., 2011, High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health, *The American journal of clinical nutrition*, 93(5), 1062–1072.
- Ryan, S.M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2006, Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5289–5296.
- Saising, J., Dube, L., Ziebandt, A. K., Voravuthikunchai, S. P., Nega, M., Götz, F., 2012, Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 5804–5810.
- Salek, R. M., Maguire, M. L., Bentley, E., Rubtsov, D. V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B. C., Haselden, J. N., Cox, R. D., Connor, S. C., Griffin, J. L., 2007, A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human, *Physiological genomics*, 29(2), 99–108.
- Santos, A. L., Lindner, A. B., 2017, Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 5716409.
- Schroeder, B. O., Birchenough, G., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M., Hansson, G. C., & Bäckhed, F., 2018, Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration, *Cell host & microbe*, 23(1), 27–40.e7.
- Schwartz, A., Hold, G. L., Duncan, S. H., Gruhl, B., Collins, M. D., Lawson, P. A., Flint, H. J., Blaut, M., 2002, *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces, *Systematic and applied microbiology*, 25(1), 46–51.
- Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S. H., & Flint, H. J., 2014, Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro, *FEMS microbiology ecology*, 87(1), 30–40.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013, The influence of diet on the gut microbiota, *Pharmacological Research*, 69, 52–60.
- Seifart Gomes, C., Izar, B., Pazan, F., Mohamed, W., Mraheil, M. A., Mukherjee, K., Billion, A., Aharonowitz, Y., Chakraborty, T., Hain, T., 2011, Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo, *PloS one*, 6(9), e24965.
- Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A., Ghelardi, E., 2001, Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* Strains marketed for use in oral bacteriotherapy, *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 834–839.

- Shukla, S. D., Budden, K. F., Neal, R., Hansbro, P. M., 2017, Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung, *Clinical Translational Immunology*, 133, 6(3).
- Silva, E., Passos, R., da H, Ferri, M.B., de Figueiredo, L.F., 2008, Sepsis: from bench to bedside, *Clinics (Sao Paulo)*, 63(1):109-20.
- Sina, C., Gavrilova, O., Förster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., Franke, A., Ott, S., Häslér, R., Nikolaus, S., Fölsch, U.R., Rose-John, S., Jiang, H.P., Li, J., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2009, G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation, *The Journal of Immunology*, 183, 7514–7522.
- Sudha, M. R., Bhonagiri, S., Kumar, M. A., 2013, Efficacy of *Bacillus clausii* strain UBBC-07 in the treatment of patients suffering from acute diarrhoea, *Beneficial microbes*, 4(2), 211–216.
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z., Cong, Y., 2017, Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases, *Journal of gastroenterology*, 52(1), 1–8.
- Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., Juge, N., 2015, Mucin glycan foraging in the human gut microbiome, *Frontiers in genetics*, 6, 81.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003, Toll-like receptors, *Annual Review Immunology*, 21, 335–376.
- Tarini, J., Wolever, T. M., 2010, The fermentable fibre inulin increases postprandial serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects, *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 35(1), 9–16.
- Ten Bruggencate, S. J., Bovee-Oudenhoven, I. M., Lettink-Wissink, M. L., & Van der Meer, R., 2005, Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats, *The Journal of nutrition*, 135(4), 837–842.
- Tewari, V. V., Dubey, S. K., & Gupta, G., 2015, *Bacillus clausii* for Prevention of Late-onset Sepsis in Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial, *Journal of tropical pediatrics*, 61(5), 377–385. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmv050>
- Timm, D. A., Stewart, M. L., Hospattankar, A., Slavin, J. L., 2010, Wheat dextrin, psyllium, and inulin produce distinct fermentation patterns, gas volumes, and short-chain fatty acid profiles in vitro, *Journal of medicinal food*, 13(4), 961–966.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., ve diğ., 2012, Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2, *Diabetes*, 61, 364–71.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012, Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism, *Nature*, 489, 242–249.

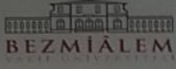
- Treves, D. S., Manning, S., Adams, J., 1998, Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*, *Molecular biology and evolution*, 15(7), 789–797.
- Turner, J.R., 2006, Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application, *American Journal of Pathology*, 169, 1901-9.
- Turner, J.R., Rill, B.K., Carlson, S.L., 1997, Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation, *American Journal of Physiology*, 273, 1378–1385.
- Valentini, L., Ramminger, S., Haas, V., Postrach, E., Werich, M., Fischer, A., Koller, M., Swidsinski, A., Bereswill, S., Lochs, H., Schulzke, J. D., 2014, Small intestinal permeability in older adults, *Physiological reports*, 2(4), e00281.
- van der Beek, C. M., Canfora, E. E., Kip, A. M., Gorissen, S., Olde Damink, S., van Eijk, H. M., Holst, J. J., Blaak, E. E., Dejong, C., Lenaerts, K., 2018, The prebiotic inulin improves substrate metabolism and promotes short-chain fatty acid production in overweight to obese men, *Metabolism: clinical and experimental*, 87, 25–35.
- van der Beek, C. M., Canfora, E. E., Lenaerts, K., Troost, F. J., Damink, S., Holst, J. J., Masclee, A., Dejong, C., Blaak, E. E., 2016, Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men, *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(22), 2073–2082.
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009, Stem cells, selfrenewal, and differentiation in the intestinal epithelium, *Annual Review Physiology*, 71, 241–260
- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis, S., Verbeke, K., Raes, J., 2017, Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota, *Gut*, 66(11), 1968–1974.
- Varankovich, N. V., Nickerson, M. T., Korber, D. R., 2015, Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases, *Frontiers in microbiology*, 6, 685.
- Varzakas T., Kandylis P., Dimitrellou D., Salamoura C., Zakynthinos G., Proestos C., 2018, Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods, Elsevier, London, ISBN: 9780081018927.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., Goloubinoff, P., 1998, The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network, *The Journal of biological chemistry*, 273(18), 11032–11037.
- Verma, A., Shukla, G., 2014, Synbiotic (*Lactobacillus rhamnosus*+*Lactobacillus acidophilus*+inulin) attenuates oxidative stress and colonic damage in 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon carcinogenesis in Sprague-Dawley rats: a long-term study, *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 23(6), 550–559.

- Vetrani, C., Costabile, G., Luongo, D., Naviglio, D., Rivellese, A. A., Riccardi, G., Giacco, R., 2016, Effects of whole-grain cereal foods on plasma short chain fatty acid concentrations in individuals with the metabolic syndrome, *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(2), 217–221.
- Videla, S., Vilaseca, J., Antolín, M., García-Lafuente, A., Guarner, F., Crespo, E., Casalots, J., Salas, A., Malagelada, J. R., 2001, Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat, *The American journal of gastroenterology*, 96(5), 1486–1493.
- Vreugdenhil, A. C., Rousseau, C. H., Hartung, T., Greve, J. W., van 't Veer, C., Buurman, W. A., 2003, Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(3), 1399–1405.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., Flint, H. J., 2011, Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota, *The ISME journal*, 5(2), 220–230.
- Walker, A.W., Duncan, S.H., Leitch, E.C.M., Child, M.W., Flint, H.J., 2005, Ph and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3692–3700.
- Wang, Y. N., Meng, X. C., Dong, Y. F., Zhao, X. H., Qian, J. M., Wang, H. Y., Li, J. N., 2019, Effects of probiotics and prebiotics on intestinal microbiota in mice with acute colitis based on 16S rRNA gene sequencing, *Chinese medical journal*, 132(15), 1833–1842.
- Wang, Z., Zhang, X., Zhu, L., Yang, X., He, F., Wang, T., Bao, T., Lu, H., Wang, H., Yang, S., 2020, Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in mice, *International immunopharmacology*, 78, 106062.
- Warren, H.S., Fitting, C., Hoff, E., Adib-Conquy, M., Beasley-Topliffe, L., Tesini, B., Liang, X., Valentine, C., Hellman, J., Hayden, D., Cavaillon, J.M., 2010, Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum, *The Journal of Infectious Disease*, 201 (2), 223–32.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K. R., Fellermann, K., Schroeder, J. M., Stange, E. F., 2003, Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis, *Inflammatory bowel diseases*, 9(4), 215–223.
- Wilson, K. A., Han, Y., Zhang, M., Hess, J. P., Chapman, K. A., Cline, G. W., Tochtrop, G. P., Brunengraber, H., Zhang, G. F., 2017, Inter-relations between 3-hydroxypropionate and propionate metabolism in rat liver: relevance to disorders of propionyl-CoA metabolism. *American journal of physiology, Endocrinology and metabolism*, 313(4), E413–E428.

- Wolever, T. M., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L., Jenkins, D. J., 1989, Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects, *The American journal of gastroenterology*, 84(9), 1027–1033.
- Wolever, T. M., Chiasson, J. L., 2000, Acarbose raises serum butyrate in human subjects with impaired glucose tolerance, *The British journal of nutrition*, 84(1), 57–61.
- Yang, F., Wang, L. K., Li, X., Wang, L. W., Han, X. Q., & Gong, Z. J., 2014, Sodium butyrate protects against toxin-induced acute liver failure in rats, *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 13(3), 309–315.
- Yoo, J. Y., Kim, S. S., 2016, Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders, *Nutrients*, 8(3), 173.
- Zaborin, A., Smith, D., Garfield, K., Quensen J., Shakhsher B., Kade M., Tirrell M., Tiedje M., Gilbert, J.A., Zaborina O., Alverdy J.C., 2014, Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness, *MBio*, 5, e01361–14.
- Zaibi, M. S., Stocker, C. J., O'Dowd, J., Davies, A., Bellahcene, M., Cawthorne, M. A., Brown, A. J., Smith, D. M., Arch, J. R., 2010, Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids, *FEBS letters*, 584(11), 2381–2386.
- Zaidi, A. K., Huskins, W. C., Thaver, D., Bhutta, Z. A., Abbas, Z., Goldmann, D. A., 2005, Hospital-acquired neonatal infections in developing countries, *Lancet (London, England)*, 365(9465), 1175–1188.
- Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2012, *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon, *The ISME Journal*, 6, 1535–1543.
- Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Yu, L., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H., Zhu, X., Shi, Y., Shen, Q., Dong, W., ... Zhang, C., 2018, Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes, *Science (New York, N.Y.)*, 359(6380), 1151–1156.
- Zou, J., Chassaing, B., Singh, V., Pellizzon, M., Ricci, M., Fythe, M. D., Kumar, M. V., Gewirtz, A. T., 2018, Fiber-Mediated Nourishment of Gut Microbiota Protects against Diet-Induced Obesity by Restoring IL-22-Mediated Colonic Health, *Cell host & microbe*, 23(1), 41–53.e4.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Karar Metni.




**T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

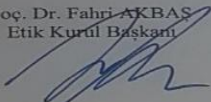
SAYI: 2019/123 30.05.2019
KONU: Sn. Prof. Dr. Cihan Tansel DEMİRCİ

Sayın, Prof. Dr. Cihan Tansel DEMİRCİ

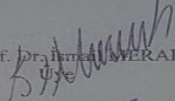
“Endotoksemik Sıçanlarda Prebiyotik ve Probiyotik Uygulamasının Bağırsak Geçirgenliği Üzerine Etkileri” başlıklı projenize ait başvurunuz 30.05.2019 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Sayısı	48

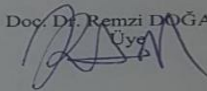
Doç. Dr. Fahri AKBAS
Etik Kurul Başkanı



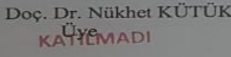
Prof. Dr. İsmail YEREL
Üye



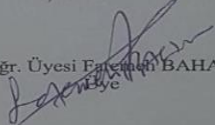
Doç. Dr. Remzi DOĞAN
Üye



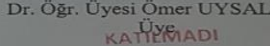
Doç. Dr. Nüket KÜTÜK
Üye
KATİEMADI



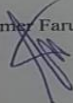
Dr. Öğr. Üyesi Fatma BAHADORİ
Üye



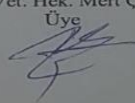
Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL
Üye
KATİEMADI



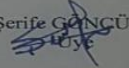
Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ÖZER
Üye



Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye



Şerife GÖNCÜ
Üye



Semra NİŞANCI
Üye



• Etik kurumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tarık Talha GÖZDEN
Doğum Yeri	Edirne
Doğum Tarihi	08.08.1996
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+90 535 700 30 35
E-Posta Adresi	tarikgozden@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji Programı