ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GASTROİNTESTİNAL BOZUKLUKLARIN İYİLEŞTİRİLMESİNDE *BİFİDOBACTERİUM* SPP'NİN ROLÜ

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI tarafından hazırlanan **"Gastrointestinal Bozuklukların İyileştirilmesinde *Bifidobacterium* SPP'nin Rolü"** adlı tez çalışması 26/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Majida AL-QAYIM

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Atilla ÇAKIR
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bingöl Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Gastrointestinal Bozuklukların İyileştirilmesinde *Bifidobacterium* SPP'nin Rolü**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (26/07/2022).

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GASTROİNTESTİNAL BOZUKLUKLARIN İYİLEŞTİRİLMESİNDE *BİFİDOBACTERİUM* SPP'NİN ROLÜ

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Majida AL-QAYIM

Bu çalışma, ratlarda asetik asit uygulaması ile oluşturulan kolitte *Bifidobacterium*'un tedavi aktivitelerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Probiyotik olarak *Bifidobacterium infantis*'in ratlarda deneysel olarak oluşturulan kolitteki ve bağırsak mukozası üzerindeki iyileştirici etkis belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle toplam 24 Wister dişi rat, kontrol ve 3 uygulama grubunda, rastgele ve eşit olarak, her birinde altı hayvan olacak şekilde dört grup oluşturulmuştur. İlk grup kontrol grubu olarak ayrılmıştır. İkinci gruba iki hafta boyunca günde 1mL *B. infantis*, üçüncü gruba anüs kenarına 1 mL asetik asit, dördüncü gruba ise hem *B.infantis* hem de asetik asit uygulanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda *Bifidobacterium infantis* kullanımı sonucunda iltihaplanma ve ishal gibi bağırsak rahatsızlıklarının tedavisinde probiyotiklerin etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada asetik asit ile tedavi edilen ratlarda daha düşük ALB seviyeleri gözlemlenmiştir. Çalışmada yapılan in vivo ve in vitro incelemeler soucunda, *B. infantis* uygulamasının asetik asit kaynaklı inflamasyon, apoptoz ve oksidatif hasarda koruyucu bir rol üstlendiği ortaya çıkmıştır. Buna bağlı olarak azalan kolit şiddeti tedavinin ne kadar etkili olduğunu göstermektedir.

2022, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Bifidobacterium infantis*, Asetik asit, Gastrointestinal bozukluk, Rat

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ROLE OF *BIFIDOBACTERIUM INFANTIS* IN IMPROVEMENT GASTROINTESTINAL DISORDERS

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Majida AL-QAYIM

This study was carried out to investigate the treatment activities of *Bifidobacterium* in colitis induced by acetic acid application in rats. In this study, it was tried to determine the curative effect of *Bifidobacterium infantis* as a probiotic in experimentally induced colitis in rats and on the intestinal mucosa. For this reason, four groups were formed randomly and equally, with a total of 24 Wister female rats, control and 3 treatment groups, with six animals in each. The first group was allocated as the control group. The second group received 1 ml of *Bifidobacterium infantis* daily for two weeks, the third group received 1 ml of acetic acid on the side of the anus, and the fourth group received both *B.infantis* and acetic acid. In our results, it has been determined that probiotics are effective in the treatment of intestinal disorders such as inflammation and diarrhea as a result of the use of *Bifidobacterium infantis*. In addition, lower ALB levels were observed in rats treated with acetic acid in our study. As a result of in vivo and in vitro examinations in our study, it was revealed that *B. infantis* administration played a protective role in AA-induced inflammation, apoptosis and oxidative damage. Accordingly, the decreasing colitis severity shows that the treatment is an effective treatment.

2022, 44 pages

Keywords: *Bifidobacterium infantis*, Acetic acid, Gastrointestinal disorders, Rat

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan değerli tez danışmanım. Doç. Dr. Mehmet SEZGİN'e, uzmanlık eğitimim sırasında, katkı sağlayan bilgi ve deneyimlerini paylaşan eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Majida AL-QAYIM'a, klinik şeflerime, öğretmenlerime ve uzmanlara sevgili arkadaşlarıma, meslektaşlarıma eğitim hayatım boyunca göstermiş oldukları özveri için teşekkür ederim.

Başarımın en büyük mimarı olan değerli anneme, desteği ile bana hissettirdikleri için babama her zaman teşekkür ederim.

Eğitimime verdiği tüm destekler ve hayatıma kattığı her şey için, huzur ve neşe kaynağım, eşime, kardeşlerime ve canım oğlum Hasan'a, destekleri için çok teşekkür ederim.

Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

Çankırı, Temmuz 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1 GİRİŞ **1**
2 LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Bifidobacterium* Tanımlanması **3**
2.2 *Bifidobacterium*'un Sınıflandırması **3**
2.3 *Bifidobacterium*'un Tarih Boyunca Bilinirliği **4**
2.4 Probiyotik Olarak *Bifidobacterium* **5**
2.5 *Bifidobacterium*'un Anti-İnflamatuar Rolü **6**
2.6 Bağırsakta Probiyotiklerin Büyümesini Etkileyen Faktörler **8**
2.7 *Bifidobacterium infantis* Kolonizasyonu **9**
2.8 Kolonizasyonda Etkili Faktörler ve Hastalıklar **12**
2.9 Kolit **14**
3 MATERYAL VE YÖNTEM **16**
3.1 Çalışmanın Dizaynı **16**
3.1.1 Bakteriyel suş **16**
3.1.2 Bakteriyel suşun aktivasyonu **16**
3.1.3 Ratlara uygulanacak dozun belirlenmesi **16**
3.2 Deneme Dizaynı **18**
3.3 Deney Hayvanları **18**
3.4 Kolit İndüksiyonu **19**
3.5 Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması **19**
3.6 Mikroskobik Histopatolojik, Histomorfoloji Ölçümü ve İmmünohistokimya için Bağırsak Doku Örnekleri Toplama **20**

3.7 Yumuşak Doku için Hematoksilen ve Eozin Boyası (H&E) 20
3.7.1 Hematoksilen ve eozin boyama (H&E) prosedürü 20
3.8 Miyeloperoksidaz (MPO) 21
3.9 Bcl-2 22
3.10 İstatistiksel Analiz 22
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1 Ratlarda Kolit Etkisine Karşı *B. infantis*'in Albümen, Globulin ve Toplam Protein Üzerine Etkisi 23
4.2 Ratlarda Kolitin Etkilerine Karşı *B. infantis*'in Villus Yüksekliği, Villus Kalınlığı ve Kript Derinliği Üzerine Etkisi (Histomorfolojik Ölçüm) 23
4.2.1 Ratlarda *B. İnfantis*'in kolit bezleri kalınlığı ve derinliği üzerine etkisi 24
4.3 Histopatolojik Ölçüm 25
4.4 İmmünohistokimya 27
5 SONUÇ VE ÖNERİLER 30
KAYNAKLAR 34
ÖZGEÇMİŞ 44

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Aseik asit
ALB	Albumin
B	*Bifidobacterium*
Bcl2	B hücreli lenfoma 2
C	Kolit
CAC	Kolit ile ilişkili kolorektal kanser
CAZy	Karbonhidrat aktif enzimler
CRC	Kolorektal kanser
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EIA	Enzim immunoassay
GHs	Glikozil hidrolazlar
GIT	Gastrointestinal sistem
GLUB	Globülin
H&E	Hematoksilen ve eozin boyama
HMOs	Insan milkoligo sakkaritler
IBD	Enflamatuar barsak hastalığı
IECs	İntestinal epitel hücreler
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkaarit
LTA	Lipoteikoik asit
MAPK	Mitojenle aktive protein kinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
PH	Hidrojen potansiyeli
SAS	İstatistiksel analiz sistemi
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktörü
TP	Toplam protein
UC	Ülseratif kolit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Bifidobacterium* taksonomisi 4
Şekil 4.1 Mikroskop altında; Kolonik yapının normal morfolojik görünümü Kontrol grubu (A), Dejenere bez kalıntıları ile esas olarak lenfoid dokudan oluşan submukozal dokunun nekrotik bulguları asetik asit kolit grubu (B), B. İnfantis grubu Kolon mukozasının lamina propriasında orta derecede inflamatuar infiltrat (C) ve B. infantum'un asetik asit koliti (D) Submukozal bezler arasında hafif mononükleer hücre infiltrasyonu görünümü kolon kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri (10X H&E boyası) 25
Şekil 4.2 Mikroskop altında Kontrol grubu (A), asetik asit grubu Submukozal bezlerde belirgin olmayan patolojik değişiklik, Goblet hücre hiperplazisi ile submukozal bezlerin şiddetli dejeneratif ve nekrotik bulguları (B), B. infantis grubu Orta derecede goblet hücre hiperplazisi ve kolon mukozasının hiperplazisi (C) ve Goblet hücreleri hiperplazisi ile hafif submukozal mononükleer hücre infiltrasyonu görünümü. B. infantum'da asetik asit koliti (D) bulunan kolon kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri. (40X H&E boyası) 26
Şekil 4.3 Mikroskop altında Kontrol grubu (A), asetik asit grubu Mukozal ve submukozal dokunun normal görünümü, Nekrotik kalıntı ve orta derecede inflamatuar infiltrasyon ile belirgin bağırsak villus nekrozları (B), B. infantis grubu Propria dokusunun hafif infiltrasyonu ile bağırsak villusunun orta derecede uzaması (C) ve Orta derecede submukozal mononükleer hücre infiltrasyonu ile orta derecede villöz füzyon görünümü B. infantum'un bağırsak kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri asetik asit koliti (D) (10X H&E boyası) 27
Şekil 4.4 10X'te MPO bağırsak bölümlerinin ışık mikroskobik görünümleri 28
Şekil 4.5 40X'te MPO bağırsak bölümlerinin ışık mikroskobik görünümleri 28
Şekil 4.6 Kolon duvar kesitlerinin ışık mikroskobik fotoğrafları Bcl2 X10 29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in albumen, globulin ve total protein üzerindeki etkili rolü.....23
Çizelge 4.2 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in villus yüksekliği, villus kalınlığı, kript derinliği üzerine etkili rolü.....24
Çizelge 4.3 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in bez kalınlığı ve bez derinliği üzerine etkili rolü.....24

1 GİRİŞ

Bifidobacterium, insanlarda mide-bağırsak sisteminde ve vajinada yaşayan Gram pozitif mikroorganizmalardır. Anaerobiktirler ve sporları yoktur. *Bifidobacterium* cinsinde 50'den fazla tür vardır, ancak insanlarda sadece 10'u tanımlanmıştır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde *Bifidobacterium*, bağırsak mikrobiyotasının %80'inden fazlasını oluşturur, ancak yetişkin dışkı florasının sadece %3-6'sını oluşturur (Saavedra 2007, Lewis *et al.* 2015). Ayrıca, türlerin dağılımı yeni doğanlar ve yetişkinler arasında farklılık gösterir. Yetişkin bağırsak florasındaki başlıca bifidobakteri türleri, *Bifidobacterium adolescent* ve *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*'dur. Bebeklerde ise bağırsak yolundaki baskın tür *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ve *Bifidobacterium breve*'dir (Milani *et al.* 2016, Arboleya *et al.* 2016). *Bifidobacterium* cinsinin, seçilmiş türlerinin, dekompoziyonlarının yanı sıra patojenlerle rekabet, bağışıklık sistemi düzenlemesi (Round and Mazmanian 2009), karbonhidrat yıkımı (Round and Mazmanian 2009), gıdalardan üretilen karbonhidratlar dahil olmak üzere konakçıya sağlık açısından avantajlar sağladığı düşünülmektedir (Pokusaeva *et al.* 2011). *Bifidobacterium,* yeterli kanıt olmamasına rağmen, bu faydalarına dayalı olarak hastalıkları önlemek veya iyileştirmek için probiyotik ürünlerde sıklıkla diğer laktik asit bakterileri ile kombine edilir (Abou El-Soud *et al.* 2015).

Bifidobacterium bilinmeyen patojenik potansiyele sahiptir. İnvaziv enfeksiyonların insidansı ile ilgili veriler çok sınırlıdır, ancak *Bifidobacterium* türlerinin anaerobik kan kültürü izolatlarının %0,5 ile %3'ünü oluşturduğu düşünülmektedir (Brooks *et al.* 2007). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda erişkinlerde sadece 15 *Bifidobacterium* bakteriyemi vakası tanımlanmıştır (Weber *et al.* 2015). Tespit edilen bu türler çoğunlukla gastrointestinal hastalığı ve bağışıklığı zayıf olan bireylerden alınan örneklerde bulunmuştur. *Bifidobacterium* bakteriyemisi olan hastaların klinik görünümleri, prognostik faktörleri ve sonuçları hakkında çok az veri bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *Bifidobacterium infantsis*'in probiyotik olarak ratların bağırsak mukozasında iyileştirici ve deneysel olarak oluşturulan kolite karşı taklit edici etkisinin varlığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Bifidobacterium* Tanımlanması

Probiyotik olarak *Bifidobacterium*, Gram pozitif, spor oluşturmayan, anaerobik bir bakteridir. İlkel dallanma ile bifid veya düzensiz, V veya Y şeklinde çubuklar olarak görünürler. Gastrointestinal sistem ve ağız boşluğunun normal florasının bir parçasını oluştururlar ve insan klinik örneklerinden yaygın olarak izole edilmezler (Lee and O'Sullivan 2010). *Bifidobacterium* aktivitesi için optimal pH 6,5-7,0'dir. pH 5,5'in altında olduğu durumlarda ciddi şekilde inhibe edilirler (Mahmood Fashandi *et al.* 2018).

Bifidobacterium'un Gastrointestinal (GI) yolu üzerinde mevcut fizyolojik etkileri olduğu düşünülmektedir. Öngörülen en önemli fizyolojik etki, bağırsaklardaki iyileştirme etkisidir. Bağırsak iyileştirme etkisi; bağırsak florasını iyileştirmeyi, bağırsaktaki zararlı maddeleri baskılamayı ve dışkı özelliklerini ve dışkılama durumunu iyileştirmeyi (kabızlık veya ishali ortadan kaldırma) içermektedir (Javed *et al.* 2013, Peran *et al.* 2007).

Bifidobacterium, *Actinobacteria* filumunun üyeleridir. Memelilerin, kuşların ve böceklerin mide-bağırsak yollarında sıklıkla görülen bakterilerdir. (Killer *et al.* 2011, Mattarelli *et al.* 2017). Bu cinsin üyelerinin, bağırsak mikrobiyotasının uygun bir dengesini korumak, patojen enfeksiyonu riskini azaltmak ve bağışıklık sistemini modüle etmek gibi konakçıları üzerinde bir dizi sağlığı geliştirici etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Milani *et al.* 2015). Ayrıca *Bifidobacterium* yavrularına bakan hayvanlarda bol miktarda bulunmaktadır. Bu cinse ait birkaç türün yeni doğanların ilk bağırsak kolonileri arasında olduğu bildirilmiştir (Modesto *et al.* 2019).

2.2 *Bifidobacterium*'un Sınıflandırması

Bifidobakteriler, memelilerin bağırsaklarında bulunan en yaygın mikrobiyal ailelerden biridir (Şekil 2.1). *Bifidobacterium* daha önce *Lactobacillus* cinsinde *Lactobacillus bifidus* olarak sınıflandırıldıktan sonra yeni bir cins olarak kabul edilmektedir. Bu yeni

sınuflandırma ilk defa 1957 yılında Dehnert tarafından yapılan çalışma ile dünya literatürüne bildirilmiştir (Chenoll *et al.* 2011).

Alem:¤	*Bacteria*¤
Şube:¤	*Actinobacteria*¤
Altsınıf:¤	*Actinobacteridae*¤
Takım:¤	*Bifidobacteriales*¤
Aile:¤	*Bifidobacteriaceae*¤
Cins:¤	***Bifidobacterium***¤

Şekil 2.1 *Bifidobacterium* taksonomisi

Bifidobacterium'un şu ana kadar tanımlanmış 87 türü bulunmaktadır. Genellikle bu türler insan bağırsağı, vajinal ve ağız boşlukları, hayvan bağırsağı, böcek bağırsağı gibi 4 farklı ortamdan tespit edilmiştir (Milani *et al.* 2016).

2.3 *Bifidobacterium*'un Tarih Boyunca Bilinirliği

Bifidobacterium, ilk olarak insanlarda konakçı-bakteri ilişkisi ile ilgilenen kişilerin dikkatini çekmiştir. Bunu takiben 1900 yılında Henri Tissier tarafından yeni doğan bebeklerin dışkılarından *Bifidobacterium*'un keşfedilmiştir (Riedel *et al.* 2006). Tissier tarafından yapılan tanımlamada *Bacillus bifidus communis*; gram pozitif, kavisli ve çatallı (yarık, X veya Y şeklinde) çubuk benzeri hücrelere sahip bakteri türü olarak belirtilmiştir. Tissier'in basili, Nobel Ödüllü biyolog Elie Metchnikoff'un canlılık ve uzun ömür teorilerine hızla dahil edilmiştir. Metchnikoff, sağlığa faydaları olduğu iddia edilen fermente süt konusunu bilimsel bir temele oturtan ilk kişidir. Metchnikoff, yoğurt, kefir ve ekşi sütte bulunan laktobasil ve diğer bakterilerin daha uzun yaşamanıza nasıl yardımcı olabileceği hakkında konuşmalar yapmış ve makaleler yazmıştır. Çalışmaları ve görüşleri, ekşi süt ürünlerine olan ilgide 20 yıllık bir artışa yol açmıştır. Metchnikoff, bağırsak mikrobiyotasının sadece enterik patojen enfeksiyonunun sonucunu kontrol

etmekle kalmayıp aynı zamanda yaşlanma ve ölümle bağlantılı doğal kronik toksemiyi de yönettiği hipotezini keşfetmiş ve popüler hale getirmiştir (Metchnikoff 2004).

2.4 Probiyotik Olarak *Bifidobacterium*

Probiyotikler, "yeterli oranlarda sağlandığında konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır. Çok çeşitli gastrointestinal sorunları önleme veya iyileştirme potansiyelleri nedeniyle hem hayvan hem de insan araştırmalarında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Sharma *et al.* 2021).

Probiyotikler; kolon tahrişi, kabızlık ve gezgin ishali gibi semptomları azaltma veya ortadan kaldırma yeteneği de dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir. Diğer sağlık yararları arasında patojenik bakteri baskılanması, B vitamini sentezi, kan amonyak azaltımı, kolesterol emilimi, tümör inhibisyonu, kalsiyum absorpsiyonunun iyileştirilmesi ve b-galaktosidaz üreterek laktoz kullanımının düzenlenmesi yer almaktadır (Thushara *et al.* 2016).

Bifidobacterium'un gastrointestinal sistem üzerinde fizyolojik etkileri olduğu düşünülmektedir. Bağırsak koşullandırma eylemi, önerilen en önemli fizyolojik sonuçtur. Bağırsak koşullandırma eylemi, bağırsak florasının iyileştirilmesi, bağırsağa zarar verici kimyasalların inhibisyonu ve iyileştirilmiş dışkı özellikleri ve dışkılama durumu (kabızlık veya ishalin giderilmesi) dahil olmak üzere bağırsak ortamının düzenlenmesi anlamına gelir. *Bifidobacterium* ayrıca güçlü bir bakteri yok edici etkiye sahip olan ve tehlikeli bakterilerin kolonda üremesini veya kolonize olmasını önleyen asetik asit oluşturur. Bağışıklık sistemi düzenlemesi, *Bifidobacterium*'un bir başka önemli etkisidir (Amund 2016).

Bifidobacterium, kolondaki karbonhidratların fermantasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca ksilooligosakkaritler ve diğer karbon kaynaklarını fermente ederek heksoz karbonhidratlarını "bifid şant" olarak bilinen metabolik bir mekanizma yoluyla parçalamaktadır. Fermente süt, taze süt, yoğurt, dondurulmuş ikramlar ve peynir dahil

olmak üzere çok çeşitli ürünler birçok Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika ülkesinde üretilmektedir. Sağlık üzerinde iyi bir etkiye sahip olmak için, fermente gıdalar 106 cfu/g'dan fazla *Bifidobacterium* içermelidir. Fermente edilmiş ürünlerin çoğunda, *Bifidobacterium'*un süt ürünlerinde, soğutulmuş sıcaklıklarda uzun bir raf ömrü boyunca yaşayabilirliği bir sorun olmaya devam etmektedir (Kok and Hutkins 2018).

2.5 *Bifidobacterium*'un Anti-İnflamatuar Rolü

Mikroorganizmalar ilk olarak belirli hastalıkları tedavi etmek veya önlemek için kullanılmıştır. Bu kavram hızla uygulamalı mikrobiyolojinin yeni bir disiplini olan "terapötik mikrobiyoloji"nin ilerlemesine neden olmuştur (Bozzi Cionci *et al.* 2018). İnsan bağırsak mikrobiyotası, yalnızca bakterileri değil aynı zamanda mantarları, arkeleri, virüsleri ve protozoanları da içeren karmaşık bir ekosistemdir. Bakteri konsantrasyonu mide ve oniki parmak bağırsağından sindirim sistemi boyunca yayılım göstermektedir (O'Hara and Shanahan 2006).

Bifidobacterium, hayvanlarda ve insanlarda sağlıklı bir gastrointestinal sistemin önemli bir bileşenidir. Bazı bifidobakteri türleri, memeli ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri ve ishali önlemeleri nedeniyle yaygın olarak probiyotik olarak kullanılmaktadır (Tanabe *et al.* 2014).

Kronik bağırsak iltihabında probiyotik müdahale önemli yöntemlerden biridir. İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD'li) olan bireylerde, bifidobakteri içeren probiyotiklerin inflamatuar şiddeti azalttığı görülmüştür (Riedel *et al.* 2006). İnflamatuar bağırsak hastalığı; Crohn hastalığını (CD) ve Ülseratif koliti (UC) kapsar. Kronik mide rahatsızlığı, şişkinlik, ishal, dışkıda kan ve gastrointestinal sistem (GIT) iltihabı, IBD'nin yaygın semptomlarıdır ve hastalığın yeri, aktivitesi ve davranışına bağlı olarak kişiden kişiye değişebilir (Singh *et al.* 2020). Bakteriler ve lipopolisakkarit (LPS) gibi bileşenler bağırsak duvarından sızar ve parçalanan bağırsak duvarları yoluyla periferik organlara yerleşir. Kandaki daha yüksek LPS seviyelerinin tümü IBD'ye katkıda bulunabilecek olan artan inflamasyon, mukus tükenmesi ve bağırsak geçirgenliği ile bağlantılıdır (Singh *et al.* 2020).

Bağırsak mikrobiyotasının konakçı ile simbiyotik karşılıklı ilişkisi; bağırsak epitel bariyerinin korunması, bağırsak yüzeylerine patojen yapışmasının inhibisyonu, bağışıklık sisteminin modülasyonu ve uygun olgunlaşması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve bitki polisakkaritleri gibi sindirilemeyen karbon kaynaklarının bozunması, vitaminler ve kısa zincirli yağ asitleri gibi çeşitli metabolitlerin üretimi, gibi bir dizi faydalı etkiye sahiptir.

Bağırsak kolonizasyonu doğumda oluşur fakat yapılan son çalışmalar mikropların intrauterin fetüse bulaşabileceğini göstermiştir (Francino 2014). Doğuştan gelen *Staphylococcus* SPP., *Enterobacteriaceae* ve *Streptococcus* SPP. anaerobları önce kolonize olur, ardından *Bifidobacterium, Bacteroides* ve *Clostridium* cinslerinin kolonize olması ile döngü tamamlanır (Solís *et al.* 2010, Sharon *et al.* 2013).

İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD) hastalarında azalan bağırsak mikrobiyota çeşitliliği, çoğunlukla *Bifidobacterium* cinsine ait probiyotiklerin miktarındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. IBD, mukozal immünolojik tolerans eksikliği nedeniyle bağırsak florasına karşı mukozal ve sistemik inflamatuar yanıtlarla karakterize edilir (Alard *et al.* 2018).

İnflamatuar bağırsak hastalığı IBD'nin, enterik bağışıklık sisteminin düzensizliği ve bağırsak florasındaki değişiklikler dahil olmak üzere, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Li *et al.* 2019). IBD'li hastalarda, genel popülasyona kıyasla proinflamatuar bakterilerde artış, antiinflamatuar bakterilerde ve bakteri çeşitliliğinde azalma gibi tipik disbiyoz vardır (Derwa *et al.* 2017).

Bifidobacterium cinsine ait probiyotiklerin sayısının azalması, IBD hastalarında azalmış bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinin nedenidir. Mukozal immün tolerans eksikliği nedeniyle, IBD, bağırsak florasına karşı mukozal ve sistemik inflamatuar reaksiyonlarla karakterizedir (Alard *et al.* 2018).

2.6 Bağırsakta Probiyotiklerin Büyümesini Etkileyen Faktörler

Probiyotikler için en önemli seçim faktörlerinden biri rekabetçi patojenlerin olmamasıdır. Enfeksiyonlar, probiyotikler tarafından gastrointestinal (GI) yüzeydeki belirli reseptörlerle rekabet edilir veya bunlara yapışmaları engellenir. Aynı zamanda probiyotikler yenidoğanlarda bağırsak mikrobiyotasının oluşumunu da etkileyebilirler.

Mikrobiyota büyümesinin ve rekabetçi dışlamanın sonucu, bakteri ve reseptörler için bakteriyel adezinlerin özgüllüğü ve ayrıca rekabet eden bakterilerin nispi miktarı ile belirlenmektedir. Bir probiyotiğin etkili dozu, reseptör bölgelerine olan nispi afinitesi ile belirlenir. Bağırsak mikrobiyotasının sağlık için hayati olduğunu göstermek, bağırsak mikrobiyotasını probiyotiklerle değiştirmenin temelidir (Sánchez *et al.* 2017). Bağırsak ve sistemik bağışıklık tepkileri, belirli probiyotik mikroorganizmalar tarafından modüle edilir. Probiyotiğin bağırsak yüzeyindeki immünolojik hücreler ve dokularla yakın teması, immünolojik hücre ve dokuların aktivasyonu için gereklidir. *Bifidobacterium* sırasıyla ince ve kalın bağırsakları kolonize eder her ikisi de probiyotik takviyeleri olarak verildiğinde alerjik inflamasyonla ilgili immünolojik reaksiyonları değiştirebilir. Probiyotiklerin spesifik antijen işleyen hücrelere (makrofajlar, dendritik ve epitelyal hücreler) tercihli bağlanması, yapışma konumundan daha önemli olabilir. Ayrıca çeşitli *Bifidobacterium* suşlarının çeşitli sitokin stimülasyon modellerine sahip olduğu (Weiss *et al.* 2011) ve sağlıklı yenidoğanlardan izole edilen suşların çoğunlukla inflamatuar olmayan sitokinleri artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu, bazı probiyotiklerin insanlarda anti-inflamatuar özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, özellikle *Bifidobacterium* mikrobiyomunun değişmesi bu tür etkilere aracılık edebilir (Salminen *et al.* 2005).

Son yıllarda yapılan artan sayıdaki klinik ve deneysel kanıt, bağırsak lümenindeki bileşenlerin, özellikle yerleşik mikrobiyotanın, bu koşullarda inflamatuar yanıtları indüklemede bir rolü olduğunu göstermektedir. Probiyotik bakteriler, bağırsak mikrobiyal topluluğunu ve bağırsağın geçirgenlik bariyerini koruyarak ve enteral antijenlerin parçalanmasını teşvik ederek, immünojenisiteleri değiştirerek iltihabı azaltmaya yardımcı olabilir. Bağırsak stabilize edici etkinin bir başka nedeni, bağırsağın

immünolojik bariyerinde, özellikle bağırsak IgA tepkilerinde bir gelişme olabilir. Pro- ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin kontrol edilmesi de probiyotiklerin sağlamış oldukları yararlar üzerinde rol oynayabilir (Shadnoush *et al.* 2013).

2.7 *Bifidobacterium infantis* Kolonizasyonu

Kolonizasyon, gastrointestinal sistemdeki sabit bir büyüklüğe sahip olan ve mikropların oral dozlar veya başka yollarla düzenli olarak yeniden verilmesini gerektirmeyen bir bakteri popülasyonunu ifade eder. Bu, kolonize eden bakterilerin, belirli bir bağırsak habitatından arınma veya eliminasyon hızlarına eşit veya daha yüksek bir oranda çoğaldığı anlamına gelir.

Bifidobakterilerin bağırsak epiteline bağlanma ve onunla etkileşime girme kapasitesi, bağırsak kolonizasyonu ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir. Yenidoğan bağırsağında bulunan bifidobakteriyel flora, doğumdan sonraki günlerde oluşur ve çocukluk döneminde makrofloral bileşimin %80'inden fazlasını oluşturur (Turroni *et al.* 2014). Doğumda ve sütten kesmede oluşan bağırsak florası, yaş, diyet, mevsimsel ve coğrafi varyasyonların yanı sıra probiyotik kullanımı ve diğer endojen ve eksojen faktörlerin bir sonucu olarak zaman içinde değişir (Balamurugan *et al.* 2008, Lagier *et al.* 2012).

Yapılan çalışmalar, bebeklerde antibiyotik kullanımının sadece normal bir bifidobakteriyel bağırsak florasının oluşmasını geciktirmekten ziyade *Klebsiella, Enterobacteria, Citrobacter, Pseudomonas* gibi patojenik bakterilerin kolonizasyon riskini arttırdığını ortya koymuştur. Çocukluk döneminde bifidobakteriyel kolonizasyonun gecikmesi veya bozulması, çocukluk hastalıklarının insidansını arttırır ve konağın sağlığı için uzun vadeli sonuçları olabilir (Galley and Bailey 2014).

Bifidobacterium, sağlıklı bebek bağırsağında bulunan en yaygın türlerinden biridir (Satokari *et al.* 2002, Satoh *et al.* 2016). Bu cinsin insan gastrointestinal kanalındaki zenginliği, sütten kesildikten sonra önemli ölçüde azalmakta ve yaşla birlikte azalmaya

devam etmektedir (Yatsunenko *et al.* 2012, Kato *et al.* 2017). Yetişkinlik döneminde seviyeler önemli ölçüde azalsa da yaşlılıkla beraber oranlarda tekrar azalma görülür (Satoh *et al.* 2016). *Bifidobacterium* tarafından kolonizasyonun insan sağlığının korunmasında çok önemli roller oynadığına inanılmaktadır. Bağışıklık, sindirim ve metabolik sistemlerin olgunlaşmasında yer alan ve sonuç olarak yaşamın sonraki dönemlerinde çeşitli hastalıklara karşı duyarlılığa karşı koruma sağlayan bir dizi yararlı sağlık etkisi ile ilişkilidir. İlk bifidobakteriyel kolonizasyon doğumdan itibaren meydana gelir ve çeşitli dış faktörlerden etkilenir (Arboleya *et al.* 2016). Bifidobakteri türlerinin anneden dikey olarak bulaştığı ve yaşamın çok erken dönemlerinde bebeğin bağırsağını kolonize ettiği ortaya çıkmıştır (Makino *et al.* 2013). *Bifidobacterium*'un annenin vajinal yolundan, mide-bağırsak yolundan, anne sütünden, plasentadan ve amniyotik sıvıdan bebeğe geçişi ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Makino *et al.* 2013, Milani *et al.* 2015, Collado *et al.* 2016, Ferretti *et al.* 2018, De Goffau *et al.* 2014).

Özellikle doğum şeklinin önemli olduğu yapılan çalışmalarla otaya çıkmıştır. Sezaryen ile doğanlara kıyasla normal olarak doğan bebeklerde bifidobakteri sayısının artması arasında doğrusal orantı bulunmaktadır (Rutayisire *et al.* 2016, Reyman *et al.* 2019). Daha spesifik olarak, annelerin ve sahip oldukları çocukların bağırsak mikrobiyotasının analizine dayanan bir çalışmada, normal yolla doğan bebeklerin anneleriyle *Bifidobacterium* cinsine ait en az bir monofiletik suşu paylaştığını, buna karşın sezaryen ile doğum yapan bebeklerde monofiletik suşların gözlemlenmediği belirtilmiştir. Bu durum dikey iletimin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Makino *et al.* 2013). Ayrıca, yapılan son karşılaştırmalı genom analizlerinde, vajinal ve bağırsak mikrobiyomlarından izole edilen bifidobakteri suşları ayırt edilememiştir. Bu sebeple anne vajinal mikrobiyomunun bifidobakteriyel kolonizasyon kaynağı olması gittikçe önem kazanan bir konu olmuştur (Freitas and Hill 2018). Bu bilgiler doğrultusunda anne doğum kanalı, doğum süreci sırasında bifidobakteri de dahil olmak üzere temel bir bakteri kaynağı olarak gösterilmiştir. Bağırsak ortamının kolonizasyonunun geleneksel olarak doğumda başladığı düşünülse de rahim ortamında bakteri varlığına dair yeni kanıtlar bulunmaktadır (De Goffau *et al.* 2014). Son zamanlarda yapılan araştırmalar ayrıca birçok fetüsün, utero gestasyonun ortasından sonlarına kadar sürekli olarak yutulan amniyotik sıvı yoluyla mikroplara maruz kaldığını göstermektedir (Chu *et al.* 2017).

Bununla birlikte, 'in utero kolonizasyon hipotezi' hakkında tartışmalar devam etmektedir. Metodolojik zorluklar nedeniyle, mevcut bilimsel kanıtların sağlıklı fetal ortamında mikrobiyomun varlığını desteklemediği iddia edilmektedir (Perez-Muñoz *et al.* 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar insan plasentasında bakteri varlığına dair hiçbir kanıt bulunmadığını göstermektedir (De Goffau *et al.* 2014). Bu nedenle, bilimsel olarak doğru sonuçlara ulaşılamamaktadır ve bu alanda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca normal doğum sırasında bebekler doğum kanalından geçerken ağız ve burun boşluklarına vajinal salgılar infiltre olmaktadır (Torres-Alipi *et al.* 1990, Li *et al.* 2019). Bu nedenle doğumda yenidoğan oral sıvısı *Bifidobacterium* için anneden çocuğa bulaşma yolu gibi görünmektedir. *Bifidobacterium'*un doğum gerçekleşirken yenidoğan ağız sıvısında bulunduğu ve doğumdan bir ay sonra alınan hem ağız sıvısın hem de dışkı örneklerinde aynı suşların saptandığı tespit edilmiştir. Bu durum da doğumda yenidoğan ağız sıvısının her ikisinden de temel bir bakteri kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Anne ve çevresel ekosistemler, yenidoğanların sindirim yollarına bakterilerin erken verilmesine katkıda bulunabilir (Toda *et al.* 2019). Ayrıca, yapılan çalışmalar anne sütünün bir mikrobiyal topluluğu barındırdığını ve yenidoğanlar için ortak bir bakteri kaynağı temsil ettiğini göstermektedir. (Gueimonde *et al.* 2007, Jost *et al.* 2014, Ruiz *et al.* 2019). Anne sütünde bifidobakteriyel suşların bulunduğu bildirilmiş ve bu da *Bifidobacterium'*un anne sütünden, anneden bebeğin bağırsağına bulaşma yolu olabileceğini göstermiştir (Jost *et al.* 2014, Makino *et al.* 2013, Kordy *et al.* 2020). Bu bağlamda, besleme modu, bebek bağırsağındaki bifidobakterilerin kolonizasyon seviyesini ve tür kompozisyonunu etkileyebilecek ana güçlerden bazıları olarak kabul edilir. Emzirmenin bebeğe, diğerlerinin yanı sıra *Bifidobacterium*'un bebek bağırsağı kolonizasyonuna yardımcı olan insan milkoligo sakkaritleri (HMO'lar) dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif faktörlerin geniş bir yelpazesini sağladığı bilinmektedir (Le Doare *et al.* 2018). Sadece anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsak mikrobiyomuyla mama ile beslenen bebeklerin karşılaştırmasını içeren birçok çalışmada, anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsaklarının *Bifidobacterium* SPP. ile zengin olduğu bulunmuştur (Wang *et al.* 2019, Lewis and Mills 2017). Yapılan bu çalışmalar *Bifidobacterium'*un insan bağırsağını nerede ve nasıl kolonize ettiğine dair ipuçları sağlamaktadır. *Bifidobacterium*'un erken yaşam kolonizasyon paternlerinin ve ardışıklıklarının, yenidoğan aşamasında veya yaşamın ilerleyen dönemlerinde sağlık komplikasyonları

geliştirme riskine katkıda bulunabileceği, insan bağırsağında uygun *Bifidobacterium* seviyelerinin korunmasının önemini vurgulamaktadır (Arboleya *et al.* 2016).

2.8 Kolonizasyonda Etkili Faktörler ve Hastalıklar

Bifidobacterium, insan gastrointestinal sistemini kolonize eden ilk bakteriler arasındadır ve konakçılarına fayda sağladığına inanılmaktadır (O'Callaghan and Van Sinderen 2016, Plaza-Díaz *et al.* 2017). Bu bakteriler, bağışıklık sisteminin modülasyonu (O'Hara and Shanahan 2007), rekabetçi dışlama yoluyla konağın patojenlere karşı korunması (Bernet *et al.* 1994, Hooper *et al.* 1999) ve sindirilemeyen diyet karbonhidratlarının bozunması yoluyla (Roberfroid *et al.* 1995, Leahy *et al.* 2005) sağlığı geliştirici veya probiyotik gibi iyileştirici etkiler sergilemektedir. *Bifidobacterium'*un sadece GI yolunda hayatta kalması değil, aynı zamanda GI yolunda kolonize olması gerekir. Etkili bir probiyotik, GI yolundaki tercih edilen hedef bölgelerde, probiyotik etkiler sağlamak için gerekli süre ve konsantrasyonlarda bulunmalıdır. Dünyada artan pazar payına rağmen Probiyotikler gibi sağlığı teşvik eden bakterilerin bağırsak mukoza yüzeyine bağlanmasına yardımcı olan veya bunları artıran hiçbir ticari ürün bulunmamaktadır.

Bifidobacterium, yeterli etkiyi gösterebilmek için gastrointestinal geçişte ve bağırsakta belirli bir süre boyunca hayatta kalabilmelidir. Bu nedenle, hayatta kalma ve kolonizasyon süreçlerinin yanı sıra bu mikroorganizmaların insan gastrointestinal sisteminde (GIT) canlı ve metabolik olarak aktif kalmasına izin veren metabolik avantajların araştırılması, fonksiyonel aktivitelerini anlamak için çok önemlidir. Bu bağlamda, *Bifidobacterium*'un konakçı ile etkileşimlerinin altında yatan mekanizmaların karakterizasyonu, bu cins için uyarlanmış moleküler araçların eksikliği nedeniyle uzun yıllardır çözülememiştir. Bununla birlikte, ekspresyon vektörlerinin ve mutant-jenerasyon sistemlerinin son gelişimi ve ayrıca fonksiyonel genomik ve diğer omik teknolojilerindeki ilerlemeler ve in vitro-in vivo modeller kullanarak *Bifidobacterium*'un işlevselliğinin incelenmesine olanak tanımıştır. Bu şekilde, fizyo-kimyasal gastrointestinal koşullara verilen stres tepkileri aydınlatılmış ve bağırsak epitelinin yapışması ve kolonizasyonunda yer alan spesifik moleküllerin rolü ortaya konmuştur. Ayrıca, üst GIT'de sindirilmeyen diyet karbonhidratlarının asimilasyonu için ana

metabolik yollar çözülmüştür. Bu çalışmalar, *Bifidobacterium'*un insan bağırsağındaki belirli çevresel koşullara uyum sağlamak için kullandığı çok çeşitli stratejileri ortaya çıkarmıştır.

Gastrointestinal sistemi etkileyen stres faktörleri

Ağızdan alınan probiyotikler, mide-bağırsak yolundan geçerken bir dizi zararlı çevresel koşullara maruz kalırlar. Bu yararlı bakterilerin yaşamları, bu koşulların bir sonucu olarak tehlikeye girer ve canlılıklarını ve kullanışlılıklarını tehlikeye atar. Sindirim enzimleri, asidik bir mide pH'sı, defensinler ve bağırsaktaki yüksek safra tuzu konsantrasyonları bunlardan sadece birkaçıdır.

1. **Düşük pH'nın bifidobakteri fizyolojisine etkileri**

Bifidobacterium'un midede üstesinden gelmesi gereken ilk zorluklardan biri, mide suyu bileşiminin yarattığı güçlü asidik koşullardır. *Bifidobacterium infantis* hariç, *Bifidobacterium*'un aside toleransı zayıftır. Sonuç olarak, probiyotik kullanımı, çeşitli teknik ve gastrointestinal stres faktörlerine karşı tipik olarak çapraz direnç gösteren aside toleranslı suşların seçimini gerektirmektedir (Sanchez *et al.* 2008).

2. **Safra adaptasyonu ve yanıt mekanizmaları**

Bifidobacterium'un kolonda üstesinden gelmesi gereken fizyolojik engellerden biri safranın varlığıdır. Safra asitleri bu biyolojik sıvının ana bileşenleridir ve deterjana benzer antibakteriyel özellikler sergiler. Bu asitlerin sitoplazmik birikimi hücrenin dengesini bozarak iyon sızıntısına neden olur. *Bifidobacterium* türleri, *Bifidobacterium'*da bu bağırsak durumuna direnç açısından farklılık gösterir, ancak safra kalıcı direnç fenotiplerine yol açabilir. Bu sürecin ortak özellikleri; stres faktörlerine çapraz direnç, antibiyotik direnç modellerindeki değişiklikler, karbonhidrat metabolizması, hücresel yüzey mimarisi ve bileşimi ve bunların bağırsak ekolojisi ile etkileşimidir (Sanchez *et al.* 2008).

In vitro çalışmalarda, hücre zarının safranın ana hedeflerinden biri olduğunu ve yüzey yapılarının *Bifidobacterium* toleransında ve yanıtında kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Safra varlığında membranların lipid ve protein içeriği ile hücre duvarı fonksiyonları önemli değişikliklere uğrar (Ruiz *et al.* 2009). Yağ asidi üretiminde yer alan enzimlerin konsantrasyonundaki varyasyonların, bifidobakterilerin yağ asidi içeriğindeki değişikliklere karşılık geldiği de rapor edilmiştir (Sanchez *et al.* 2008). Bunun dışında, ekzopolisakkarit (EPS) sentezi, çeşitli suşlarda safra toleransı ile ilişkilendirilmiştir (Ruas-Madiedo *et al.* 2009, Fanning *et al.* 2012).

3. *Bifidobacterium* kolonizasyonunu etkileyen enzimler ve antimikrobiyal peptitler

Bifidobacterium'un GIT'de hayatta kalmasını ve aktivitesini etkileyebilecek diğer bağırsak özellikleri, pepsin ve pankreatin gibi sindirim enzimleridir. In vitro, *Bifidobacterium'*un hayatta kalması, insan mide ve pankreas suşlarında ve ayrıca hem pepsin hem de pankreatin içeren yapay suşlarda aynı özellikleri göstermiştir. Mide salgılarında yaşayamamalarına rağmen, çoğu bifidobakteriyel suş, pankreatin ve pepsin içeren solüsyonlara dayanma konusunda doğal bir yeteneğe sahiptir (Masco *et al.* 2007). Öte yandan, sindirim enzimlerinin *Bifidobacterium* özellikleri üzerindeki etkileri belirsizdir. Örneğin, in vitro pepsin tedavisinin, spesifik *Bifidobacterium* yapışma faktörlerinin proteinli doğası ile ilgili olabilecek bağırsak hücre hatlarına yapışmayı etkilediğini ortaya koymuştur (Guglielmetti *et al.* 2008, Wang *et al.* 2010).

2.9 Kolit

İmmünolojik, genetik ve çevresel değişkenlerin tümü, hastalığın remisyon ve aktivasyonu açısından küresel olarak daha yaygın hale gelen gastrointestinal sistemin inflamatuar bir durumunun gelişmesinde rol oynar.

Asetik asit kaynaklı kolit, IBD'yi araştırmak için kullanılan çok sayıda deneysel kolit modelinden biridir. Yapılan çalışmalarda, AA enjekte edilen sıçanların rektum ve

kolonunda iltihaplanma ve ülserasyona gözlemlenmiştir. Bu durumda oluşan patojenetik unsurun, kolonun morfolojisinde görülen oksidatif bozulma olduğu düşünülmektedir (Pereira *et al.* 2015). Benzer bir sonucun insan kolitinde meydana geldiği de belirtilmiştir. Oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki bir dengesizlik, asetik asit kullanan hayvanlarda deneysel olarak üretilen kolitin ayırt edici bir özelliğidir.

Kolit kaynaklı kolonik mukozada ani bir inflamatuar yanıtla oluşan hasar klinik olarak değerlendirilir. HCI (pH 2,3) ve sodyum asetat (pH 7,0) inflamatuar yanıtı indüklemede başarılı olmadığından, kolit oluşturmak için asidin protonlanmış formunun gerekli olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, sitotoksik olmayan asetik asit miktarlarının diğer patofizyolojik süreçleri (sıvı ve elektrolit salgılanması gibi) uyarabileceğine dair bazı kanıtlar vardır.

Kolit'in klinik değerlendirmesi

Deney boyunca hayvanlar, vücut ağırlığının ölçülmesi, ishal ve kan için dışkı muayenesi ve görünüm dahil olmak üzere bağırsak iltihabı belirtileri açısından klinik olarak incelenerek hastalık aktivite indeksi (Okayasu *et al.* 1990)'a göre belirlenmiştir.

3 MATERYAL VE YÖNTEM

Dişi ratlarda, deneysel kolit için bir model olarak, asetik asidin intrarektal infüzyonuna neden olan inflamatuar reaksiyonların iyileştirilmesinde *B. infantis*'in koruyucu rolünü araştırılılmıştır.

3.1 Çalışmanın Dizaynı

3.1.1 Bakteriyel suş

Bu tez çalışmasında Bağdat Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yem Bilimleri Bölümünden dondurulup-kurutulmuş olarak temin edilen *Bifidobacterium infantis* suşu kullanılmıştır.

3.1.2 Bakteriyel suşun aktivasyonu

Bifidobacterium'un sürekli büyümesi için, selektif olarak önerilen De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) ortamı (CM0361-OXID) katı veya stok olan sıvı bir kültür ortamı kullanılmaktadır. Üretici firma talimatına göre OXOID- UK. hazırlanmıştır. Buna göre; 52 gr kuru besiyeri 1 L distile suda (protech-RCT-3200) çözülerek her biri 20 mL sıvı içeren vidalı tüplere bölünmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra tüpler 45°C'ye kadar soğutulur. Vidalı tüp içinde kültürlenmiş 1 mg referans suşu 48 saat boyunca inkübatöre (Nuve-EN-120-Türkiye) alınmış ve bu stok olarak kabul edilmiştir.

3.1.3 Ratlara uygulanacak dozun belirlenmesi

Bakterilerin uygun dozu (mL'deki koloni sayısı olarak) belirlemek için aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

1. Farklı seyreltilerin hazırlanması

Seçici olmayan et suyu ortamı bakteri büyümesi için birincil zenginleştirme ortamı olarak kullanılmış ve stok çözelti olarak kabul edilmiştir. 0,001 pepton su konsantrasyonunda hazırlanan 1000 mL peptonlu su her biri 100 mL'lik 10 defa seyreltilmiş şişeye bölünerek otoklavda sterilize edilmiştir. 10 kez seyreltilmiş 1 mL kültür stok bakteri tekrar birinci şişede seyreltilmiş ve daha sonra birinci şişeden 1 mL alınarak ikinci şişeye aktarılır. İkinci şişeden alınan 1 mL stok seyreltilerek üçüncü şişeye aktarılmıştır. Bu işlem 1×10^8 oranında olacak şekilde seyreltilmiş ve *Bifidobacterium infantis* konsantrasyonuna ulaşana kadar yapılmıştır.

2. CFU sayımı için kültür

MRS Agar, *Bifidobacterium* için seçici katı besiyeridir. 52 g agar 1000 mL distile suda çözülerek MRS ortamı hazırlanmıştır. Ardından ortam tamamen eriyene kadar kaynatma işlemi yapılır. Elde edilen ortam şişelere, tüplere veya flasklara bölünür ve üretim talimatına (OXOID-UK) göre ile 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. *Bifidobacterium,* 1 mL 10^8 dilüsyonun boş steril petri kabına (Winlab-China) aktarılması ve ardından 15 mL MRS agarın dökülmesiyle kültür edilmiştir. Çalışmamızda üç kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler inkübatörde (Nuve-EN-120- Türkiye) anaerobik olarak 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir (Kipper *et al.* 2020).

3. Koloninin sayılması

Her petri kabında meydana gelen birimi oluşturan bakteri kolonisini saymak için koloni sayacı kullanılmıştır. Koloni sayısının ortalaması alınmış ve seyreltilme katsayısı ile çarpılmıştır. Sonuç 1 mL kültür suyu içindeki koloni form biriminin sayısıdır. Böylece her hayvana uygulanacak 5 x 10^8 CFU/mL dozunda 1 mL *Bifibacterium* kültürlü sıvı dozu belirlenmiştir (Amdekar *et al.* 2012).

3.2 Deneme Dizaynı

Belirlenen 24 dişi rat rastgele ve eşit olarak dört gruba ayrılarak aşağıdaki işlemlere tabii tutulmuştur:

A. Kontrol Grubu: Sadece kontrollü diyet ve su verilmiştir

B. Bifido Grubu (Bio): Dört hafta boyunca günlük oral gavaj CFU (rf) içeren 1 mL *B. infantis* süspansiyonu uygulanmıştır.

C. Bifido-Kolit (mix) Grubu: Dört hafta boyunca CFU (rf) günlük oral gavaj içeren 1 mL *B. infantis* süspansiyonu uygulanarak üçüncü haftada kolit oluşturulmuştur.

D. Kolit Grubu: bu grupta bulunan ratlara asetik asit uygulaması ile kolit indükleme işlemi yapılmıştır.

Deneyin sonunda, anestezi uygulanmış ratlardan kardiyak fonksiyon yoluyla kan örnekleri toplanmıştır. Ayrıca ötenazi uygulanmış ratlardan da duodenal ve kolon doku örnekleri alınmıştır.

3.3 Deney Hayvanları

Deneyler Bağdat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Canlı Hayvan Laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Belirlenen 24 yetişkin dişi deneme rat'ı 200-250g B/W; boyutları 50cm uzunluğunda 35cm eninde 15 cm yüksekliğinde olan plastik kafeslere yerleştirilmiştir. Deney sırasında, tüm hayvanlar yaklaşık 21-25C° sabit sıcaklıkta tutulmuştur. Ayrıca hayvanlara havalandırması iyi olan bir ortam ile pelet yem ve su sağlanmıştır. Yemin besin bileşimi, Kuru madde %88, Nem %10, Ham lif %18, Kalsiyum %1-3, Ham yağ %2,5-3,0, Ham protein %14-16, Vitamin E 30 mg/kg, Vitamin D3 700 IU/kg, Vitamin A 5000 IU/kg, Metabolize Edilebilir Enerji 2400 Kcal/kg olacak şekildedir.

3.4 Kolit İndüksiyonu

Kolit, (Millar *et al.* 1996)'da yaptıkları çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. 24 saatlik açlıktan sonra, ratlara genel anestezi verilmiştir. Enteral beslenme için tıbbi poliüretan kanal (dış çap: 2 mm) ucu anüs kenarına 8 cm proksimale ilerletilecek şekilde yerleştirilmiştir. Kolon içi aşının sızıntısını önlemek için, 2 mL asetik asit (%0,9 tuzlu su içinde %3 v/v) veya tek başına tuzlu su (kontrol hayvanları), 30 saniye boyunca kanül yoluyla kolona infüze edilmiştir.

3.5 Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Deneyin sonunda, anestezi uygulanmış hayvanlardan (sırasıyla I.M ketamin enjeksiyonu; 100 mg/kg VA ve 20 mg/kg VA) kardiyak kan örnekleri alınarak antikoagülan tüplere (sodyum sitrat) nakledilmiştir (ALS Lab-China). Kanın diğer kısmı trombosit indeks sayımı için kullanılacağından antikoagülan tüplere Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) eklenmiştir. Daha sonra kanın diğer kısmı serum izolasyonu için antikoagülansız jel tüpe alınmıştır. Serum veya plazma 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek (MPW-223e-poland) izole edilerek mikropipet (Winlab-China) ile Eppendorf tüpüne (AFME-Almanya) aktarılmıştır. Globulin, Albumen ve Total protein için kullanılana kadar -18°C'de bir dondurucuda muhafaza altına alınmıştır. Ayrıca ötenaziden hemen sonra ince ve kalın bağırsak örnekleri alınarak histopatolojik inceleme için formalin solüsyonunda (%10) (CHEM-LAB-CL00,0610,2500) saklanmıştır.

Toplam serum proteini ve albümin düzeylerini değerlendirmek için ticari bir kit kullanılmıştır (Biomaghreb-tunus). Serum globulin ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır

"Globulin konsantrasyonu=Toplam protein konsantrasyonu–Albümen konsantrasyonu"

3.6 Mikroskobik Histopatoloji, Histomorfoloji ve İmmünohistokimya Ölçümleri için Bağırsak Doku Örnekleri Toplanması

Hayvan diseksiyonundan hemen sonra delik bağırsak mezenterik dokudan ayrılmıştır. Toplanan organlardan taze dokular alınarak %10 formalin içindemuhafaza edilmiştir. Saklanan dokular etanolde dehidre edilerek, ksilende temizlendikten sonra fosfat parafin bloklarına gömülmüştür.

MPO ve BCL2 immünohistokimyası için kullanılan fosfat parafin kesitlerinde kolon ve duodenum örnekleri (3,4 cm) %10 formalin içinde fikse edilmiştir. Dokuların histomorfolojik ölçümü (kriptlerin derinliği villusların kalınlığı ve villusların yüksekliği), her hayvan için farklı kesitlerde 30 kuyucukta bir Winjoe oküler mikrometre kullanılarak düşük güçte H&E lekeli kesitte yapılmıştır. Toplamda 24 x 4 deney grubunda H&E ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskobu (Olympus-Japan) kullanılarak kamera (BX53) ile histopatolojik ve histomorfolojik inceleme yapılarak gerekli veriler elde edilmiştir.

3.7 Yumuşak Doku için Hematoksilen ve Eozin Boyası (H&E)

Hematoksilen ve eozin boyama tekniği, çeşitli doku tiplerini ve bunların morfolojik değişikliklerini tanımlamak için kullanılır. Hematoksilin, nükleik asitleri karmaşık, tam olarak anlaşılmayan bir süreçle boyayan koyu mavi-mor bir boyadır. Eozin, proteinleri eşit şekilde boyayan pembe bir boyadır. Normal bir dokunun çekirdekleri maviye boyanırken, sitoplazma ve hücre dışı matris değişen derecelerde pembeye boyanır. Histolojide en sık kullanılan boya Hematoksilen ve Eozin Boyası (H&E)'dır.

3.7.1 Hematoksilen ve eozin boyama (H&E) prosedürü

- Slaytları deparafinize edilir. Ardından damıtılmış suda rehidrate yapılır.
- Mayer's Hematoxylin'de 1 dakika boyunca boyanır.
- 4-5 defa musluk suyuyla slaytlardan mavi boyanın çıkması durana kadar yıkanır.
- %0,5 alkole 3 defa daldırılarak rengi gitmesi sağlanır.

- 3 defa distile su ile yıkanır daha sonra mavi çekirdekler 1X PBS içinde 1 dakika boyunca tutulur.
- Tekrar 3 defa distile su ile yıkanır.
- 30 saniye boyunca Alkollü-Eozin içinde zıt boyama yapılır (DURULAMAYIN).
- Her biri 1 dakika olmak üzere 3 defa %95 EtOH ve 2 %100 EtOH ile kurutulur.
- Her kurutma işlemi sırasında 1 dakikalık Ksilen eklenerek temizleme işlemi yapılır.
- Daha sonra elde edilen materyal lamel üzerine aktarılır.

3.8 Miyeloperoksidaz (MPO)

Miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümüne dayalı olarak akut bağırsak iltihabını ölçmek için bir tahlil geliştirilmiştir. Miyeloperoksidaz, nötrofillerde olduğu kadar monositlerde ve makrofajlarda çok daha az miktarda bulunan bir enzimdir (Quaresma *et al*. 2020). Miyeloperoksidaz aktivitesi, heksadesiltrimetilamonyum bromür ile çözündürüldükten sonra bir dianisidin-H_20_2 testi kullanılarak değerlendirilir. Nötrofil süspansiyonlarındaki miyeloperoksidaz aktivitesinin, 500 hücreye kadar hücre sayılarıyla orantılı olduğu gösterilmiştir. Miyeloperoksidazın aktivitesi, hayvan inflamasyon modellerinde asetik asit ile indüklenen koliti olan ratlarda ölçülmüştür: Mukozadaki ortalama inflamasyon miktarı, bir MPO ölçümü ile belirlenir.

MPO aktivitesi, bağırsak dokusundaki enflamasyonun derecesini temsil etmek için histolojik skorlama sistemleriyle pozitif korelasyon gösteren, nötrofil infiltrasyonunun hızlı, biyokimyasal bir ölçümüdür. İnce bağırsak dokularındaki miyeloperoksidaz (MPO) enzim immünoassay (EIA) ile ölçülür. MPO miktarları, sırasıyla MPO (Hycult Biotechnology, Uden, Hollanda) için EIA kitleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.9 Bcl-2

Bu antikor, Bcl-2'yi subjektif olarak tanımlamak için immünohistokimyasal saptama yöntemlerini kullanan formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü doku kesitlerinde ışık mikroskopisinde kullanım için tasarlanmıştır.

Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal geçirgenliği kontrol ederek apoptozu düzenler ve sitokrom c salınımını kontrol eder. Bcl-2, sitokrom c salınımını önleyen dış mitokondriyal duvarda bulunan anti-apoptotik bir proteindir. Apoptozu inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını arttırdığı kanıtlanmıştır (Mohammadi *et al*. 2019). Araştırmaya göre, Bcl-2, immünoglobulin ağır zincir genine translokasyonun bir sonucu olarak tümör hücrelerinde regüle edilmez ve bu nedenle B hücre malignitelerinde aktive olur. Foliküler lenfoma, Bcl-2 antikoru (Bcl-2 negatif) kullanılarak reaktif foliküler proliferasyondan ayırt edilebilir. Ayrıca, (Masir *et al.* 2012), bu antikorun foliküler lenfoma tanısında duyarlılığının başka bir Bcl-2 antikorundan daha fazla olduğunu tespit etmiştir (Masir *et al.* 2012).

3.10 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, SAS (İstatistiksel Analiz Sistemi- sürüm 9,1) kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki anlamlı farklılıkları değerlendirmek için tek yönlü ANOVA ve en az anlamlı farklar (LSD) post hoc testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ($P < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma, normal ve patojenik koşullarda *B. infantis* bakterilerinin bağırsak mukozasında probiyotik olarak rolünü araştırmayı amaçlamıştır.

4.1 Ratlarda Kolit Etkisine Karşı *B. infantis*'in Albümen, Globulin ve Toplam Protein Üzerine Etkisi

B. infantis'in ratlarda albümen, globulin ve toplam protein üzerine etkisi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre sonuçlar incelendiğinde, Albümin değeri en az (2,53) asetik kolit grubunda en yüksek Mix grubunda (3,59) tespit edilmiştir. Globülin oranı en az Mix grubunda (2,08) iken en yüksek *B. infantis* ile tedavili Bifido grubunda (3,31) bulunmuştur. En son olarak toplam protein üzerindeki etkilerine bakacak olursak en düşük (5,39) asetik kolit grubunda en yüksek değerler ise Bifido grubundadır.

Çizelge 4.1 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in albumen, globulin ve total protein üzerindeki etkili rolü

Gruplar	**Albümen**	**Globulin**	**Toplam Protein**
Kontrol	$3,33\pm0,10^{a}$	$2,72\pm0,30^{ab}$	$6,05\pm0,21^{b}$
Asetik kolit	$2,53\pm0,10^{b}$	$2,86\pm0,13^{a}$	$5,39\pm0,18^{c}$
Bifido	$3,52\pm0,04^{a}$	$3,31\pm0,27^{a}$	$6,84\pm0,27^{a}$
Mix	$3,59\pm0,11^{a}$	$2,08\pm0,26^{b}$	$5,67\pm0,19^{bc}$
LSD	0,28	0,75	0,65

a, b, c Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.2 Ratlarda Kolitin Etkilerine Karşı *B. infantis*'in Villus Yüksekliği, Villus Kalınlığı ve Kript Derinliği Üzerine Etkisi (Histomorfolojik Ölçüm)

Bu çalışmada duodenumun histomorfolojisi ölçülmüştür (Çizelge 4.2). *B. infantis*'in ($P<0,05$), gruplarda almış olduğu değerler incelendiğinde, villus yüksekliğinde meydana gelen en büyük artış Bifido (379,51) en düşük ise Asetik kolit (222,57) grubundadır. Elde edilen bu sonuç *B. infantis* ile tedavinin bağırsak mukozasında anlamlı büyümeye neden olduğunu ortaya koymuştur. Villus kalınlığı değerlerine baktığımızda, en yüksek değer Bifido grubunda (49,25) en düşük değer ise Asetik kolit (26,27) grubundadır. Kontrol ve

Mix grupları (P<0,05) sırasıyla Asetik kolit grubu ile karşılaştırıldığında her iki grupta da anlamlı artış gözlemlenmiştir. Kript derinliğine ilişkin sonuçlarda en yüksek değer Bifido (150,82) en düşük ise kontrol grubu (87,23)'ndadır. Asetik kolit (126,12) ve Mix (103,77) grupları ile kontrol (87,23) grubu karşılaştırıldığında önemli ölçüde artış tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in villus yüksekliği, villus kalınlığı, kript derinliği üzerine etkili rolü

Gruplar	**Villus Yüksekliği**	**Villus Kalınlığı**	**Kript Derinliği**
Kontrol	250,18±8,02^{c}	35,55±1,56^{b}	87,23±2,22^{d}
Asetik kolit	222,57±4,21^{d}	26,27±1,06^{c}	126,12±3,27^{b}
Bifido	379,51±8,16^{a}	49,25±0,99^{a}	150,82±1,34^{a}
Mix	298,19±2,10^{b}	34,32±1,73^{b}	103,77±2,53^{c}
LSD	18,26	4,06	7,21

a, b, c Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05)

4.2.1 Ratlarda *B. İnfantis*'in kolit bezleri kalınlığı ve derinliği üzerine etkisi

Kolon dokusu kesildikten sonra kolon mukozası esas olarak bezlerden oluşur, bezlerin kalınlığı ve derinliği gruptan gruba değişir, *B. infantis* ile tedavi edilen Bifido grubu (32,17), ile kontrol grubu (31,20) karşılaştırıldığında kolon bezlerinin kalınlığında ve derinliğinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir. (Çizelge 4.3)

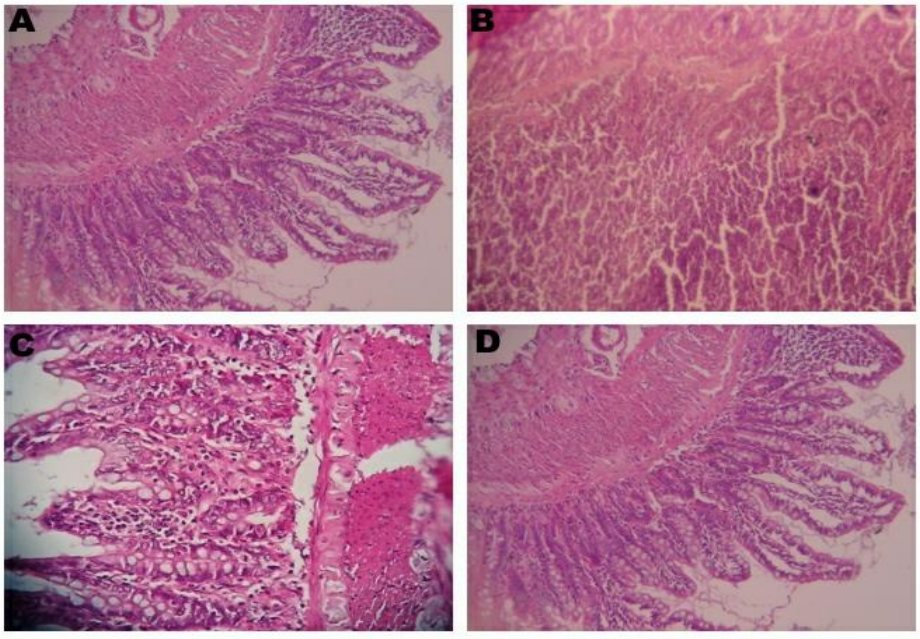
Çizelge 4.3 Ratlarda kolitin etkilerine karşı *B. infantis*'in bez kalınlığı ve bez derinliği üzerine etkili rolü

Gruplar	**Bezlerin kalınlığı**	**Bezlerin derinliği**
Kontrol	31,20±1,44^{a}	123,75±2,91^{a}
Asetik kolit	24,33±2,92^{b}	95,67±3,27^{b}
Bifido	32,17±0,69^{a}	121,40±1,19^{a}
Mix	29,52±1,61^{ab}	117,54±2,29^{a}
LSD	5,47	7,50

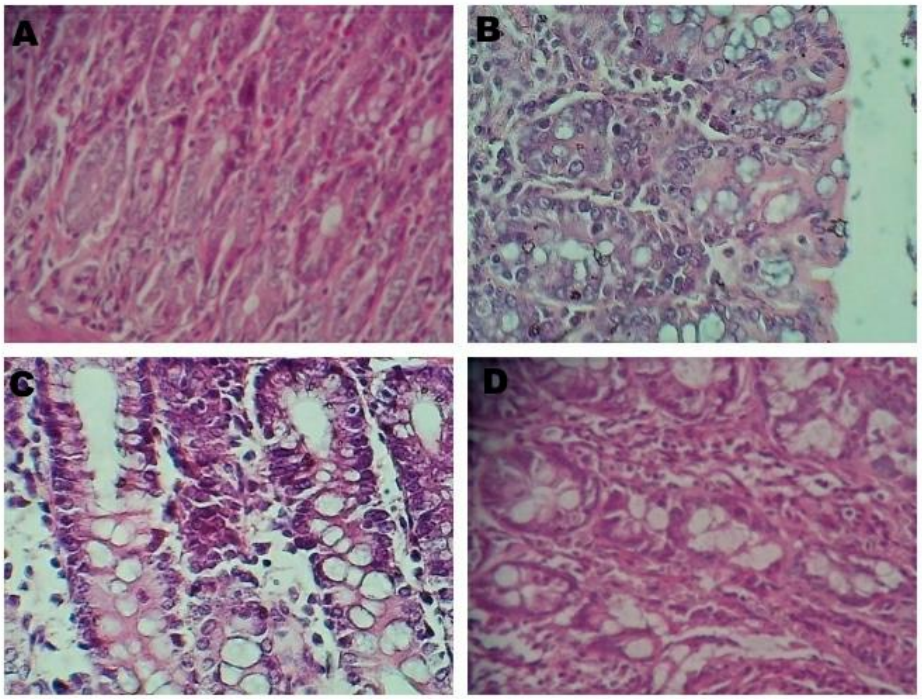
a, b, c Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05)

4.3 Histopatolojik Ölçüm

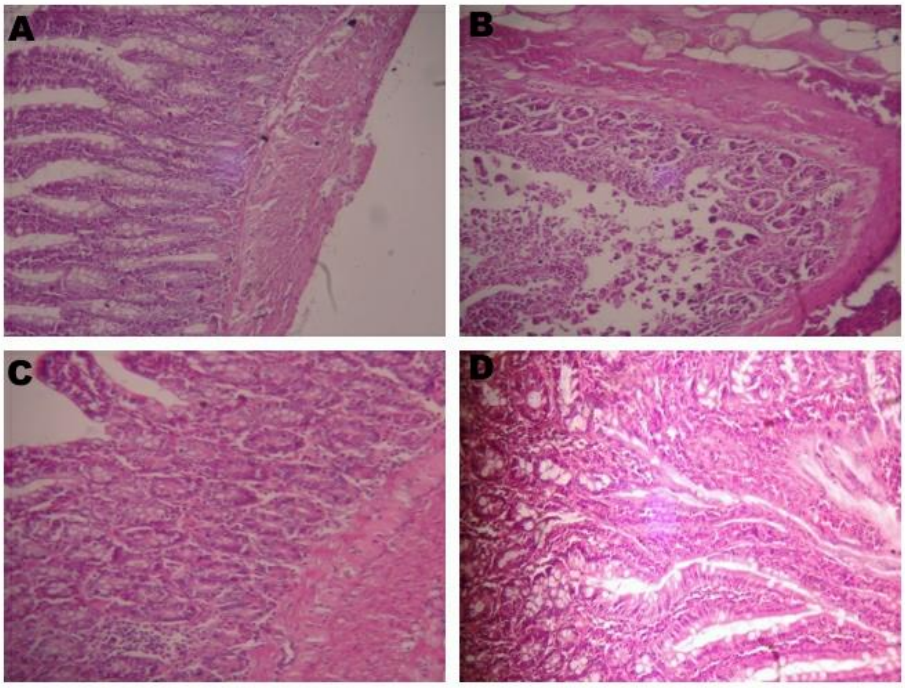
Bu çalışmada kolonların histolojik özellikleri H&E boyama ile incelenmiştir. Kontrol grubundaki rat, şeffaf dış zar, kas tabakası, submukoza ve mukozanın karakteristiği olan entegre normal kolonik yapılara sahiptir (Şekil 4.1). Ayrıca, Asetik asit kaynaklı kolit, dejenere olmuş bezlerin kalıntısı ile esas olarak lenfoid dokudan oluşan submukozal dokuda nekrotik bulgular göstererek kolon bezlerinde ciddi laserasyonlara neden olmuştur (Şekil 4.2). Bunlara ek olarak Bifido ve Mix gruplarında, kolonik mukozanın lamina propriasında orta derecede inflamatuar infiltrat, submukozal bezler arasında hafif mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Mikroskop altında; Kolonik yapının normal morfolojik görünümü Kontrol grubu (A), Dejenere bez kalıntıları ile esas olarak lenfoid dokudan oluşan submukozal dokunun nekrotik bulguları asetik asit kolit grubu (B), *B. İnfantis* grubu Kolon mukozasının lamina propriasında orta derecede inflamatuar infiltrat (C) ve *B. infantum*'un asetik asit koliti (D) Submukozal bezler arasında hafif mononükleer hücre infiltrasyonu görünümü kolon kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri (10X H&E boyası)



Şekil 4.2 Mikroskop altında Kontrol grubu (A), asetik asit grubu Submukozal bezlerde belirgin olmayan patolojik değişiklik, Goblet hücre hiperplazisi ile submukozal bezlerin şiddetli dejeneratif ve nekrotik bulguları (B), *B. infantis* grubu Orta derecede goblet hücre hiperplazisi ve kolon mukozasının hiperplazisi (C) ve Goblet hücreleri hiperplazisi ile hafif submukozal mononükleer hücre infiltrasyonu görünümü. *B. infantum*'da asetik asit koliti (D) bulunan kolon kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri. (40X H&E boyası)



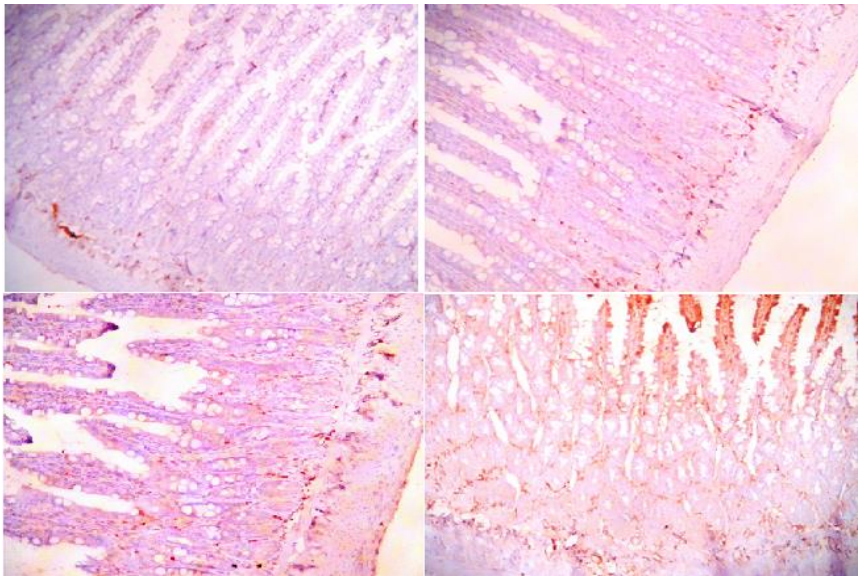
Şekil 4.3 Mikroskop altında Kontrol grubu (A), asetik asit grubu Mukozal ve submukozal dokunun normal görünümü, Nekrotik kalıntı ve orta derecede inflamatuar infiltrasyon ile belirgin bağırsak villus nekrozları (B), B. infantis grubu Propria dokusunun hafif infiltrasyonu ile bağırsak villusunun orta derecede uzaması (C) ve Orta derecede submukozal mononükleer hücre infiltrasyonu ile orta derecede villöz füzyon görünümü *B. infantum*'un bağırsak kesitlerinin histopatolojik değişiklikleri asetik asit koliti (D) (10X H&E boyası)

4.4 İmmünohistokimya

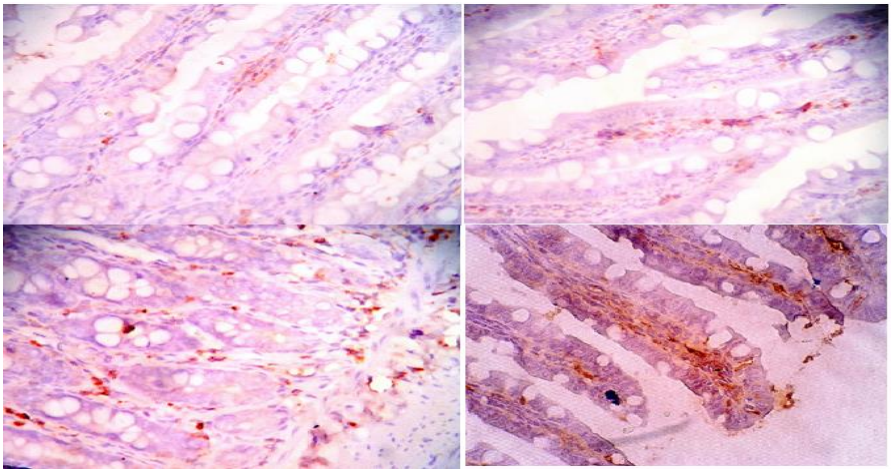
Çalışma, MPO aktivitesinin varlığı için pozitif sonuçları gösteren kahverengi ile tespit edilen spesifik antikor ve MPO reaksiyonu ile ilgili sonuçları göstermektedir (Şekil 4.4). Kolitten muzdarip ve *B. infantis* ile tedavi edilen ratlarda, bağırsak epitelyal ve subepitelyal katmanlarında hem hücre içi hem de hücre dışı MPO için belirgin olarak immün + olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Kolon bölümlerinde kahverengi renk pigmentleri tarafından saptanan Bcl2 antijeni (Şekil 4.6). Kontrol grubunun kolon bölümü, Bcl2 için normal minimum immün + hücrelerinin varlığını belirtmektedir. Asetik asit grubunun kolit kolonu, submukozal bezin daha az Bcl2 immun+ hücresi oluşturduğunu ve daha çok lenfoid dokuya dağıldığını

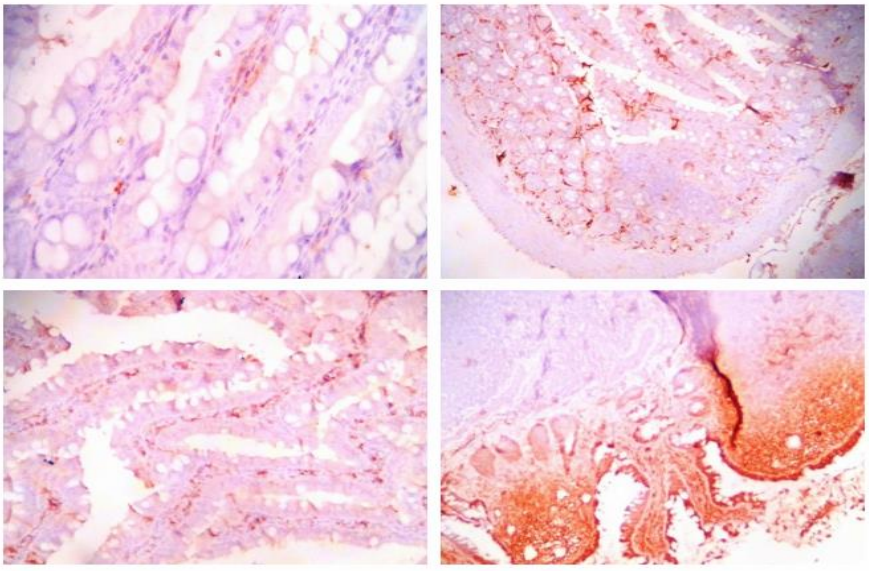
göstermektedir. *B. infantis* uygulanan ratların kolonunda, subepitelyal tabaka bezi lenfoidi ile ilişkili dokuda belirgin olarak immün + ve Bcl2 tespit edişmiştir. Kolitten muzdarip ve *B. infantis* ile tedavi edilen ratlar, submukoza ve mukozal tabakalarda lenfoid olarak işaretlenmiş immün + ve Bcl2'ye sahiptir.



Şekil 4.4 10X'te MPO bağırsak bölümlerinin ışık mikroskobik görünümleri



Şekil 4.5 40X'te MPO bağırsak bölümlerinin ışık mikroskobik görünümleri



Şekil 4.6 Kolon duvar kesitlerinin ışık mikroskobik görünümleri Bcl2 X10

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bifidobacterium, bağırsak mukozal bariyerinin en önemli bileşenlerinden ve vücudun en önemli probiyotiklerinden biridir (Xue *et al.* 2017). Sindirim, emilim, beslenme, metabolizma, anti-enfektif bağışıklıkta ve en önemlisi bağırsak mukozal bariyerinin bütünlüğünü korumada rolü vardır (Wang *et al.* 2019). Bu araştırmada, bakterilerin bazı inflamatuar durumlarda anti-inflamatuar özelliklere sahip olması (Plaza-Díaz *et al.* 2017) ve bağırsakta homeostazı oluşturmaları nedeniyle *Bifidobacterium infantis* seçilmiştir. Bu bağlamda *Bifidobacterium infantis*'in, deneysel olarak indüklenen kolit semptomlarını hafifletip hafifletemeyeceğini görmek için ratlarda probiyotik olarak kullanılmıştır. Bu kullanım sonucunda iltihaplanma ve ishal gibi bağırsak rahatsızlıklarının tedavisinde probiyotiklerin etkili olduğu tespit edilmiştir (Doron and Gorbach 2006).

Asetik asit; rektal yoldan uygulandığında epitel bariyerini bozan, akut klinik semptomlar (ishal ve kanlı dışkı), epitelyal kript kaybı ve inflamasyon ile sonuçlanan fiziksel bir ajandır. Aynı zamanda artan kolon geçirgenliği, mikrobiyota ile IBD'nin başlangıcındaki anahtar faktörlerden biri olan bağışıklık sistemi arasında daha fazla etkileşime yol açar (Zhang *et al.* 2017). Çalışmamızda Asetik asit (AA) ile tedavi edilen ratlar daha düşük ALB seviyeleri gözlemlenmiştir. Ek olarak, AA ile tedavi edilen ratların, vücut ağırlığı artışında ve gıda alımında azalma meydana gelmiştir. Buna bağlı olarak klinik semptomlar ile histolojik değişiklikler arasında ilişki bulunmuştur. İnflamatuar hücre infiltrasyonu ile kolon mukozasının yapısı tamamen değişmiştir. Bu histolojik lezyonlar, emilim gibi normal kolon fonksiyonunu tehlikeye atacak kadar şiddetli olduğunda dışkıda kan kaybına bağlı olarak vücut ağırlığındaki kaybı ve anemiyi açıklamaktadır.

*Bifidobacterium'*un bağırsak iltihabı üzerindeki klinik olarak gözlemlenen önleyici etkilerinden birinin, IL-17 üretiminin inhibisyonu ile açıklanabilmektedir. IL-17 üretiminin en etkili inhibitörü *B. İnfantis*'tir. Elde ettiğimiz bu sonuç diğer bazı çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Tanabe *et al.* 2008).

İntrarektal asetik asit infüzyonunun neden olduğu kolit, bir stres faktörü olarak kabul edilebilir. Şekil 4.1 B ve C'deki deney hayvanlarında kolon kesitindeki mikroskobik

değişiklikler, mevcut klinik belirtilerle kanıtlandığı gibi, kolonun yapısında ve işlevinde bir denge değişikliğine neden olmuştur. Ayrıca, Asetik asidin bağırsak duvarı bütünlüğü üzerindeki doğrudan etkileri ile kolit gruplarında total protein ve albüminin azalmasına katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumludur (Ungaro *et al.* 2012, Wang *et al.* 2019).

Buna göre, kolitli ratlara *B. infantis* verilmesi, bağırsak duvarı bütünlüğünü iyileştirerek, bağırsakta yapısal ve emici iyileşmeler sağlamıştır. Bunun sonucunda da tutarlı olarak ishali önlemiştir. Ayrıca *B. infantis*, bağırsak florasını koruyup karbonhidrat fermentasyonunu sürdürerek ya da patojen büyümesini inhibe ederek olumlu sonuçların ortaya çıkmasını sağlamıştır (Oelschlaeger 2010). Öte yandan probiyotiklerin tavuklarda bağırsak patojenlerine karşı antikor yanıtını ve bazı antijenlere karşı sistemik antikor yanıtını artırdığı tespit edilmiştir (Haghighi *et al.* 2005). Bunlara ek olarak, probiyotiklerin patojenik bakterilere karşı koruyucu bağışıklık aktivitelerinden biri, DC'lerdir. Dendritik hücreler; deri gibi dokularda bulunan özel bir bağışıklık hücresi türü üzerindeki etkileri ile *B. infantis* tarafından lokal IgA üretiminin ve bağışıklık tepkilerini arttırılmasını sağlamaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçlarda kolit gruplarında albümin düşüklüğü, düşük absorpsiyon oranı ve diyare sebebiyle açıklanabileceği gibi, asetik asidin bağırsak duvarı bütünlüğü ve oksidatif stres indüksiyonu üzerindeki doğrudan etkilerinden de kaynaklanmış olabilir (Wang *et al.* 2016). Globulin seviyeleri, immun ve inflamatuar durumlarla yakından bağlantılıdır. Kolitli ratlarda globulin oranı artarken, bifidolu ratlarda azalmaktadır. IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler uyarıldığında kronik inflamasyonda artış meydana gelir. Buna bağlı olarak IBD ratlarında, önemli ölçüde yüksek immünoglobulin seviyeleri tespit edilmiştir (Xu *et al.* 2017). Toplam proteinler bakımından kolit grubunda önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. *B. infantis* tedavisi ile toplam protein oranlarında bir iyileşme tespit edilse de bu oranlar normal seviye olarak kabul edilmemektedir.

B. infantis tarafından hem villus yüksekliği hem de villus kalınlığının kript derinliğine göre oranının artması, bağırsak emiliminin ve sekresyon performansının gelişimindeki

rolüne bağlıdır. Bağırsakların emici yüzey alanındaki artış, villusun sindirim ve emici işlevlerinde ve kript derinliğindeki artış ile ilişkilidir

Duodenumun histomorfolojik ölçümlerinde kolit grubunun aksine, kolon bezlerinin kalınlığında ve derinliğinde bir azalma ve bunun sonucunda vücut ağırlığında düşüş belirlenmiştir. Bu durum kolit ve *Bifidobacterium infantis*'in Mix grubunda bulunan büyüme endekslerindeki en düşük azalmaya katkıda bulunmasından kaynaklanabilir. *B. infantis* ile tedavinin, mukozanın çoğunluğunu oluşturan kolon bezlerinin kalınlığı veya derinliği üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bu arada, kolit sonucu kolon mukozasının kalınlığı ve derinliği önemli ölçüde azalmıştır.

B. infantis beslemesinin kolitin şiddetini azalttığını, damlatma uygulamasının LP'de geniş ölçüde goblet hücrelerinin yok olmasına, epitel hücrelerinin kaybına ve yoğun inflamatuar hücre infiltrasyonlarına yol açtığını ortaya çıkmıştır. Buna rağmen, *B. infantis* ile beslenen kolit ratlarının inflamatuar infiltratları ve goblet hücresinin yok olması önemli ölçüde azalarak bağırsak epiteli onarımıştır.

Ratların kolonlarına asetik asit verilmesini takiben inflamatuar hücrelerin ve ülserlerin kolon mukozasına ve submukozaya infiltre olduğu bulunmuştur. Akut fazda hayvanların kolitlerinin çoğunda AA kaynaklı inflamatuar granülomlar ve ülserler bulunurken kronik fazda, hayvanların çoğunda tespit edilmiştir.

Kolitli hastalarda kolonik epitel hücrelerinin apoptozunun arttığı ve mitokondriyal membranı stabilize ederek apoptozun inhibisyonu, anti-apoptotik protein bcl-2 tarafından sağlandığı ortaya konmuştur (Brenner *et al.* 2000, Wen *et al.* 2015). Buna bağlı olarak çalışmamızda bulunan AA'nın kolon bcl-2 oranını yükselttiği sonucu yapılan çalışmaların bulguları ile uyumludur.

İn vivo ve in vitro incelemelerimiz, *B. infantis* uygulamasının AA kaynaklı inflamasyon, apoptoz ve oksidatif hasarda koruyucu bir rolü olduğunu kanıtlamıştır. *B. infantis* kolitin şiddetini azaltmıştır. Bu durum *B. infantis* tedavisinin SS tedavisi kadar etkili olduğunu

göstermektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlara göre, *B. infantis*'in AA kaynaklı kolitte koruyucu rol oynamaktadır.

KAYNAKLAR

Abou El-Soud, N. H., Deabes, M., Abou El-Kassem, L., & Khalil, M. 2015. Chemical composition and antifungal activity of Ocimum basilicum L. essential oil. Open access Macedonian journal of medical sciences, 3(3): 374.

Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., & Grangette, C. 2018. New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining in vitro and in vivo approaches. Beneficial microbes, 9(2): 317-331.

Amdekar, S., Roy, P., Singh, V., Kumar, A., Singh, R., & Sharma, P. 2012. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. International journal of inflammation, 2012.

Amund, O. D. 2016. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 62(9): 715-725.

Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. 2016. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. Frontiers in microbiology, 7: 1204.

Balamurugan, R., Janardhan, H. P., George, S., Raghava, M. V., Muliyil, J., & Ramakrishna, B. S. 2008. Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 46(5): 514-519.

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. 1994. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut, 35(4): 483-489.

Bozzi Cionci, N., Baffoni, L., Gaggìa, F., & Di Gioia, D. 2018. Therapeutic microbiology: the role of Bifidobacterium breve as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. Nutrients, 10(11): 1723.

Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., & Kroemer, G. 2000. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. Oncogene, 19(3): 329-336.

Brooks, G. F., Butel, J. S., Carroll, K. C. and Morse, S. A 2007. Jawetz , Melnick, and Medical microbiology. 24th ed. McGraw-Hill. p:254-255. New York.

Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J. R., & Genovés, S. 2011. Novel probiotic Bifidobacterium bifidum CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium Helicobacter pylori. Applied and environmental microbiology, 77(4): 1335-1343.

Chu, D. M., Ma, J., Prince, A. L., Antony, K. M., Seferovic, M. D., & Aagaard, K. M. 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. Nature medicine, 23(3): 314-326.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., & Serrano, M. 2005. Senescence in premalignant tumours. Nature, 436(7051): 642-642.

De Goffau, M. C., Fuentes, S., Van den Bogert, B., Honkanen, H., de Vos, W. M., Welling, G. W., & Harmsen, H. J. 2014. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. Diabetologia, 57(8): 1569-1577.

Derwa, Y., Gracie, D. J., Hamlin, P. J., & Ford, A. C. 2017. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. Alimentary pharmacology & therapeutics, 46(4): 389-400.

Doron, S., & Gorbach, S. L. 2006. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. Expert review of anti-infective therapy, 4(2): 261-275.

Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., & Van Sinderen, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(6): 2108-2113.

Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., & Segata, N. 2018. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. Cell host & microbe, 24(1): 133-145.

Francino, M. P. 2014. Early development of the gut microbiota and immune health. Pathogens, 3(3): 769-790.

Freitas, A. C., & Hill, J. E. 2018. Bifidobacteria isolated from vaginal and gut microbiomes are indistinguishable by comparative genomics. PLoS One, 13(4): e0196290.

Galley, J. D., & Bailey, M. T. 2014. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation. Gut microbes, 5(3): 390-396.

Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., & Isolauri, E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?. Neonatology, 92(1): 64-66.

Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Mora, D., Minuzzo, M., Scarafoni, A., Arioli, S., & Parini, C. 2008. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of Bifidobacterium bifidum to Caco-2 cells.

Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C. L., Hayes, M. A., Sanei, B., Parvizi, P., & Sharif, S. 2005. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. Clinical and Vaccine Immunology, 12(12): 1387-1392.

Hooper, N. M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. Molecular membrane biology, 16(2): 145-156.

Javed, N., Furman, D., & Khubchandani, J. 2013. The regulatory effects of Bifidobacterium infantis on the secretomotor activity of the enteric nervous system. Chronicles of Young Scientists, 4(2).

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. 2014. Stability of the maternal gut microbiota during late pregnancy and early lactation. Current microbiology, 68(4): 419-427.

Kato, S., Goodman, A., Walavalkar, V., Barkauskas, D. A., Sharabi, A., & Kurzrock, R. 2017. Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth RateGenomics of Immunotherapy-Associated Hyperprogressors. Clinical Cancer Research, 23(15): 4242-4250.

Kipper, T. G. J., da Silva, L. P., Bender, S., Vinderola, C. G., & de Fariña, L. O. (2020). Cell counting and bacterial inoculum standardization by spectrophotometric method for Bifidobacterium animalis ssp. Lactis INL1. *Brazilian Journal of Development*, *6*(10), 77634-77643.

Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Koppova, I., Havlik, J., Benada, O., & Kott, T. 2011. Bifidobacterium actinocoloniiforme sp. nov. and Bifidobacterium bohemicum sp. nov., from the bumblebee digestive tract. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(6): 1315-1321.

Kok, C. R., & Hutkins, R. 2018. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. Nutrition reviews, 76(Supplement_1): 4-15.

Kordy, K., Gaufin, T., Mwangi, M., Li, F., Cerini, C., Lee, D. J., & Aldrovandi, G. M. 2020. Contributions to human breast milk microbiome and enteromammary transfer of Bifidobacterium breve. PloS one, 15(1): e0219633.

Lagier, J. C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., & Raoult, D. 2012. Human gut microbiota: repertoire and variations. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2: 136.

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. 2018. Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. Frontiers in immunology, 9: 361.

Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. 2005. Getting better with bifidobacteria. Journal of applied microbiology, 98(6): 1303-1315.

Lee, J. H., & O'Sullivan, D. J. 2010. Genomic insights into bifidobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3): 378-416.

Lewis, Z. T., & Mills, D. A. 2017. Differential establishment of bifidobacteria in the breastfed infant gut. Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease, 88: 149-160.

Lewis, Z. T., Totten, S. M., Smilowitz, J. T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D. G., & Mills, D. A. 2015. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. Microbiome, 3(1): 1-21.

Li, S. C., Hsu, W. F., Chang, J. S., & Shih, C. K. 2019. Combination of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis shows a stronger anti-inflammatory effect than individual strains in HT-29 cells. Nutrients, 11(5): 969.

Mahmood Fashandi, H., Abbasi, R., & Mousavi Khaneghah, A. 2018. The detoxification of aflatoxin M1 by Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp.: A review. Journal of food processing and preservation, 42(9): e13704.

Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., & Tanaka, R. 2013. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. PloS one, 8(11): e78331.

Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., & Huys, G. 2007. In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains

from human origin and probiotic product isolates of Bifidobacterium. Journal of dairy science, 90(8): 3572-3578.

Masir, N., Jones, M., Abdul-Rahman, F., Florence, C. S., & Mason, D. Y. 2012. Variation in BCL2 protein expression in follicular lymphomas without t (14; 18) chromosomal translocations. Pathology, 44(3): 228-233.

Mattarelli, P., Biavati, B., Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. 2017. The Bifidobacteria and related organisms: biology, taxonomy, applications. Academic Press.

Metchnikoff, I. I. 2004. The prolongation of life: optimistic studies. Springer Publishing Company.

Milani, C., Lugli, G. A., Duranti, S., Turroni, F., Mancabelli, L., Ferrario, C., & Ventura, M. 2015. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. Scientific reports, 5(1): 1-14.

Milani, C., Ticinesi, A., Gerritsen, J., Nouvenne, A., Lugli, G. A., Mancabelli, L., & Ventura, M. 2016. Gut microbiota composition and Clostridium difficile infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. Scientific reports, 6(1): 1-12.

Milani, C., Turroni, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., & Ventura, M. 2016. Genomics of the genus Bifidobacterium reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. Applied and Environmental Microbiology, 82(4): 980-991.

Millar, A. D., Rampton, D. S., Chander, C. L., Claxson, A. W., Blades, S., Coumbe, A., & Blake, D. R. 1996. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. Gut, 39(3): 407-415.

Modesto, M., Watanabe, K., Arita, M., Satti, M., Oki, K., Sciavilla, P., & Mattarelli, P. 2019. Bifidobacterium jacchi sp. nov., isolated from the faeces of a baby common marmoset (Callithrix jacchus). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 69(8): 2477-2485.

Mohammadi, G., Dargahi, L., Naserpour, T., Mirzanejad, Y., Alizadeh, S. A., Peymani, A., & Nassiri-Asl, M. (2019). Probiotic mixture of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 attenuates hippocampal apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats. *International Microbiology*, *22*(3), 317-323.

O'Callaghan, A., & Van Sinderen, D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. Frontiers in microbiology, 7: 925.

Oelschlaeger, T. A. 2010. Mechanisms of probiotic actions–a review. International journal of medical microbiology, 300(1): 57-62.

O'Hara, A. M., & Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. EMBO reports, 7(7): 688-693.

O'Hara, A. M., & Shanahan, F. 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. TheScientificWorldJournal, 7: 31-46.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology, 98(3): 694-702.

Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Bailon, E., Henriksson, A., Xaus, J., & Galvez, J. 2007. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus, in the TNBS model of rat colitis. Journal of applied microbiology, 103(4): 836-844.

Pereira, C., Grácio, D., Teixeira, J. P., & Magro, F. 2015. Oxidative stress and DNA damage: implications in inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases, 21(10): 2403-2417.

Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. 2017. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. microbiome, 5(1): 1-19.

Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Vilchez-Padial, L. M., & Gil, A. 2017. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. Nutrients, 9(6): 555.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. Genes & nutrition, 6(3): 285-306.

Quaresma, M., Damasceno, S., Monteiro, C., Lima, F., Mendes, T., Lima, M., ... & Soares, P. (2020). Probiotic mixture containing Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutrition and Cancer*, *72*(8), 1355-1365.

Reyman, M., Van Houten, M. A., Van Baarle, D., Bosch, A. A., Man, W. H., Chu, M. L. J., & Bogaert, D. 2019. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. Nature communications, 10(1): 1-12.

Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B. J., & Blum, S. 2006. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-κB activation. World journal of gastroenterology: WJG, 12(23): 3729.

Roberfroid, M. B., Bornet, F., Bouley, C. E., & Cummings, J. H. 1995. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI)[Europe] workshop held in Barcelona, Spain. Nutrition reviews, 53(5): 127-130.

Round, J. L., & Mazmanian, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews immunology, 9(5): 313-323.

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Arigoni, F., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. 2009. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by Bifidobacterium animalis. Applied and Environmental Microbiology, 75(4): 1204-1207.

Ruiz, L., Coute, Y., Sanchez, B., Clara, G., Sanchez, J. C., & Margolles, A. 2009. The cell-envelope proteome of Bifidobacterium longum in an in vitro bile environment. Microbiology, 155(3): 957-967.

Ruiz, L., García-Carral, C., & Rodriguez, J. M. 2019. Unfolding the human milk microbiome landscape in the omics era. Frontiers in microbiology, 10: 1378.

Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., & Tao, F. 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. BMC gastroenterology, 16(1): 1-12.

Saavedra, J. M. 2007. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. Nutrition in clinical practice, 22(3): 351-365.

Salminen, S. J., Gueimonde, M., & Isolauri, E. 2005. Probiotics that modify disease risk. The Journal of nutrition, 135(5): 1294-1298.

Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. Molecular nutrition & food research, 61(1): 1600240.

Sanchez, B., Ruiz, L., de los Reyes-Gavilan, C. G., & Margolles, A. 2008. Proteomics of stress response in Bifidobacterium. Frontiers in Bioscience-Landmark, 13(18): 6905-6919.

Satoh, T., Izumi, H., Iwabuchi, N., Odamaki, T., Namba, K., Abe, F., & Xiao, J. Z. 2016. Bifidobacterium breve prevents necrotising enterocolitis by suppressing inflammatory responses in a preterm rat model. Beneficial microbes, 7(1): 75-82.

Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Favier, C. F., Dore, J., Edwards, C., & Vos, W. M. D. 2002. Diversity of Bifidobacterium and Lactobacillus spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. Microbial ecology in health and disease, 14(2): 97-105.

Shadnoush, M., Hosseini, R. S., Mehrabi, Y., Delpisheh, A., Alipoor, E., Faghfoori, Z., & Moghadam, J. Z. 2013. Probiotic yogurt affects pro-and anti-inflammatory factors in patients with inflammatory bowel disease. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 12(4): 929.

Sharma, M., Wasan, A., & Sharma, R. K. 2021. Recent developments in probiotics: An emphasis on Bifidobacterium. Food Bioscience, 41: 100993.

Sharon, I., Morowitz, M. J., Thomas, B. C., Costello, E. K., Relman, D. A., & Banfield, J. F. 2013. Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. Genome research, 23(1): 111-120.

Singh, S., Bhatia, R., Khare, P., Sharma, S., Rajarammohan, S., Bishnoi, M., & Kondepudi, K. K. 2020. Anti-inflammatory Bifidobacterium strains prevent dextran sodium sulfate induced colitis and associated gut microbial dysbiosis in mice. Scientific reports, 10(1): 1-14.

Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A., & Gueimonde, M. 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. Anaerobe, 16(3): 307-310.

Tanabe, S., Kinuta, Y., & Saito, Y. 2008. Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. International journal of molecular medicine, 22(2): 181-185.

Tanabe, S., Suzuki, T., Wasano, Y., Nakajima, F., Kawasaki, H., Tsuda, T., & Morita, H. 2014. Anti-inflammatory and intestinal barrier–protective activities of commensal lactobacilli and bifidobacteria in thoroughbreds: role of probiotics in diarrhea prevention in neonatal thoroughbreds. Journal of equine science, 25(2): 37-43.

Thushara, R. M., Gangadaran, S., Solati, Z., & Moghadasian, M. H. 2016. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. Food & function, 7(2): 632-642.

Toda, K., Hisata, K., Satoh, T., Katsumata, N., Odamaki, T., Mitsuyama, E., & Xiao, J. Z. 2019. Neonatal oral fluid as a transmission route for bifidobacteria to the infant gut immediately after birth. Scientific reports, 9(1): 1-9.

Torres-Alipi, B. I., Fragoso-Ramírez, J. A., Martínez-Limón, A. J., & Baptista-González, H. A. 1990. Bacterial colonization of the oral cavity in the newborn. Boletin Medico del Hospital Infantil de Mexico, 47(2): 78-83.

Turroni, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. 2014. Bifidobacterium bifidum as an example of a specialized human gut commensal. Frontiers in Microbiology, 5: 437.

Ungaro, R., Babyatsky, M. W., Zhu, H., & Freed, J. S. 2012. Protein-losing enteropathy in ulcerative colitis. Case Reports in Gastroenterology, 6(1): 177-182.

Wang, L. Q., Meng, X. C., Zhang, B. R., Wang, Y., & Shang, Y. L. 2010. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(11): 1999-2007.

Wang, W., Sun, M., Zheng, Y. L., Sun, L. Y., & Qu, S. Q. 2019. Effects of Bifidobacterium infantis on cytokine-induced neutrophil chemoattractant and insulin-like growth factor-1 in the ileum of rats with endotoxin injury. World journal of gastroenterology, 25(23): 2924.

Weber, E., Reynaud, Q., Suy, F., Gagneux-Brunon, A., Carricajo, A., Guillot, A., & Botelho-Nevers, E. 2015. Bifidobacterium species bacteremia: risk factors in adults and infants. Clinical Infectious Diseases, 61(3): 482-484.

Weiss, G., Christensen, H. R., Zeuthen, L. H., Vogensen, F. K., Jakobsen, M., & Frøkiær, H. 2011. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-β profiles in dendritic cells. Cytokine, 56(2): 520-530.

Wen, Y. A., Li, X., Goretsky, T., Weiss, H. L., Barrett, T. A., & Gao, T. 2015. Loss of PHLPP protects against colitis by inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1852(10): 2013-2023.

Xu, B., Li, Y. L., Xu, M., Yu, C. C., Lian, M. Q., Tang, Z. Y., & Lin, Y. 2017. Geniposide ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats via reducing inflammatory cytokine release and restoring impaired intestinal barrier function. Acta Pharmacologica Sinica, 38(5): 688-698.

Xue, L., He, J., Gao, N., Lu, X., Li, M., Wu, X., & Geng, Y. 2017. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. Scientific reports, 7(1): 1-13.

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., & Gordon, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. nature, 486(7402): 222-227.

Zhang, M., Sun, K., Wu, Y., Yang, Y., Tso, P., & Wu, Z. 2017. Interactions between intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. Frontiers in Immunology, 8: 942.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ali Muhsin Jawad AL-RUDAINI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi	2012-2018