



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK KOLİTE BAĞLI İNFLAMASYON VE ENTERİK SİNİR  
SİSTEMİ DEJENERASYONU ÜZERİNE AKKERMANSIA  
MUCINIPHILA'NIN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

ÖZGÜR YILMAZ  
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Meltem Kolgazi

İSTANBUL-2022





ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK KOLİTE BAĞLI İNFLAMASYON VE ENTERİK SİNİR  
SİSTEMİ DEJENERASYONU ÜZERİNE AKKERMANSIA  
MUCINIPHILA’NIN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

ÖZGÜR YILMAZ  
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Meltem Kolgazi

İSTANBUL-2022

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren desteğini ve tecrübesini her zaman hissettiğim değerli tez danışmanım Doç. Dr. Meltem Kolgazi'ye,

Gerek eğitimim boyunca gerekse tez sürecinde fikirlerini ve desteğini sunan değerli hocalarım Prof Dr. Güldal Süyen, Doç. Dr. Hande Yapışlar ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ergen'e,

Bu süreçte hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ve bana değerli olduğumu hissettiren başta Prof. Dr. Murat Baş ve Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim elemanlarına,

Araştırmanın tüm basamakları boyunca beraber çalıştığım ve tez üzerinde büyük yardımı olan yüksek lisans öğrencisi Merve Çatakçı'ya,

Doktora beraber başladığım, yaptığı ağabeylik ve yol arkadaşlığı nedeniyle Samed Özer'e,

Almanya'da yaptığı ev sahipliği, arkadaşlık ve projeye verdiği emek nedeniyle Steven Schulte'ye,

Doktora boyunca desteğini esirgemeyen, her zaman destekçim ve motivasyon kaynağım olan kız arkadaşım Justina Pakulnyte'ye,

Hayatım boyunca duydukları sevgi ve güveni bana her kararında hissettiren, ne olursa olsun destekleyen, bu tezi yazmamda en büyük destekçim canım ailem, annem Senem Yılmaz ve babam Emin Yılmaz'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, TÜBİTAK 1001 programı kapsamında 119S452 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları.....	6
2.2 Patogenez.....	7
2.2.1 İBH patogenezinde immün yanıt.....	7
2.2.2 İBH patogenezini etkileyen faktörler.....	9
2.3 Medikal Tedaviler.....	11
2.4 Deneysel Kolit Modelleri.....	12
2.4.1 TNBS kolit etki mekanizması.....	12
2.4.2 TNBS ile indüklenmiş kronik kolit modeli.....	14
2.5 Enterik Sinir Sistemi.....	14
2.5.1 Enterik sinir sistemi ve İBH.....	16
2.5.2 Enterik sinir sistemi ve mikrobiyota.....	17
2.6 <i>Akkermansia Muciniphila</i> .....	18
2.6.1 İnflamatuvar bağırsak hastalıkları ve <i>A. muciniphila</i> .....	19
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 Hayvanlar.....	22
3.2 Kronik Kolit Modelinin Oluşturulması.....	22
3.3 <i>A. muciniphila</i> 'nın Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Tedavi için Kullanıma Hazırlanması.....	23
3.4 Makroskopik Hasar Değerlendirmesi.....	25

3.4.1	Kolon içi görüntüleme.....	25
3.4.2	Hastalık indeksi ve fekal skorlama.....	26
3.4.3	Islak doku ağırlığı (IDA) .....	27
3.5	Biyokimyasal Ölçümler .....	27
3.5.1	ELISA analizi.....	27
3.5.2	Dokuda MPO ölçümü .....	27
3.5.3	Protein analizi .....	28
3.6	Mikroskopik Değerlendirme .....	29
3.6.1	Hematoksilen-eozin boyama ile inceleme .....	29
3.6.2	İmmunofloresan yöntem ile inceleme.....	29
3.6.3	Geçirimli elektron mikroskopi ile inceleme.....	30
3.6.4	Taramalı elektron mikroskopi ile inceleme .....	30
3.7	Fekal Mikrobiyota Analizi.....	31
3.8	<i>İn vitro</i> Çalışmalar.....	31
3.8.1	Myenterik pleksus izolasyonu .....	31
3.8.2	Hücre kültürü .....	31
3.8.3	TNBS ve sitokin kokteyli uygulaması .....	32
3.8.4	<i>A. muciniphila</i> veziküllerinin elde edilmesi ve karakterizasyonu .....	32
3.9	Differansiye Olan Nörosferlerin İmmunofloresan Boyanması .....	34
3.10	İstatistiksel Analiz .....	34
4	BULGULAR.....	35
4.1	Makroskopik Bulguların Değerlendirilmesi.....	35
4.2	Biyokimyasal Bulgular .....	38
4.2.1	Nötrofil infiltrasyonu değerlendirilmesi .....	38
4.2.2	İnflamatuvar sitokinlerin değerlendirilmesi .....	39
4.2.3	Geçirgenlik değerlendirilmesi .....	40
4.2.4	Protein ekspresyonu değerlendirilmesi .....	41
4.3	Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları.....	46
4.3.1	Hematoksilen eozin boyama.....	46
4.3.2	Taramalı elektron mikroskopi incelemesi .....	50
4.3.3	İmmunofloresan sonuçları .....	54
4.4	<i>İn vitro</i> Değerlendirme Sonuçları .....	75

4.4.1 Myenterik pleksus izolasyonu .....	75
4.4.2 Vezikül karakterizasyonu sonuçları.....	75
4.4.3 Myenterik pleksus hasar sonuçları.....	81
5 TARTIŞMA .....	85
6 SONUÇ .....	96
7 KAYNAKLAR .....	98
8 EKLER.....	117
EK1 Etik Kurul Onayı.....	117
9 ÖZGEÇMİŞ.....	118



## KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

<b>APC</b>	Antijen sunan hücre
<b>AMEV</b>	<i>Akkermansia Muciniphila</i> ekstraselüler vezikülleri
<b>BMP-2</b>	Kemik morfogenetik protein-2
<b>BSA</b>	Bovin serum albumin
<b>CSF-1</b>	Koloni uyarıcı faktör-1
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DNBS</b>	Dinitrobenzene sülfonik asit sulfonic acid
<b>DSS</b>	Dekstran sülfat sodyum
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>FGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>GDNF</b>	Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör
<b>GWAS</b>	Genom ilişkilendirme çalışmaları
<b>GFAP</b>	Glial fibriler asidik protein
<b>HBSS</b>	Hank dengeli tuz solüsyonu
<b>H&amp;E</b>	Hematoksilen eozin
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interlökin 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interlökin 6
<b>IL-10</b>	Interlökin 10
<b>IDA</b>	Islak doku ağırlığı
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MPO</b>	Myeloperoksidaz
<b>NDS</b>	Normal domuz serumu
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu çözelti
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskopi
<b>SF</b>	Serum fizyolojik
<b>TEM</b>	Geçirimli elektron mikroskopi
<b>TLR-4</b>	Toll benzeri reseptör-4
<b>TNBS</b>	Trinitrobenzen sülfonik asit

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında etkin pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler .....	8
Şekil 2. TNBS etki mekanizması .....	13
Şekil 3. Enterik sinir sistemi organizasyon yapısı .....	15
Şekil 4. Deney protokolü.....	23
Şekil 5. Ultrasantrifüj ile vezikül elde edilme aşamaları .....	33
Şekil 6. Haftalık hastalık indeksi değişimi.....	35
Şekil 7. Fekal skor.....	36
Şekil 8. Islak doku indeksi (IDA) .....	36
Şekil 9. MPO sonuçları .....	38
Şekil 10. ELISA sonuçları.....	39
Şekil 11. CSF-1 sonuçları .....	40
Şekil 12. LPS sonuçları .....	41
Şekil 13. GFAP sonuçları.....	42
Şekil 14. Tubulin III sonuçları .....	43
Şekil 15. HuC/D sonuçları .....	44
Şekil 16. NFκB sonuçları .....	45
Şekil 17. Deney gruplarının histopatolojik skor analiz grafiği .....	48
Şekil 18. GFAP immünoreaktivite sonuçları .....	73
Şekil 19. Sox10 immünoreaktivite sonuçları .....	73
Şekil 20. S100B mmunoreaktivite sonuçları.....	74
Şekil 21. Tubulin III immünoreaktivite sonuçları.....	74
Şekil 22. HuC/D immünoreaktivite sonuçları.....	74
Şekil 23. <i>in vitro</i> Tubulin III immünoreaktivite sonuçları .....	84
Şekil 24. <i>A. muciniphila</i> 'nın Etkinlik Sonuçları .....	96

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Anaerobik kan kültürü şişesi ve sistemindeki üreme eğrisi.....	24
Resim 2. %5 koyun kanlı Columbia besiyeri ve BD GasPak™ EZ pouch sistem ....	24
Resim 3. <i>A. muciniphila</i> kolonileri .....	25
Resim 4. Kolonoskopi optiği ve görüntüleme sistemi .....	26
Resim 5. Kolonoskopi görüntüleri .....	37
Resim 6. Beta aktin jel görüntüleri .....	41
Resim 7. Hematoksilen eozin boyama ile histolojik organizasyon.....	47
Resim 8. Hematoksilen eozin boyama ile myenterik plexus görüntüleme.....	49
Resim 9. SEM mikrografları .....	51
Resim 10. Ultrastrüktürel inceleme görüntüleri.....	53
Resim 11. Kontrol grubu Tubulin III ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	55
Resim 12. TNBS grubu Tubulin III ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	56
Resim 13. AKM grubu Tubulin III ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	57
Resim 14. Kontrol grubu Tubulin III ve S100B immünofloresan görüntüleri .....	58
Resim 15. TNBS grubu Tubulin III ve S100B immünofloresan görüntüleri.....	59
Resim 16. AKM grubu Tubulin III ve S100B immünofloresan görüntüleri.....	60
Resim 17. Kontrol grubu Tubulin III ve Sox10 immünofloresan görüntüleri .....	61
Resim 18. TNBS grubu Tubulin III ve Sox10 immünofloresan görüntüleri .....	62
Resim 19. AKM grubu Tubulin III ve Sox10 immünofloresan görüntüleri .....	63
Resim 20. Kontrol grubu HuC/D ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	64
Resim 21. TNBS grubu HuC/D ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	65
Resim 22. AKM grubu HuC/D ve GFAP immünofloresan görüntüleri .....	66
Resim 23. Kontrol grubu HuC/D ve S100B immünofloresan görüntüleri.....	67
Resim 24. TNBS grubu HuC/D ve S100B immünofloresan görüntüleri.....	68
Resim 25. AKM grubu HuC/D ve S100Bimmünofloresan görüntüleri.....	69
Resim 26. Kontrol grubu HuC/D ve Sox10 immünofloresan görüntüleri .....	70
Resim 27. TNBS grubu HuC/D ve Sox10 immünofloresan görüntüleri .....	71
Resim 28. AKM grubu HuC/D ve Sox10immünofloresan görüntüleri .....	72
Resim 29. Diseksiyon Mikroskopi altında Post-natal Longitudinal Kas İzolasyonu.	75
Resim 30. İnkübasyon Sonrası Görüntü .....	76

Resim 31. Nörosfer oluşumu .....	77
Resim 32. Differansiye olmuş nörosfer yapıları .....	78
Resim 33. Ultrasantrifüj sonrası vezikül peleti .....	79
Resim 34. SDS PAGE görüntüsü.....	80
Resim 35. TEM ile vezikül görüntüsü .....	80
Resim 36. <i>in vitro</i> hasar görüntüleri.....	81
Resim 37. <i>in vitro</i> TNBS ve <i>A. muciniphila</i> Ekstraselüler Vezikül Uygulaması .....	82
Resim 38. <i>in vitro</i> Sitokin ve <i>A. muciniphila</i> Ekstraselüler Vezikül Uygulaması .....	83



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Hastalık indeksi değerlendirme tablosu .....	26
Tablo 2. Kullanılan birincil ve ikincil antikorlar .....	28
Tablo 3. Mikroskopik skoraama tablosu .....	29



## ÖZET

### **Kronik Kolite Bağlı İnflamasyon ve Enterik Sinir Sistemi Dejenerasyonu Üzerine *Akkermansia muciniphila*'nın İyileştirici Etkisi**

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) nedeni tam olarak anlaşılammış ataklar ile seyreden kronik hastalıklardır. Günümüzde kullanılan ilaçlar yan etkileri nedeniyle yalnızca kısa süre uygulanabilmektedir. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ve araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca İBH'nin enterik sinir sisteminde (ESS) dejenerasyona neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda inflamasyona bağlı enterik dejenerasyonun önlenmesi ve tedavi edilmesinde mikrobiyota kaynaklı bakterilerin olumlu etkileri olabileceği tartışılmaktadır. *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) bağırsak mikrobiyotasında mün tabakada bulunan anaerobik bir bakteridir. Yeni araştırmalar farklı hastalıklarda *A. muciniphila* popülasyonunun azaldığı veya koruyucu/tedavi edici olarak arttığı bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında çalışmada *A. muciniphila* uygulamasının kolite bağlı inflamasyon ve enterik sinir dejenerasyonunda iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Çalışmada Trinitro-benzen-sulfonik asit (TNBS) ile indüklenmiş kronik kolit modelinde farelere 5 hafta boyunca *A. Muciniphila* oral olarak verilmiştir. Kolon örnekleri mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde iyileşme bakımından incelenmiştir. Tedavi öncesi, sırası ve sonrası fekal örnekler toplanarak mikrobiyotada genel popülasyon değişimi izlenmiştir. ESS'den salgılanan spesifik proteinler ölçülmüş ve enterik dejenerasyon mikroskopik düzeyde incelenmiştir. Ek olarak *in vitro* myenterik pleksus izolasyonu yapılmış ve *A. Muciniphila*'nın ESS hasarı üzerine etkileri araştırılmıştır. *A. muciniphila*'nın TNBS kolit modelinde inflamatuvar parametreler üzerinde ve ESS hasarı sonrası hem parametrelerde hem de doku düzeyinde iyileştirici etkileri olduğu görülmüştür. Sonuç olarak *A. muciniphila*'nın kronik kolit modelinde tedavi edici etkinliği ortaya konmuştur. *A. muciniphila*'nın İBH'de potansiyel bir mikrobiyota tedavi seçeneği olarak değerlendirilmesi için daha ileri klinik ve deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** *Akkermansia muciniphila*, Enterik sinir sistemi, İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, Mikrobiyota, TNBS

## ABSTRACT

### **Ameliorative Effect of Akkermansia Muciniphila on Chronic Colitis Induced Inflammation and Enteric Nervous System Degeneration**

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases that are not fully understood. Drugs in use can only be applied for a short time due to their side effects. Therefore, research is needed to develop new treatment approaches. In addition, it has been proven that IBD causes degeneration in the enteric nervous system (ENS). In recent years, it has been discussed that bacteria derived from microbiota may have positive effects in the prevention and treatment of inflammatory enteric degeneration. Akkermansia muciniphila (*A. muciniphila*) is an anaerobic bacterium found in the mucin layer of the intestinal microbiota. It has been found that the population of *A. muciniphila* decreases in case of different diseases and it has an anti-inflammatory effect as a preventive and therapeutic. In the light of this information, the curative effect of *A. muciniphila* application on inflammation and enteric nerve degeneration due to colitis was investigated. 5 weeks of *A. muciniphila* treatment in Trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS) induced chronic colitis model was investigated. Colon samples were examined at microscopic, biochemical, and molecular levels for recovery. Fecal samples were collected before, during, and after treatment to evaluate the population changes in the microbiota. Specific proteins secreted from ENS were evaluated and enteric degeneration was examined at the microscopic level. In addition, the effects of *A. muciniphila* treatment on enteric nerve damage and healing after in vitro myenteric plexus isolation were investigated. As a result of the research, the ameliorative effects of *A. muciniphila* were observed in the TNBS colitis model induced inflammation and ENS injury. In the light of these results, the therapeutic efficacy of *A. muciniphila* has been demonstrated. In combination of these results, *A. muciniphila* can potentially be evaluated as a microbiome-based treatment in IBD with further clinical and experimental studies.

**Keywords:** *Akkermansia muciniphila*, Enteric nervous system, Inflammatory bowel diseases, Microbiota, TNBS

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Çalışmada *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*)'nın 2,4,6-trinitro benzene sulfonik asit (TNBS) ile indüklenen kronik kolit modelinde tedavi edici etkisinin ve kolite eşlik eden enterik sinir sistemi (ESS) hasarında iyileştirici rolünün *in vivo* ve *in vitro* düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) nedeni tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber; süregelen immün aktivasyon, inflamasyon ve remisyonlarla seyretmekte ve dünya nüfusunun %7-10'unu etkilemektedir (1). Bağırsakta bariyer bütünlüğünde bozulma ile anormal sekresyon/motilite ve geçirgenlikte artış meydana gelmektedir. Artan geçirgenlik bakteriyel antijenlerin gastrointestinal lümenine geçişine ve sitokin üretiminde anormal artışa neden olmaktadır (2). İnflamatuvar bağırsak hastalıkları tedavisinde uzun zamandır çeşitli ilaç tedavileri kullanılmaktadır (3). Ancak bu ilaçların etkinliği inflamasyon ve buna bağlı komplikasyonların azaltılması ile sınırlıdır (4). Bunun yanında bu ilaçların düzenli alınması gastrik ülser, Cushing sendromu, hiperglisemi, kas zayıflığı, enfeksiyon, yara iyileşmesinde gecikme, katarakt, glokom ve lenfoma gibi yan etkilere neden olmaktadır (4). Yine aynı çalışma bazı ilaçlar ile ciddi düzeyde morbidite oranının arttığı ve hayat kalitesinin düştüğü de gösterilmiştir. Son yıllarda anti-tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), anti- $\alpha$ -4 integrin, peroksizom proliferatör aktive reseptör- $\gamma$  ligandı ve probiyotik tedavileri kullanılmaktadır (5,6). Ancak infliximab, adalimumab ve certolizumab gibi yaygın kullanılan anti-TNF ilaçların enfeksiyon ve malignite riskini arttırdığı, özellikle non-hodgkin lenfomaya neden olabileceği ileri sürülmüştür (7,8,9). Kalp rahatsızlıkları ve akut enfeksiyon atakları da bu ilaçların potansiyel yan etkileri arasında bulunmuştur. Yayınlanan raporlar İBH hastalarının %40'nın alternatif tedavi yöntemlerine yöneldiğini göstermektedir (10). Son yıllarda mikrobiyota tedavilerinin iyi etkilerinin gösterilmesi ile İBH üzerinde mikrobiyota ile tedaviler ön plana çıkmaktadır.

2004 yılında keşfedilen *A. muciniphila* bağırsak mikrobiyotasında en çok bulunan bakterilerden biridir (popülasyonun yaklaşık %0,5-5). Verrukomikrobia ailesine üye gram negatif anaerobik bir bakteridir. Müsin ile beslenmektedir ve mukus tabakasına

yerleşmiştir (11). Son yıllarda *A. muciniphila* insan ve hayvan sağlığına pozitif etkisi nedeniyle ilgi çekmektedir (12). Yapılan çeşitli araştırmalarda diyet ile indüklenmiş obez farelerde *A. muciniphila* içerikli prebiyotik tedavisi sonrası kilo alımı azalmış, *A. muciniphila* popülasyonunun ise normal diyete göre yaklaşık 100 kat arttığı gösterilmiştir (13,14). Bu çalışmaların yanında obezite, tip 2 diyabet, İBH, hipertansiyon, karaciğer hastalıkları gibi patolojik durumlarda *A. muciniphila* dağılımında belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (15-19). 2016 yılında yapılan bir araştırmada farelerde indüklenmiş kolit modelinde kafeik asit uygulaması ile *A. muciniphila* popülasyonunda artış ve buna bağlı olarak inflamasyonda iyileşme gözlemlenmiştir (12). 2018’de ise *A. muciniphila*’dan elde edilen metabolitlerin sıkı bağlantı proteinlerini düzenleyerek geçirgenliği etkilediği ve inflamasyonda koruyucu etkisinin olabileceği gösterilmiştir (20). Bunun yanında Li ve arkadaşları 8 haftalık *A. muciniphila* tedavisinin batı tarzı diyet ile oluşan inflamasyon parametrelerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (21). 2013 yılında yapılan çarpıcı bir araştırmada farelerde dekstran sodyum sülfat (DSS) ile indüklenmiş ülseratif kolit modelinde toplanan fekal örneklerde *A. muciniphila*’nın ekstraselüler veziküllerinde (AMeV) belirgin bir azalma olduğu ve AMeV verilmesinin kolite karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (22).

ESS gastrointestinal sistemde bulunan ve bağırsakların yönetim merkezini oluşturan nöronlar topluluğudur (23). Hayvan ve insan üzerinde yapılan çalışmalar, İBH modellemelerinde ESS hücrelerinde hiperatrofi, hiperplazi ve sinir liflerinde aksonal hasar, gliyal hücrelerde hiperplazi ve sayısal artış, yapısal morfoloji değişimi göstermektedir (24,25,26). 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada ise inflamasyona bağlı enterik nöronlarda oluşan anormalliklerin bağırsak yapısında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (27). Epitel sekresyonun nöral kontrolünde bozulma, enterik nöronlarda artan uyarılabilirlik ve sinaptik iletide değişimler başlıca nöral değişimler olarak aynı çalışmada gruplanmıştır. Ancak ESS ile kolit arasındaki beraber seyir ve bu bozulmanın nasıl tedavi edilebileceği henüz açıklanmamıştır. Aynı zamanda *A. muciniphila* ile ESS ilgili etkileşim henüz araştırılmamıştır.

Enterik gliya hücreleri ESS'de en belirgin hücresel yapıyı oluşturmaktadır ve mukozal yapının bütünlüğü ve sağlığı üzerinde faydalarının olduğu gösterilmiştir (28). Fenotip olarak merkezi sinir sisteminde bulunan astrositlere benzemektedir (29). Myenterik pleksus ve submukozal pleksusta enterik nöronları çevrelemesinin yanında kan damarları ve lenfatik sistemle de ilişkilidir (30). Olgun gliya hücreleri ara filament proteininden (GFAP) zengindir ve İBH gibi inflamasyon durumunda ekspresyonu belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (31,32). Bunun yanında gastrointestinal sistemde S100 proteinlerinden gliya hücrelerinde eksprese olan tek protein S100B'dir ve son bulgular ekspresyonda artışın gut inflamasyon derecesini belirlemede önemli bir etken olduğu göstermektedir (33,34). Enterik gliya hücreleri bağırsak bariyer fonksiyonunu, sıkı bağlantı proteinlerinden Zonulin-1 ve Okludin ekspresyonunu artışı düzenleyerek ve S-nitrosoglutasyon salınımını artırarak kontrol etmektedir (35). Yapılan çeşitli çalışmalar ile homeostasisin kontrolünde gliya hücrelerinin elzem bir rolü olduğu gösterilmiştir (36,37). 2012 yılında yapılan çalışmada ise uygulanan antiprotozoal ilaç sonrasında farelerde indüklenmiş kolit modelinde GFAP ve S100B ekspresyonunda ve mukozal inflamasyonda belirgin bir azalma gösterilmiş, ilacın anti-inflamatuvar etkisinin gliya hücrelerini hedefleyerek gerçekleştiği bulunmuştur (38).

2014 yılında germ-free fareler üzerinde yapılan araştırmalarda bağırsak mikrobiyotasının doğum sonrası erken dönemde ESS'nin gelişiminde elzem olduğu gösterilmiştir. Steril ortamda büyüyen ve genetik olarak mikrofloraya sahip olmayan farelerin bozulmuş nöral krest ve azalmış hücre hattı sayısına sahip olduğu bulunmuştur (39). Aynı zamanda bu farelerde jejunum ve ileumda spontan kas kasılmaları da gösterilmiştir. Germ-free farelerde azalmış duysal nöron uyarılabilirliği gözlemlenmiş, normal mikrobiyotanın düzenlenmesi ile bu durum düzeltilmiştir (40). 2017 yılında ise ESS'nin bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu düzenlediği ve ESS hücrelerinin kaybının mikrobiyota kompozisyonunda disbiyosise neden olabildiği gösterilmiştir (41).

Bu araştırmaların ışığında çalışmada *A. muciniphila*'nın TNBS ile indüklenen kronik kolit modelinde terapötik etkisi ve kolite eşlik eden ESS hasarında *A. muciniphila*'nın iyileştirici etkisi araştırılmıştır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) nedeni tam olarak anlaşılamamış ataklar ile seyreden, çeşitli faktörlerin tetiklediği otoimmün süreçle karakterize kronik hastalıklardır. Temel olarak ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olarak sınıflandırılmaktadır (42). Bu iki hastalık klinik, endoskopik ve histolojik özellikleri ile birbirinden ayrılmaktadır (43). Hastaların yaklaşık %10-15'inde ise Crohn hastalığı ve Ülseratif kolit ayrımı yapılamamakta ve bu durum kolit olarak adlandırılmaktadır.

Ülseratif kolit genellikle kolon, rektum ve proksimale doğru tutulumu ile karakterize iken, Crohn hastalığı gastrointestinal kanalın tamamında aralıklı segmentler halinde kendini gösterebilmektedir (44). Klinikte ortak belirtiler olarak kanlı ishal, karın ağrısı, kilo kaybı ve ateş ile kendini gösterebilmektedir. Araştırmaların devam etmesinin yanında İBH'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir (45-47).

Görülme sıklığı coğrafi konum ve popülasyonun özelliklerine göre farklılık göstermek ile beraber, İBH dünyada yaklaşık olarak beş milyon insanı etkilemektedir (48,49). Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının kadın ve erkekte görülme sıklığı aynıdır. Hastalığın farklı yaşlarda ortaya çıktığı görülse de, Crohn hastalığı genellikle 20'li yaşlarda, Ülseratif kolit ise genellikle 30'lu yaşlarda tanı almaktadır (50).

Son yıllarda yapılan araştırmalar Türkiye ve diğer gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığında artış eğilimi olduğunu göstermektedir. Ekonomik gelişmeler ve buna bağlı olarak sanayileşme ile hastalıkların insidansları arasında bir korelasyon olduğu da gösterilmiştir (51). Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'nın yüksek vaka sayısının yanında Çin, Güney Kore, Afrika ve Hindistan gibi ülkelerde de endüstrileşme ile birlikte yaygınlaşmaktadır (52). ABD'de görülme sıklığı Ülseratif kolit için 7-9/100000 iken, Crohn hastalığı için ve 6-8/100000 olarak bildirilmiştir

(53). Ülkemizde ise İBH insidansı Ülseratif kolit için 2,6/100000 ve Crohn hastalığı için 1,4/100 000 olarak bildirilmiştir (54).

## **2.2 Patogenez**

İBH'nin patogenezinde bilinen birçok faktör rol oynamaktadır. Hastalık üzerinde genetik yatkınlık, immün yanıt, çeşitli patojenler, mikroflora ve çevresel faktörlerin etkisinin olduğu bilinmektedir. Ancak son bilimsel gelişmelere rağmen kesin patogenez tam olarak açıklanamamıştır (55).

### **2.2.1 İBH patogenezinde immün yanıt**

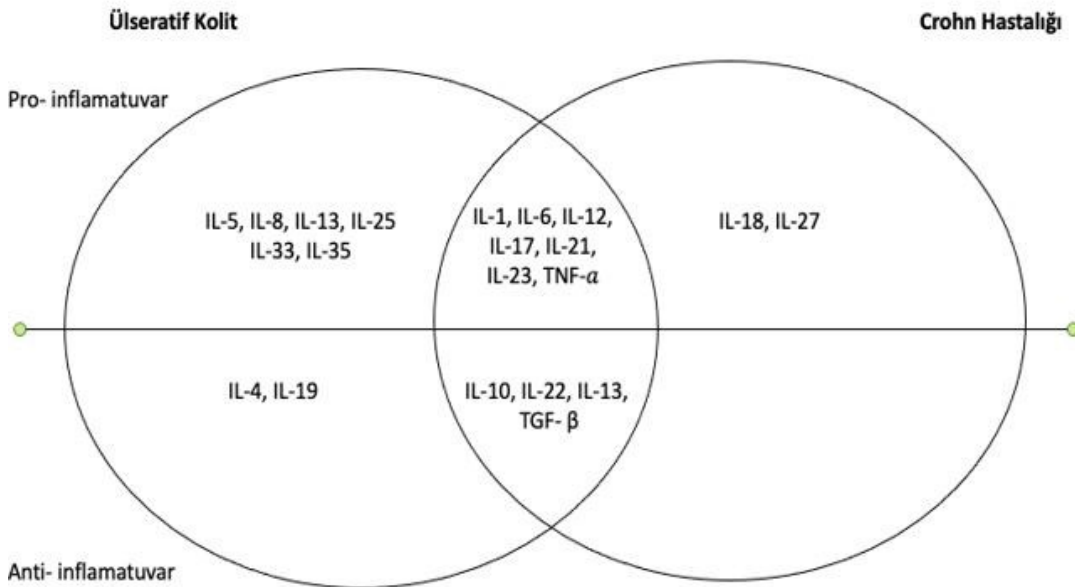
İBH patogenezinde oluşan immün yanıtta T hücreleri önemli bir yere sahiptir (Zhu vd., 2010). İBH'de temel patofizyolojik mekanizma Yardımcı T hücre 1 (Th1) ve Yardımcı T hücre 2 (Th2) lenfositlerinin aktivasyonunda oluşan bozukluk ile karakterizedir. Crohn hastalığında genellikle Th1 hücrelerinde aktivasyon gerçekleşirken, Ülseratif kolit hastalarında Th2 hücre aktivasyonu gözlemlenmektedir. Sağlıklı bireylerde salgılanan kemokinler ve sitokinlerin bir T hücre altı grubu tarafından inhibe edilmesi veya baskılanarak dengelenmesi dengeli bir şekilde ilerlemektedir. İBH hastalarında ise aşırı inhibisyon veya salınımına bağlı olarak hastalık durumu gözlemlenmektedir (56). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise Th1 ve Th2 aracılı cevabın bir süre sonra benzer olduğu, ayırıcı inflamatuvar yanıtın oluşması için Th9, Th17, Th22 ve T regülatör-düzenleyici (Treg) lenfositlerin de önemli etkisinin olduğu bulunmuştur (57-59).

Treg hücreleri doku üzerine doğrudan ve parakrin etkileri ile inflamasyonda önemli fonksiyona sahiptir (60). Treg tarafından üretilen anti-inflamatuvar sitokin İnterlökin-10 (IL-10) mukozal inflamasyonun oluşmasını önlemektedir (61). Yapılan hayvan çalışmalarında IL-10'un mukozal immün sistem içerisindeki rolü çalışılmış, inaktivasyonu ile IL-12 ve İnterferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir (62,63). Aynı zamanda Treg lenfositlerde seçici olarak IL-10 ekspresyonunun bozulmasının spontan kolit gelişimine neden olduğu bulunmuştur

(64). Homeostatik dengenin kurulması için IL-10 eksresyonunun dışında inhibitör sitokin üretimi, etken hücrenin sitolizi, metabolik bozulma, hücre tamirinin başlatılması gibi fonksiyonlara da sahiptir (65). İBH’de bu fonksiyonların sürdürülmesi ve dengenin sağlanması için Treg lenfositlerin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

2005 yılında yapılan çalışmalar ile inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde IL-17 üretimini kontrol eden yeni bir T hücre alt türü olarak Th17 lenfositler keşfedilmiştir (66). Günümüzde ise Crohn hastalığı ve Ülseratif kolit hastalarından alınan dokularda aşırı Th17 infiltrasyonu ve Th17 ilişkili sitokinlerin üretimi gerçekleştiği bilinmektedir (67,68). IL-21, IL-22, IL-23 ve IL-26 gibi sitokinlerin İBH hastalarında belirgin bir şekilde arttığı, bu cevabın Th17 ilişkili olduğu çalışmalar ile desteklenmiştir (69,70).

IL-17, Nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B) hücre altı sinyal yolağının aktivasyonuna neden olarak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunda da rol oynamaktadır (71-73). IL-17’nin İBH hastalarında serum ve doku düzeyinde artış gösterdiği, sağlıklı bireylerde ise bu sitokinlerin görülmediği belirlenmiştir (74). Bu nedenler ile IL-17 ve Th17 lenfositlerin inflamasyonun lokalizasyonu ve amplifikasyonu üzerinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Etkin Pro-inflamatuvar ve Anti inflamatuvar Sitokinler

## 2.2.2 İBH patogenezi etkileyen faktörler

İBH hastalarının coğrafi ve ırk dağılımı heterojen bir yapı göstermesi ile hastalığın patolojisinde genetik yatkınlığın önemli olduğunu göstermektedir. Yapılan araştırmalar ailede İBH öyküsünün olmasının hastalık riskini 4 ila 20 kat arttırdığını göstermektedir (4,75).2013 yılında yayınlanan bir çalışma, GWAS (Genom-wide Association Studies) araştırmalarında Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı ile ilişkili 160 gen bölgesi bulunduğunu bildirmiştir (76). Bulunan genlerin lenfositlerin aktivasyonunda, immün sistem yanıtında, bariyer bütünlüğünün korunması ve patojenlerin tanınması gibi savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir.

Luminal antijenler hastalığın oluşumu ve gelişiminde diğer önemli bir faktördür. Sağlıklı bireylerde antijenler bağırsak mukoza tabakasını geçemez iken, İBH hastalarında mukoza bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak geçirgenlik artmakta ve inflamasyona neden olmaktadır (77). Stres, kötü beslenme alışkanlıkları, sigara vb. etmenler mukoza ve mukus tabakasına zarar vermesi ile intestinal kanalda geçirgenliğin artmasına neden olur. (78). Daha sonra luminal antijenlerin mukoza epiteli ile etkileşime girmesi ile inflamasyon süreci aktive olmaktadır. Ek olarak mikrobiyota kompozisyonundaki değişiklikler ile mikrobiyal toksinler belirgin bir şekilde artış göstermektedir. Bu artış, müköz tabakasının üretimini sağlayan ve kimyasal kompozisyonunu düzenleyen bakterilerin azalmasına da neden olmaktadır. Bu azalma ile mukus tabakası koruyucu etkisini yapamaz ve luminal antijenler epitel ile teması girerek immün sistemi aktive etmektedir (79-81). Bu durum İBH’de görülen immün aktivasyon sürecini açıklamaktadır.

Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde İBH’nin yaygın olarak görülmesi genetik yatkınlığın yanında çevresel etmenlerin de önemli olduğunu göstermektedir. Beslenme şekli, sigara kullanımı, güneş ışığı, kimyasallara maruz kalma gibi etmenlerin de bu artışa etki ettiği düşünülmektedir. (1,82,83). Özellikle doğal şeker yerine rafine şeker ve fruktoz şekeri kullanımı, doymuş yağ asitlerinden zengin hazır yemek tüketiminin artması, bunun yanında sağlıklı gıda kategorisindeki meyve, sebze gibi bitkisel

gıdaların tüketiminin ve kalitesinin azalması ile İBH riskinin arttığı gösterilmiştir (84). Doymuş yağlar, hayvansal gıdalar, yüksek rafine şeker tüketimi gibi etmenlerin bağırsak mukoza yapısını etkileyerek inflamasyon riskini arttırdığı gösterilmiş (85,86); tersine bitkisel ve liften zengin, dengeli beslenmenin ise İBH gelişim riskini azalttığı bulunmuştur. (87,88).

Sigara kullanımı, antibiyotikler, çeşitli non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, appendektomi, çevre kirliliği ve stres İBH ile ilişkilendirilen diğer önemli çevresel etmenler olarak kabul edilmektedir. (84,89). Antibiyotiklerin ve çeşitli ilaçların ise mukozal bütünlüğü bozarak immün sistemi aktive ettiği ve riski arttırdığı gösterilmiştir (89,90). Appendektomi ameliyatı olan kişilerde ise Ülseratif Kolit gelişim riskinin ilginç bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (91,92).

Bunun yanında çocukluk çağında maruz kalınan çeşitli çevresel faktörler ve patojenlerin İBH gelişimi ve korunmasında önemli risk faktörleri arasında yer aldığı düşünülmektedir. Doğumun tipi, anne sütü tüketimi, hava kirliliği, stres, hijyen, belirli dozda patojenlere maruz kalma, aşılama gibi etmenler ve İBH ilişkisini gösteren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (50, 87, 88, 89, 93,94).

Aynı zamanda insanlar ve hayvan kolit modellerinde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerin hastalığın ilerleyişini etkilediği gösterilmiştir. Bu etkisini mikrofloranın dengesini bozarak ve buna bağlı faydalı bakterilerin de azalmasına neden olarak gerçekleştirdiği, düzensiz ve aşırı immün uyarıma neden olduğu bildirilmiştir (95).

Mikrobiyotanın İBH'de önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (96,97). Yapılan çalışmalarda İBH hastalarının mikrobiyota kompozisyonlarının sağlıklı bireyler göre belirgin bir şekilde değiştiği bulunmuştur (98-100). İBH hastalarında mikrobiyotada disbiyosis meydana geldiği, çeşitliliğin azalması ve patojenik bakterilerin dominasyonu gibi değişimlerin gerçekleştiği bildirilmiştir (101,102). Farklı bir araştırmada ise cerrahi olarak alınan terminal ileum ve kolon doku örneklerinde mukozanın bakteriyel invazyonu olduğu bulunmuştur. (103). Ülseratif koliti olan

hastalardan alınan doku örneklerinde %83,3'ünde, Crohn hastalığı hastalarında %55,6'sında görülürken, kontrol gruplarında herhangi bir bakteri gözlemlenmemiştir. Qin ve ark. İBH hastalarının total mikrobiyal gen sayısının sağlıklı bireylere göre %25 oranında daha az olduğunu göstermiştir (104).

Yapılan İBH çalışmaları intestinal bütünlük ve inflamasyon arasında kompleks bir ilişki olduğunu göstermektedir. İBH hastalarında bağırsak bütünlüğünün bozulduğu, geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir (105-107). İBH hastalarında okludin, zonulin, klaudin gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin belirgin bir şekilde azaldığı, yapılarının bozulduğu bulunmuştur (108). Crohn hastalarının sağlıklı bireylere göre intestinal geçirgenliklerinde belirgin bir fark olduğu da çeşitli araştırmalarla desteklenmiştir (105,109). Bu nedenle intestinal permeabilite parametrelerinin hastalığın evrelerinde teşhis için kullanılabileceği de düşünülmektedir (110,111).

### **2.3 Medikal Tedaviler**

İBH tedavisinde uzun zamandır çeşitli ilaç tedavileri kullanılmaktadır. Hafif atak durumunda salfasalazin ve 5-aminosalisilik asit gibi anti-inflamatuvar ilaçlar, kronik ve daha ağır ataklarda ise rektal ve sistemik kortikosteroid tedavisi ve immünosupresanlar kullanılmaktadır (3). Buna rağmen bu ilaçların etkinliği inflamasyon ve buna bağlı komplikasyonların azaltılması ile sınırlıdır (4). Bunun yanında bu ilaçların düzenli alınması gastrik ülser, Cushing sendromu, hiperglisemi, kas zayıflığı, enfeksiyon, yara iyileşmesinde gecikme, katarakt, glokom ve lenfoma gibi yan etkilere neden olmaktadır (4). Yine aynı çalışma bazı ilaçlar ile ciddi düzeyde morbidite oranının arttığı ve hayat kalitesinin düştüğü de gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda anti-TNF- $\alpha$ , anti- $\alpha$ -4 integrin, PPAR $\gamma$  ligandı ve probiyotik tedavileri kullanılmaktadır (5,6). Ancak infliximab, adalimumab ve certolizumab gibi ilaçların enfeksiyon ve malignite riskini arttırdığı, özellikle non-hodgkin lenfomaya neden olabileceği ileri sürülmüştür (7-9). Kalp rahatsızlıkları ve akut enfeksiyon atakları da bu ilaçların potansiyel yan etkileri arasında bulunmuştur. Yayınlanan raporlar İBH hastalarının %40'nın alternatif tedaviye yöneldiğini

göstermektedir (10). Bu nedenle günümüzde halen İBH'nin patogenezi ve potansiyel tedaviler ile ilgili tartışmalar sürmekte ve yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2.4 Deneysel Kolit Modelleri**

İBH mekanizmalarının araştırılması ve potansiyel terapötik ajanların bulunması için hayvan çalışmaları büyük önem taşımaktadır (112). İBH modellerinin büyük bir kısmını indüklenme modelleri oluşturmaktadır. Epitel bütünlüğünün bozulmasına yardımcı kimyasalların kolitojenik maddeler ile uygulanması sonucu gerçekleştirilmektedir. Epitel hasarın oluşması ile kolitojenik maddeler mukozaya geçmekte ve inflamasyon yanıtına neden olmaktadır. Bu durum insanlarda görülen İBH'deki karakteristik durum ile benzerlik göstermektedir. Bu amaç ile TNBS, DNBS, DSS, oksazolon gibi çeşitli deneysel ajanlar inflamasyon indükleyici olarak kullanılmaktadır.

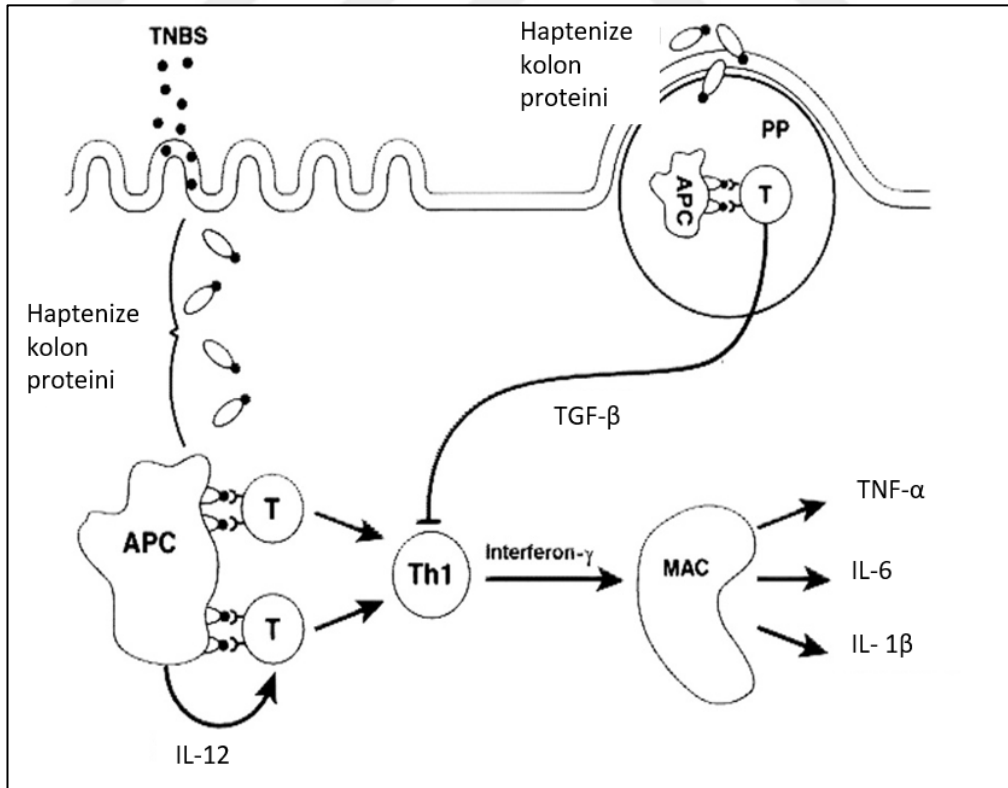
1989 yılında Morris ve arkadaşlarının TNBS ile indüklenmiş kolit modelini tanımlaması ile Th1 aracılı modellerin araştırılmasında önemli bir yöntem olmuştur (113). TNBS ile oluşturulan hayvan modellerinin İBH semptomlarının ve potansiyel tedavinin araştırılması için güvenilir ve efektif modellerden biri olduğu gösterilmiştir (114). Etkisini Th1 aracılı immün yanıt ile gerçekleştirmesi ve kilo kaybı, diyare ve rektal kanama komplikasyonları ile klinik olarak görülen Crohn hastalığını taklit etmektedir (115). Bunun yanında tekrarlanabilir, basit ve kolay ulaşılabilir olması ile de avantajlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (116).

### **2.4.1 TNBS kolit etki mekanizması**

Çalışmalarda kolit oluşturmak amacıyla TNBS, bağırsak bütünlüğünün bozulması ve etkileşimin sağlanması için etanol ile verilmektedir. Etanol bariyer bütünlüğünü bozması ve TNBS'e uygun bir ortam hazırlaması nedeniyle elzem bir maddedir (117). Bu uygulama Th1 aracılı aşırı bir immün yanıtı neden olmaktadır (118) Th1 aracılı inflamasyonun genel özellikleri yardımcı T hücreleri tarafından oluşturulan infiltrasyon ve çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını içermektedir. Yapılan

araştırmalar sonucunda ancak günümüzde farklı sitokinlerin etkisinin olduğu göstermektedir (119,120).

TNBS etkisini sıralı etkin bir yol ile başlatmaktadır. Etanol ile birlikte TNBS intrarektal olarak verilir. Mukozada bulunan aminoasitler ve bakteriyel proteinler immünojenik hale gelir, haptenezasyona hazırlanır. Daha sonra etanolün mukoza hasarı sonrası TNBS mukozadan geçer. Burada bulunan büyük yapıdaki taşıyıcı proteinlere hapten olarak bağlanır, haptenezasyonu gerçekleştirir. Hapteneze olmuş proteinler antijen sunan hücreler (APC) tarafından algılanarak T hücrelerine tanıtılır. Buna bağlı olarak IL-12 ekspresyonunda aşırı artışa ve sonrasında aşırı Th1 uyarısına neden olur. Aşırı uyarılmış Th1 ise, özellikle interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ile makrofajları uyararak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokinlerin üretimini arttırır, inflamasyon süreci başlatır. (121). Süreç Şekil 2’de gösterilmektedir. Bu inflamatuvar süreç histolojik ve immünolojik seviyede insanda görülen İBH’ye benzerlik göstermektedir (122).



Şekil 2: TNBS Etki Mekanizması (121)

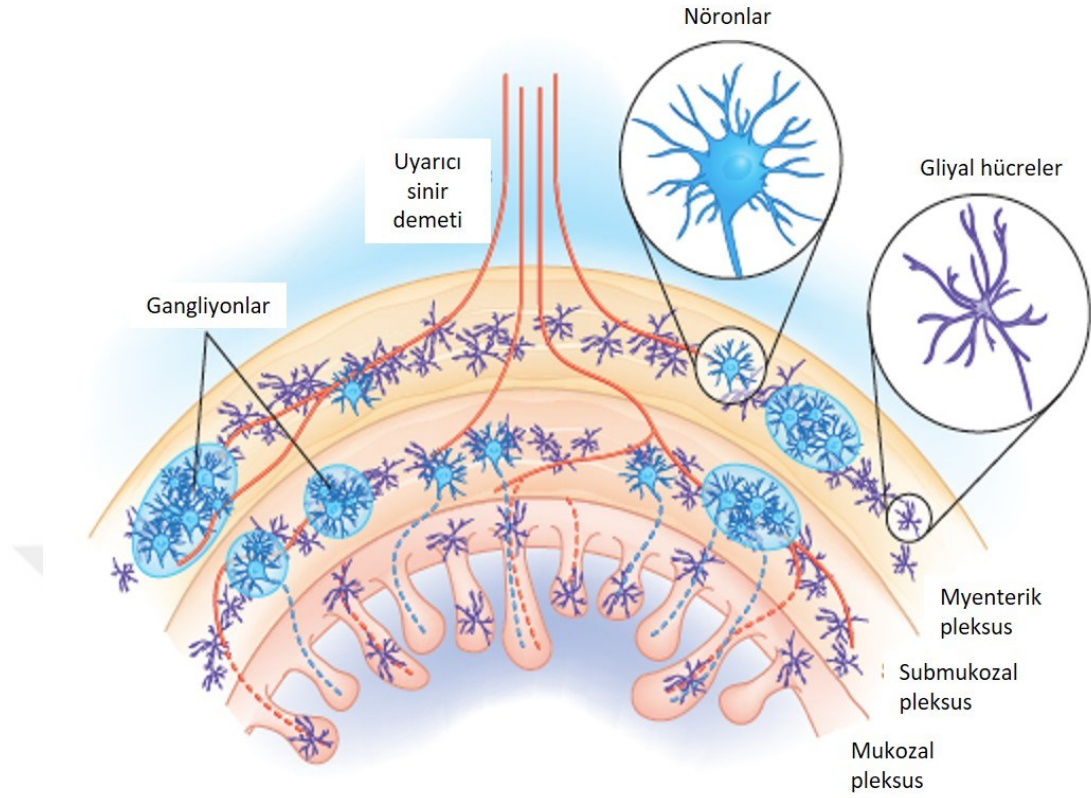
## 2.4.2 TNBS ile indüklenmiş kronik kolit modeli

Kimyasal olarak indüklenen kolit modellerinde akut TNBS modeli sıklıkla kullanılmaktadır. Model hızlı, tekrarlanabilir ve etkin olması nedeniyle uygulanmasına rağmen, insanlarda görülen İBH'nin patogenezinin açıklamasında yetersiz kalmaktadır. Yapılan araştırmalar akut olarak hasar görmüş epitel bariyerin lokalize inflamasyonunun, kronik bir hastalığı taklit etmekte yetersiz kaldığını göstermektedir (123,124). Ancak, akut ataklar, yara iyileşmesi ve akut inflamasyonun araştırılmasında önemli bir yöntem olabileceği gösterilmiştir (124). Bu nedenle, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının mekanizmasının araştırılması ve potansiyel terapötik ajanların keşfi için kronik kolit modellerinin kullanılması önem taşımaktadır.

TNBS ile indüklenmiş kronik kolit modeli dirençli lamina propriya fibrozisi ile karakterizedir (112). Bu durum kronik inflamasyona bağlı salgılanan çeşitli mediyatörlerin mezenkimal hücreleri aktive ederek doku fibrozis ve steanosis gelişimi ile karakterize olan insan Crohn hastalığında da görülmektedir (125). Bu nedenle TNBS ile indüklenen kronik kolit modelinin insan İBH'nda görülen intestinal fibrozisin potansiyel mekanizmasını araştırmada etkin bir yöntem olabileceğini göstermektedir (123). Histolojik ve immünolojik olarak insan Crohn hastalığının karakteristik özelliklerini yansıtması ile kronik TNBS modeli etkin bir araştırma yöntemi olarak bulunmuştur (112).

## 2.5 Enterik Sinir Sistemi

Gastrointestinal kanal, özefagustan anüse kadar enterik sinir sistemi denen bir sinir sistemine sahiptir (126). Yaklaşık olarak içerdiği 100 milyon nöron ile omurilikten daha fazla nöron sayısına sahiptir (127). Beyinden bağımsız olarak da çalışabilen bu yapı, sindirim sisteminin intrensik kontrolünü sağlamaktadır (128). Yapılan araştırmalarda gastrointestinal sistemin kanal duvarında duysal sinir almaçları bulunduğu ve bu almaçların bağırsak içinde lokal reflekslere neden olduğu bulunmuştur (129). Bu durumun bulunması gastrointestinal sistemin beyinden nasıl bağımsız olarak çalıştığını ve intrensik bir kontrol ağı olduğunu göstermiştir



Şekil 3: Enterik Sinir Sistemi Organizasyon Yapısı (131)

Enterik sinir sisteminde (ESS) nöron-hücre gövdeleri gruplar halinde küçük gangliyonlar içinde toplanmıştır (23,130). Bu gruplaşma ise kanal duvarında Myenterik (Auerbach) ve submukozal (Meissner) pleksus olmak üzere iki farklı yüzeyel sinir ağı yapılanmasını oluşturmaktadır. Myenterik pleksus longitudinal ve sirküler kas tabakası arasında bulunmakta, bu kas tabakalarını innerve ederek motiliteyi kontrol etmektedir. Submukozal pleksus ise mukozal ve sirküler kas tabakası arasında bulunmakta, daha çok gastrointestinal salgıları ve lokal kan akımının kontrolünde etkinlik göstermektedir. Şekil 3 gastrointestinal sistemin inervasyonunu göstermektedir (131). Pleksus yapısında afferent nöron, ara nöron ve motor nöron olmak üzere üç tip nöron bulunmaktadır. Bu nöronlar pleksus yapıları arasında sinaptik bağlantılar kurarak myenterik pleksus ve submukozal pleksus arasında bağlantının oluşmasını da sağlamaktadır. Bunun yanında enterik nöronların çevresini saran ve destekleyen enterik gliya hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler merkezi sinir sisteminde astrositlere morfolojik ve fonksiyonel olarak benzer işlev görmektedir, enterik nöron fonksiyonunu düzenleyebilmektedir (130). Aynı zamanda enterik nöronlar

mukozaal immün sistem ve intestinal epitel hücreleri ile de yakın ilişkilere sahiptir. Müsin üretimi, sitokin ekspresyonunun kontrolü, bariyer bütünlüğünün kontrolü gibi fonksiyonları da bu ilişkiler ile desteklemektedir (132). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında bozulan bu yapısal işlevler üzerinde enterik sinir sistemi etkisinin görülmesi enterik nöroinflamasyonun araştırılması için yeni bir alan açmıştır.

### 2.5.1 Enterik sinir sistemi ve İBH

Hayvanlarla ve insanlarla yapılan çalışmalarda, İBH modellemelerinde enterik sinir sistemi hücrelerinde hiperatrofi, hiperplazi ve sinir liflerinde aksonal hasar, gliyal hücrelerde hiperplazi ve sayısal artış, yapısal morfoloji değişimi görülmüştür (24-26). 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada ise inflamasyona bağlı enterik nöronlarda oluşan anormalliklerin bağırsak yapısında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (27). Epitel sekresyonunun nöral kontrolünde bozulma, enterik nöronlarda artan uyarılabilirlik ve sinaptik iletide değişimler başlıca nöral değişimler olarak aynı çalışmada gruplanmıştır. 2005 yılında Linden ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada TNBS ile indüklenmiş akut kolit modelinde inflamasyonun başlangıcında enterik nöron sayısında %20'lik azalma görüldüğü gösterilmiştir (25). Bu azalmanın ise hücre ölümüne bağlı nötrofil infiltrasyonu ile inflamatuvar süreci başlattığı bildirilmiştir. Bu nedenle enterik sinir sistemindeki anormalitenin İBH ile salınan moleküller ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Oluşan bu değişimlerin bağırsağın inflame kısmı dışındaki kısımlarda da görülmesi İBH'de enterik sinir sisteminin patolojik rolü üzerine hipotezler ortaya çıkarmıştır (133). Ohlsson ve ark. tarafından yapılan çalışma ile bu hipotez desteklenmiş, Crohn hastalarının iltihaplanmamış ince bağırsaklarında dejenerasyon, hiperatrofi, gliya hücrelerinde hiperplazi gösterilmiştir (134). Schneider ve ark. ise Crohn hastalarının iltihaplanmamış dokularında yapılan immünohistokimya çalışmasında vazoaaktif intestinal peptit salgılamında artış, yaygın kolin asetiltransferaz ve nitrik oksit sentaz lokalizasyonu, kalsitonin gen ilişkili peptit lifleri üzerinde hiperatrofi gözlemlenmiştir (135). Bu sonuçlar ile Crohn hastalarında enterik sinir sisteminin oluşan değişiklikler ve adaptif cevabı desteklenmiştir.

Enterik gliya hücreleri ESS'de en belirgin hücresel yapıyı oluşturmaktadır ve mukozal yapının bütünlüğü ve sağlığı üzerinde faydalarının olduğu gösterilmiştir (28). Fenotip olarak merkezi sinir sisteminde bulunan astrositlere benzemektedir (29). Myenterik pleksus ve submukozal pleksusta enterik nöronları çevrelemesinin yanında kan damarları ve lenfatik sistemle de ilişkilidir (30). Olgun gliya hücreleri ara filament proteininden (GFAP) zengindir ve İBH gibi inflamasyon durumunda ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (31,32). Bunun yanında gastrointestinal sistemde kalsiyum bağlayıcı protein S100 ailesinden gliya hücrelerinde eksprese olan tek protein S100B'dir ve son bulgular ekspresyonda artışın intestinal inflamasyon derecesini belirlemede önemli bir etken olduğunu göstermektedir (33,34).

Enterik gliya hücreleri intestinal bağırsak bariyer fonksiyonunu, özellikle geçirgenliği, sıkı bağlantı proteinlerinden zonulin-1 ve okludin ekspresyonunun artışını düzenleyerek ve S-nitrosoglutasyon salınımını arttırarak kontrol etmektedir (35). Yapılan çeşitli çalışmalar ile homeostasisin kontrolünde gliya hücrelerinin elzem bir rolü olduğu gösterilmiştir (36,37). 2012 yılında yapılan çalışmada ise uygulanan anitprotozoal ilaç sonrasında farelerde indüklenmiş kolit modelinde GFAP ve S100B ekspresyonunda ve mukozal inflamasyonda belirgin bir azalma gösterilmiş, ilacın anti-inflamatuvar etkisinin gliya hücrelerini hedefleyerek gerçekleştiği bulunmuştur (38). Son bulgular ise enterik gliya hücrelerinin intestinal bütünlük ve inflamasyona karşı nöron koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (136,137).

### **2.5.2 Enterik sinir sistemi ve mikrobiyota**

Gastrointestinal sistemde yaşamın ilk yıllarından itibaren çeşitli mikroorganizmalar kolonize olmaktadır. Farklı bakterilerin sayılarındaki değişimler sindirim, vitamin sentezi, epitel ve bariyer bütünlüğünün korunması, immün sistem hücrelerinin olgunlaşması gibi faktörlerde önemli bir etkiye sahiptir. Çeşitli çalışmalar gastrointestinal sistemde kolonize olmuş mikroorganizmaların enterik sinir sisteminde de etkinliğinin olduğunu göstermektedir. Enterik duysal nöronların uyarılabilirliğinin artması ve ince bağırsak motilitesinin azalması gibi etkilerinin olduğu bulunmuştur (138,139). Aynı zamanda steril ortamda büyüyen "germ free" hayvan deneylerinde

anormal myenterik pleksus gelişimi gözlenmiştir (40). 2014 yılında Collins ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada steril farelerin doğum sonrası gangliyon başına nöron oranında azalma ve azalmış nöron yoğunluğu belirlenmiştir (39). Aynı çalışmada bağırsak motilitesinde belirgin azalma da gösterilmiştir. Gliya hücrelerinin homeostatik denge işlevinde bozulmalar olduğu, mikrobiyotanın yeniden düzenlenmesi ile bu işlevde iyileşmeler gözlemlendiği bildirilmiştir (140). 2018 yılında Vadder ve ark. ise enterik sinir sisteminin olgunlaşması için mikrobiyota varlığının önemine dikkat çekmiştir (141). Müller ve ark. ise antibiyotik ile mikrobiyotada disbiyosis yaratılan farelerde belirgin motilite bozukluğu gözlemiştir (142). Aynı zamanda enterik nöron-musküler makrofaj dengesini gösteren Koloni uyarıcı faktör-1 (CSF-1) ve Kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) seviyelerinde azalma bulunmuştur. Bu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar, enterik sinir sistemi gelişiminde mikrobiyotanın önemini ortaya koymaktadır.

## 2.6 *Akkermansia Muciniphila*

*A. muciniphila* ilk kez 2004 yılında Derrien ve ark. tarafından sağlıklı bireylerin fekal örneklerinden izole edilmiş probiyotik bir bakteridir (11). Verrukomikrobia familyasına ait anaerobik, spor oluşturmeyen, oval şekilli gram negatif bir bakteridir. Gastrointestinal sistemde kayganlık ve koruyucu etkinlik gösteren mukus tabakasının yapısında önemli bir bileşen olan müsinin degrade ederek farklı etkinlikler göstermektedir. Sahip olduğu enzimler ile başlattığı degradasyon sonucunda fruktoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, siyalik asit, sülfat, disakkarit ve küçük oligosakkaritler açığa çıkarmaktadır (143,144). Bu açığa çıkan metabolitler ile mikrobiyotanın ihtiyaçları karşılanmaktadır. Ek olarak *A. muciniphila* asetat, bütirat ve propiyonat başta olmak üzere kısa zincirli yağ asitlerinin üretiminde görev almaktadır. Üretilen kısa zincirli yağ asitleri epitel hücrelere yakın olarak konakçı kullanımına uygun durumdadır (145). Kısa zincirli yağ asitleri daha sonra G protein eşli reseptör 41 ve 43 yardımıyla konakçıyı uyarmakta ve gerekli durumlarda immün stimülasyonu sağlamaktadır (146).

Yapılan çalışmalarda *A. muciniphila*'nın sağlıklı olma durumu ile ilişkili olduğu, farklı hastalıklar ile negatif korele olarak gözlenmiştir. Akut pankreatit teşhisi almış hastalarda bakteri popülasyonunun negatif korelasyona sahip olarak bulunmuştur (147). Bunun yanında insan ve hayvan deneylerinde vücut ağırlığı ve tip 1 diyabet ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genetik olarak obez olan farelerde probiyotik tedavisi ile *A. muciniphila* seviyelerinde 80 kat artış olduğu, kilo kaybında önemli bir etmen olarak gösterildiği bulunmuştur (148). 2011 yılında Wang ve ark. ise otizm modelinde *A. muciniphila*'nın belirgin bir şekilde kontrol grubuna göre azaldığını göstermiştir (149).

### 2.6.1 İnflamatuvar bağırsak hastalıkları ve *A. muciniphila*

*A. muciniphila*'nın gösterilen anti-inflamatuvar etkinliklerinin değerlendirilmesi için son yıllarda inflamatuvar hastalıkların modellemelerinde çalışılmaktadır. İnsan çalışmalarında Ülseratif kolit ve Crohn hastalığında sağlıklı gruba göre belirgin bir azalma gözlenmiştir (149-151). Bunun yanında fekal transplantasyon sonrası *A. muciniphila* popülasyonunda yine belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir (152). Deneysel modellerde ise insan çalışmalarını destekler nitelikte *A. muciniphila* popülasyonunda hastalık sonrası belirgin bir azalma gözlemlenmiştir (153-156). Bunun yanında tedavi olarak *A. muciniphila* uygulanması sonucu makrofaj infiltrasyonunda ve sitotoksik T lenfositlerde belirgin bir azalma olduğu, buna bağlı DSS kolit modelinde iyileşme gözlemlendiği bulunmuştur (157). 2019 yılında Bian ve ark. ise DSS ile indüklenmiş ülseratif kolit modelinde *A. muciniphila* uygulamasının bağırsak bariyer bütünlüğünü koruduğunu, inflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı ve mikrobiyota çeşitliliğini düzenlediğini göstermektedir (158). *A. muciniphila* etkinlik mekanizmasının artan kısa zincirli yağ asitleri üretimine bağlı G protein eşli reseptör 41 ve 43'e bağlanarak kolonda Foxp3+ T regülatör hücreleri arttırdığı, immün cevabı düzenleyerek inflamatuvar bağırsak hastalıklarında rahatlamaya neden olduğu gösterilmiştir (159-161).

Bu çalışmaların yanında İBH'de *A. muciniphila*'nın arttığını gösteren araştırmalar da bulunmaktadır. 2017 yılında Seregin ve ark., yayınladığı çalışmada *A. muciniphila* tedavisi sonrası kolit hasarında artış olduğu gösterilmiştir (162). 2013 yılında Ganesh

ve ark. ise kolit modelinde *A. muciniphila* ile hasarın arttığı, uygulamanın durdurulması ile iyileşme parametrelerinde gelişme olduğunu raporlamıştır (163). Çalışmalar arasında pozitif ve negatif korelasyon farklarının gözlenmesinin nedeni bakteri türü arasındaki farklılardan kaynaklandığı düşünülmektedir. 2017 yılında Guo ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada genomik çeşitliliğe sahip farklı alt türdeki *A. muciniphila*'nın farklı fonksiyonları olabileceğini gösterilmektedir (164). Bunun yanında insan fekal örneklerinden elde edilmiş *A. muciniphila* ATCC BAA-835T ve fare örneklerinden elde edilmiş *A. muciniphila* 139 arasında anti-inflamatuvar etkinlik farkı olduğu bulunmuştur (161).

Bu bilgilerin ışığında ve yapılan araştırmalar göz önüne alınarak kronik kolite bağlı inflamasyonda ve kolite bağlı nöron dejenerasyonunda *A. muciniphila*'nın yararlı etkisinin in vivo ve in vitro düzeyde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyle *in vivo* ve *in vitro* olarak üç hedef doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

**1. Hedef:** TNBS ile kronik kolit modeli oluşturulan farelerde *A. muciniphila* 'nın tedavi edici etkisinin gösterilmesi için;

- Farelerde TNBS ile kronik kolit indüklenmiş,
- Seçici besiyerleri kullanılarak *A. muciniphila* üretilmiş ve tedavi olarak kullanılacak stoklar elde edilmiş,
- Elde edilen *A. muciniphila* stokları belirli miktarlarda tedavi olarak uygulanmış,
- Makroskopik, mikroskopik, biyokimyasal ölçümlerle kolitle gelişen hasar değerlendirilmiş,
- NFκB yolağı aktivasyonu incelenmiş,
- Bağırsak geçirgenliği ve kolit ile oluşan mikrobiyota değişimi değerlendirilmiştir.

**2. Hedef:** *In vivo* düzeyde kolite bağlı ESS dejenerasyonunun varlığının ve *A. muciniphila*'nın dejenerasyonda tedavi edici etkisinin gösterilmesi için;

- Farelerde oluşturulmuş kronik kolit modelinde *A. muciniphila* tedavisi ile ESS için hasar göstergesi proteinlerin ekspresyonu değerlendirilmiş,
- Enterik nöron ve gliyalarda sayısal ve morfolojik inceleme yapılarak immünofloresan mikroskopi düzeyde hasar değerlendirilmesi yapılmış,
- Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile nöron morfolojik yapısı değerlendirilmiştir.

**3. Hedef:** *In vitro* düzeyde kolite bağlı ESS dejenerasyonunun gösterilmesi ve *A. muciniphila* 'nın tedavi edici etkisinin gösterilmesi için;

- Enterik nöron ve gliya hücreleri farelerden myenterik plexus izole edilerek kültür ortamında çoğaltılmış,
- Sitokin kokteyli ve LPS uygulanarak hücre hasarı oluşturulmuş,

- *A. muciniphila* ekstraselüler vezikülleri elde edilerek kültürdeki hücrelere uygulanmış,
- Hasar ile ilişkili parametrelerdeki değişim mikroskopik olarak ölçülerek terapötik etkinliği değerlendirilmiştir.

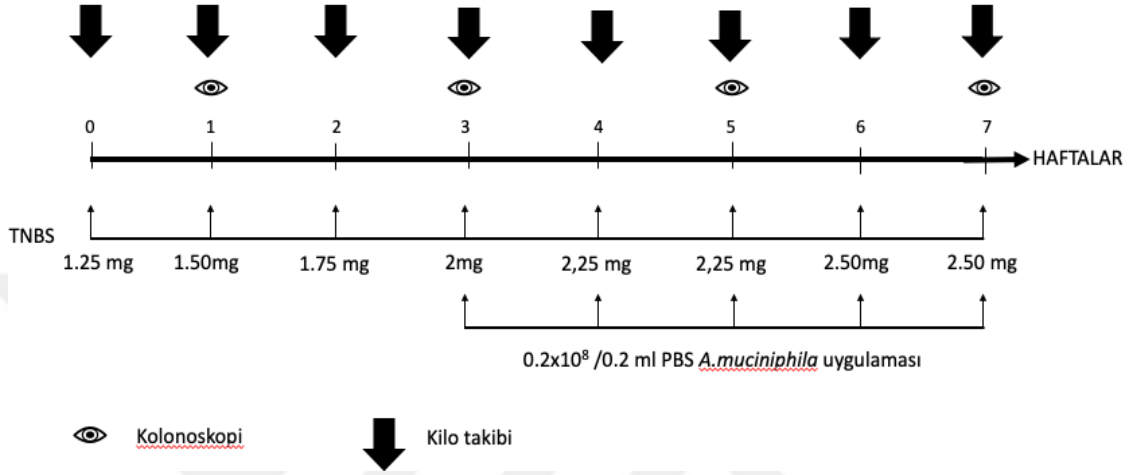
### 3.1 Hayvanlar

Çalışmada 8-12 haftalık, n=12 /grup olmak üzere, eşit sayıda erkek ve dişi BALB/c fareler kullanılmış, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sabit nem ve sıcaklık koşullarında tutulmuştur. Fareler standart yem ile beslenmiş ve suya serbest ulaşabilir şekilde barınmışlardır. *In vivo* için toplam 36 fare kullanmış olup,  $\alpha$  hata değeri 0.5, kuvvet olarak 0.85 hesaplanarak güç analizi değerlendirilmesi sonucu bu sayıya ulaşılmıştır. Hayvanlar düzenli olarak her gün takip edilmiş, temizlik ve vücut ağırlığı değerlendirilmesi yapılmıştır. Yapılmış olan tüm hayvan deneyleri Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (ACU-HADYEK 2019/28) (EK1)

### 3.2 Kronik Kolit Modelinin Oluşturulması

Kronik kolit modelinin oluşturulması için Fichtner Fiegl vd. 2007 yılında uyguladığı protokol kullanılmıştır (123). BALB/c farelere 7 hafta boyunca 16-18 saat gece açlığı sonrasında artan dozlarda intrarektal TNBS uygulanarak kronik kolit modeli oluşturulmuştur. Hafif izofloran anestezi altında %45-50 etanolde çözülmüş TNBS, artan dozlarda (1.25-2.50 mg) 7 hafta boyunca uygulanmıştır. (Şekil 1) Vazelin ile yeterince kayganlaştırılan bir kateter aracılığıyla 4cm kolon içerisine intrarektal olarak yavaş bir şekilde verilmiştir. İşlem sırasında fareler Tredelenburg 19 pozisyonunda rektumu yukarıda kalacak şekilde 30 saniye tutularak verilen çözeltinin dışarı çıkması minimize edilmiştir. Kontrol grubuna ise TNBS yerine intrarektal fizyolojik tuzlu su (SF) uygulanmıştır. Tedavi grubuna 3. haftadan başlayarak, deney sonu olarak belirlenen 7. Haftanın sonuna kadar bakteri süspansiyonu günlük olarak oral gavaj yolu ile verilmiştir. Kontrol ve Kolit gruplarına ise bakteri süspansiyonu yerine yine oral gavaj yolu ile fosfat tamponlu çözelti (PBS) verilmiştir. Deney süresi

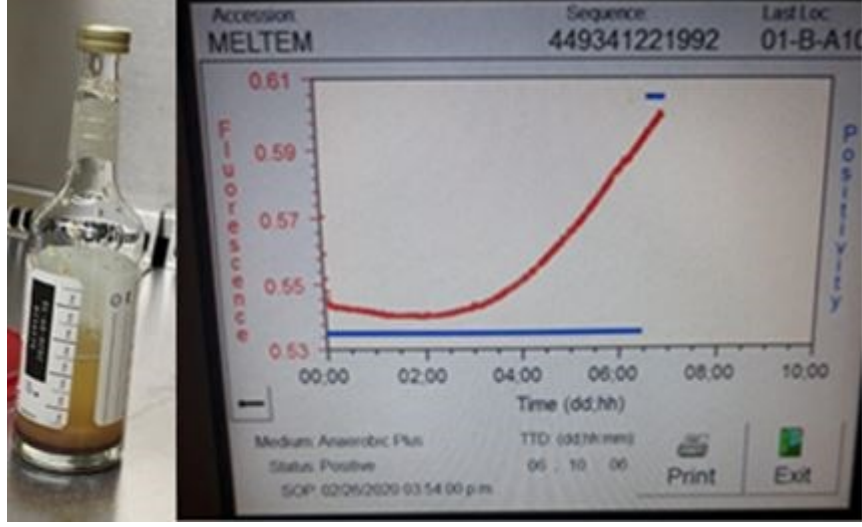
boyunca günlük besin ve sıvı tüketimi izlenmiş, diyare durumu ve haftalık kilo takibi yapılmıştır. 7. haftanın sonunda hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek kolon dokusu, kan ve fekal örnekleri toplanmıştır. Deney protokolü Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4: Deney Protokolü

### 3.3 *A. muciniphila*'nın Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Tedavi için Kullanıma Hazırlanması

*A. muciniphila* Derrien et al. (ATCC® BAA-835™) bakteri kökeni, Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edilmiştir. Liyofilize halde temin edilen bakteri anaerobik biyogüvenlik kabin içerisinde açılmış ve tiyoglikolat sıvı besiyeri (Merck-milipore) içerisinde sulandırılmıştır. Daha sonra BD BACTEC Plus Anerobic/F kültür şişesine ve %5 koyun kanlı Columbia besiyerine (Becton, Dickinson and Company, USA) ekilmiştir. Kan kültür şişesi BD BACTEC™ kan kültürü sistemi içerisinde konmuş ve üreme grafiği cihazın sinyali eşliğinde takip edilmiştir (Resim 1).

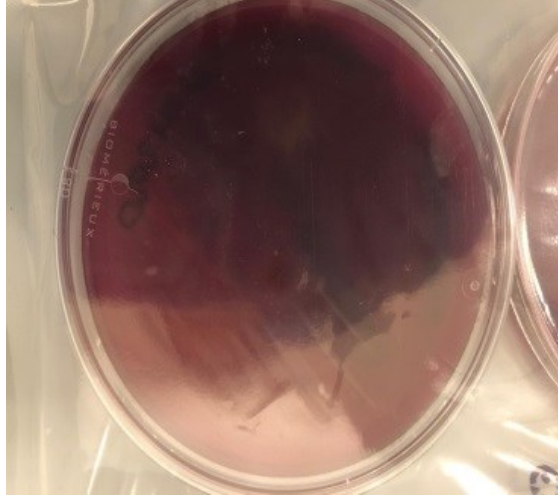


Resim 1: Anaerobik kan kültürü şişesi ve sistemindeki üreme eğrisi

%5 koyun kanlı Columbia besiyerine (Becton, Dickinson and Company, USA) ekilen örnek ise BD GasPak™ EZ pouch sistemi içerisine yerleştirilmiş ve 37 °C, CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Becton, Dickinson and Company, USA) koloniler gözlemlenene kadar inkübe edilmiştir (Resim 2, Resim 3). Bakterilerin ürediğinin doğrulanması MALDI-TOFF cihazında yüksek skor eldesi sağlanarak yapılmıştır.



Resim 2: %5 koyun kanlı Columbia besiyeri ve BD GasPak™ EZ pouch sistem



Resim 3: *A. muciniphila* kolonileri

Üreme sonrasında elde edilen bakterilerden literatürde yapılan çalışma örnek alınarak tedavi dozuna uygun olacak şekilde sulandırılmalar steril anaerobik (degaze) fosfat tampon tuz çözeltisi ile yapılmıştır (13, 164). 0.5 Mcf standardı kullanılarak hazırlanan bakteri süspansiyonu daha sonra steril anaerobik fosfat tampon tuz çözeltisi ile seyreltilerek,  $0.2 \times 10^8$  CFU/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Belirlenen bu tedavi dozunda her gün için, 2ml'lik vida kapaklı tüplerde hazırlanmış ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### 3.4 Makroskopik Hasar Değerlendirmesi

Makroskopik hasar, deney boyunca kolonoskopi aracılı kolon içi görüntüleme, hastalık indeksi ve fekal skor hesaplaması yapılarak değerlendirilmiştir. Deney sonunda ise ıslak doku indeksi hesaplanmıştır.

#### 3.4.1 Kolon içi görüntüleme

Kronik kolit oluşturulmuş Kolit ve Tedavi gruplarında 1, 3, 5 ve 7. haftalarda Hopkins teleskopi (Karl Storz Endoskope, Germany) kullanılarak kolon içi makroskopik olarak incelenmiştir. Değerlendirme Wirtz ve ark. tarafından yayınlanan çalışma doğrultusunda yapılmıştır (124). Hiperemi varlığı, kanama, ülserasyon değerlendirmeleri ile skora yapılmıştır.



Resim 4: Kolonoskopi Optiği ve Görüntüleme Sistemi

### 3.4.2 Hastalık indeksi ve fekal skorlama

Farelerde 3, 5 ve 7. Haftalarda dışkı kıvamı, dışkıda kanamanın varlığı, bağırsakta yapışıklık kriterlerine göre incelenerek hastalık indeksi hesaplanmıştır. Fekal skorlama ile periyodik olarak dışkı kıvamı değerlendirilmiştir. Değerlendirme puan tablosu aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Hastalık İndeksi Değerlendirme Tablosu

Skor	Dışkı Kıvamı- Fekal Skor	Dışkıda Kan	Bağırsakta Yapışıklık
0	Normal	Yok	Normal
1	Yumuşak-şekilli	çok az	
2	Yumuşak	Az	Orta
3	çok yumuşak- Islak	Dışkıda Görülebilir	
4	İşhal	Rektal Kanama	Yüksek

### 3.4.3 Islak doku ağırlığı (IDA)

Kolon dokuları çıkarıldıktan sonra ıslak olarak tartılmış, doku ağırlığı gr/100gr ağırlık olacak şekilde indeks olarak hesaplanarak ifade edilmiştir.

## 3.5 Biyokimyasal Ölçümler

Dokuda inflamasyonun değerlendirilmesi için pro-inflamatuvar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve anti-inflamatuvar IL-10 sitokin değerlendirilmesi yapılmıştır. Mukus tabakası ve geçirgenliğin değerlendirilmesi için lipopolisakkarid (LPS) ölçümü yapılmıştır. İnflamasyonun nöronlar üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için CSF-1 düzeyinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Nötrofil infiltrasyonu değerlendirilmesi için Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi değerlendirilmiştir.

### 3.5.1 ELISA analizi

Pro-inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, anti-inflamatuvar sitokin IL-10 seviyeleri ve CSF-1 analizi için deney sonunda toplanan doku örnekleri sıvı azot ile dondurularak -80°C'de saklanmıştır. Maksimandibular arterden periyodik olarak alınan kan örneklerinden serum elde edilmiş, LPS düzeyleri deney süreci tamamlanana kadar -80°C'de saklanmıştır. Deney süreci sonunda ELISA kit yardımıyla üreticinin talimatları doğrultusunda değerlendirilmiştir.

### 3.5.2 Dokuda MPO ölçümü

Toplanan kolon doku örneklerinde MPO aktivitesi, nötrofil infiltrasyonunu gösteren biyokimyasal bir parametredir. Bu amaçla toplanan kolon doku örnekleri %0,5'lik HETAB (Heksadesiltrimetilammonyum bromide) (50mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH:6) ile 10 kez sulandırılarak homojenize edilip, 12.000 rpm'de, 4 °C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletten süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 50 mM potasyum-fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 50 mM potasyum fosfat tamponu +o-dianisidin. 2HCl (20 mg/ml) +

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) + örnek konulmuş ve su banyosunda 37 °C’de 3 dk. süren reaksiyon %2’lik sodyum azid ile durdurulmuştur. Örnekler 5,000 rpm’de 4 C’de 15 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatantlar abzorbanans değerleri 460 nm’de okunmuştur.

### 3.5.3 Protein analizi

İnflamatuvar aktivitenin, enterik nöron ve gliya ekspresyonundaki değişimlerin protein düzeyinde değerlendirilmesi için Western Blot yöntemi kullanılmıştır. Nöron spesifik HuC/HuD, Tubulin III ve enterik gliya hücrelerinden salgılanan spesifik GFAP, S100B ve Sox10 proteinlerinin ekspresyonu değerlendirilmiştir. İnflamatuvar aktivite değerlendirilmesi için NFκB p65 alt ünitesindeki değişimler ölçülmüştür. Kullanılan birincil ve ikincil antikorlar Tablo 2’de verilmiştir. Doku örneklerine RIPA tampon çözeltisi ve proteinaz inhibitörü eklenerek homojenize edildikten sonra Bradford yöntemi ile protein düzeyleri ölçülmüş ve oluşturulan standart eğri protein değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama sonrası %10-12 SDS-PAGE jel üzerinde proteinler yürütülmüş, daha sonra jel üzerindeki proteinler PVDF membrana aktarılmıştır. Spesifik olmayan antikorların bağlanmasını engellemek için %5’lik yağsız süt ile muamele edilen membran gece boyu +4°C’de birincil antikor ile bekletilmiştir. Daha sonra TBS-T ile 3 kez yıkandıktan sonra ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tekrar TBS-T ile yıkanan membranlar ChemiDoc (MP Biosystems, Biorad) kullanılarak karanlık odada değerlendirilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan Birincil ve İkincil Antikorlar

<b>Kullanılan Antikorlar</b>	<b>Marka</b>
Monoclonal anti-mouse Tubulin III	Sigma T8578
Monoclonal anti-mouse HuC/D	Invitrogen A21271
Poly anti-rabbit GFAP	Abcam Ab7260
Mono anti-rabbit S100B	Abcam 52642
Mono anti-rabbit Sox10	Abcam Ab27655
Poly anti-rabbit NFκB	Santa Cruz sc8008
Anti-mouse Alexa Flour 488	Invitrogen A32723
Anti-rabbit Alexa Flour 555	Invitrogen A32732

### 3.6 Mikroskopik Değerlendirme

#### 3.6.1 Hematoksilen-eozin boyama ile inceleme

Dokular formalin ile fikse edildikten sonra yükselen etil alkol serisinden ve saydamlaştırma aşamalarından geçirilmiştir. Parafine gömülen dokulardan kesitler alınmıştır. Alınan kesitler hematoksilen ve eozin (H&E) boyası ile boyanarak ışık mikroskopisi altında değerlendirilmiştir. Kesitler histopatolojik olarak 0 ila 4 arasında skorlanmıştır. Skorlama için Fuss ve ark. tarafından yayınlanan skorlama tablosu kullanılmıştır (166) (Tablo 3).

Tablo 3: Mikroskopik Skorlama Tablosu

Değerlendirme Kriteri	Skor
Lökosit infiltrasyonu hiç yok	0
Az derecede lökosit infiltrasyonu	1
Orta derecede lökosit infiltrasyonu	2
Şiddetli lökosit infiltrasyonu, damarda ve kolon duvarında kalınlaşma	3
Çok ciddi; transmural lökosit infiltrasyonu, goblet hücresi kaybı, damarda ve kolon duvarında kalınlaşma	4

#### 3.6.2 İmmunofloresan yöntem ile inceleme

Dokularda Tubulin III, HuC/D, GFAP, SOX 10, S100B ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla immünohistokimya yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, %4'lük PFA ile fikse edilen dokulara parafin doku takibi yapıldı. Doku takibi sonrası alınan 5 µm'lik kesitler, ksilende 20 dakika bekletildikten sonra azalan konsantrasyonda etanol (%100, %96) serilerinde 10'ar dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitler sitrat tamponunda (0,1 m, pH:6) 200 W'de 20 dakika mikrodalgada ısıtıldı. Oda ısısında soğutulmuş kesitler PBS ile yıkandıktan sonra, %1 BSA içeren PBS-T'de 10 dakika, daha sonra kesitler %5 BSA içeren PBS-T tamponunda 30 dakika bekletildi. Kesitler, anti-GFAP, anti- Tubulin III, anti HuC/D, anti-SOX 10, anti- S100B primer

antikorları (1:200) ile 1 gece +4 °C’de inkübe edildi. Primer antikör uygulaması sonrası kesitler, %1 BSA içeren PBS-T’de 10 dakika bekletildi. Kesitler daha sonra floresan işaretli sekonder antikorda (1:500) 37°C’ de 1 saat bekletildi. Sekonder antikör sonrası %1 BSA içeren PBS-T ile yıkanan kesitlere 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) uygulandıktan sonra kesitler konfokal (Zeiss-LSM 700) mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı. Fotoğraflanan kesitlerdeki myenterik plexuslardaki ışımaya yoğunluğu, bütünleşik ışımaya (integrated density) değeri Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak analiz edildi.

### **3.6.3 Geçirimli elektron mikroskopi ile inceleme**

Kolon doku örnekleri %2,5’luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifi içerisinde 1 gece fikse edildi. Daha sonra örneklerle, %1’lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapıldı. Doku örnekleri, yükselen alkol serilerinden (%50, %70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilerek epon 812’ye gömülen ve 60°C’deki etüvde 1 gece polimerize edilen bloklardan, ultramikrotomda (Leica EM UC7) yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler alındı. Kesitler daha sonra uranil asetat-kurşun sitrat solüsyonları ile kontrastlandı. Kontrastlama sonrası ince kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Thermo Scientific- Talos L120C) ile incelendi.

### **3.6.4 Taramalı elektron mikroskopi ile inceleme**

Kolon doku örnekleri %2,5’luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifi içerisinde fikse edildi. Tamponla yıkamadan sonra, %1’lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapıldı. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyon sonrası 3/1, 1/1 ve 3/3 alkol/amilasetat serilerini takiben saf amilasetata konulan örnekler kritik nokta kurutucusunda kurutulduktan sonra altınla kaplandı ve taramalı elektron mikroskopunda (Thermo Scientific- Quattro SEM) incelendi.

### 3.7 Fekal Mikrobiyota Analizi

Kolite bağlı mikrobiyota değişimi ve tedaviye bağlı popülasyon etkileşimi değerlendirildi. 0, 3, 5 ve 7. haftalarda toplanan taze fekal örnekler üzerinde gen dizilenmesi yapıldı ve biyoinformatik değerlendirilmeler için destek alındı (Epigenetiks Biyoinformatik)

### 3.8 *In vitro* Çalışmalar

#### 3.8.1 Myenterik pleksus izolasyonu

İzolasyon protokolü için 2015 yılında Grundmann vd. tarafından yayınlanan çalışma referans alınmıştır (167). Disekte edilen yenidoğan farelerden (1-3 günlük) elde edilen longitudinal kas tabakasında myenterik pleksus izolasyonu mikroskopi altında geręekleştirilmiştir.

Disekte edilen longitudinal kas yapısı izotonik Hank solüsyonu (HBSS), Penisilin-Streptomisin, Liberaz TH ve DNaz içeren sindirim solüsyonunda 2-2,5 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Süre sonunda diseksiyon mikroskopi altında süspansiyon 35-mm petri kabında arter, mezenterik yapı, sindirilmemiş kas yapısından arındırılarak saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında myenterik pleksus ağları mikroskop altında toplanarak 100g hızda, 3 dakika boyunca santrifüj edildi.

#### 3.8.2 Hücre kültürü

Nörosfer oluşumu için santrifüj sonrasında supernatan uzaklaştırılarak proliferasyon medyası (DMEM/F12 (GIBCO), %10B27 w/ retinoik asit (PAA), %5 penisilin/streptomisin (Applichem), %5 BSA, %0,1  $\beta$ -mercaptoethanol (GIBCO) içinde 1  $\mu$ l/ml EGF ve 2  $\mu$ l/ml FGF (Immunotools) ile inkübasyona bırakılmıştır. Proliferasyon medyası 1, 3 ve 6. günde yenilenmiştir.

Nörosfer oluşumu tamamlandıktan sonra diferansiyasyon basamağı için ekstraselüler matriks (ECM, Sigma Aldrich, 1:100) ile kaplanan mikroskopik lameller 1 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda nörosferler

toplanarak diferansiyasyon medyası içinde (DMEM/F12 (GIBCO), %10 B27 w/ retinoik asit (PAA), %5 penisilin/streptomisin (Applichem), %5 BSA, %0,1β-mercaptoethanol (GIBCO)1 µl/ml GDNF (immunotools) eklenerek ekstraselüler matriks kaplı lamel üzerinde 3-6 gün inkübasyona bırakılmıştır.

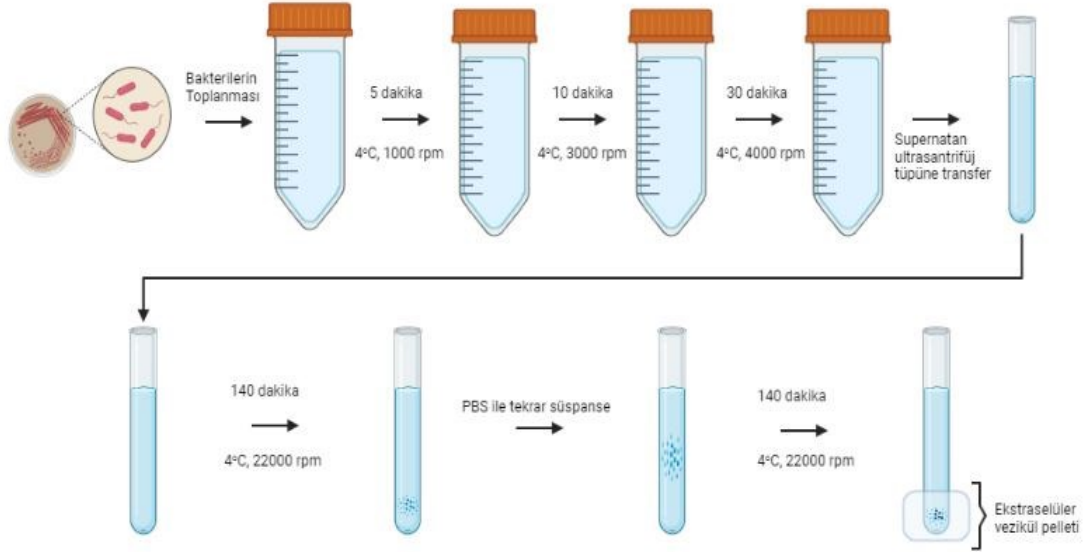
### 3.8.3 TNBS ve sitokin kokteyli uygulaması

*In vitro* hücre hasarlanması için TNBS (Sigma Aldrich, France) ve sitokin kokteyli (Immunotools) kullanılmıştır. TNBS hasarlaması 200 µg/ml olarak uygulanmıştır. Sitokin kokteyli 10 ng/ml IFN-γ (recombinant, human, ImmunoTool, Germany), 10 ng/ml TNF-α (recombinant, human, ImmunoTool, Germany) ve 5 ng/ml IL-1β (recombinant, human, ImmunoTool, Germany) ile hazırlanmıştır (Schreiber vd., 2017). Nörosferler hazırlanan TNBS ve sitokin kokteyli ile 24 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda PBS ile yıkayıp %4 formaldehit ile fikse edilerek immünofloresan boyamaya hazırlanmıştır.

### 3.8.4 *A. muciniphila* veziküllerinin elde edilmesi ve karakterizasyonu

Toplanan bakterilerden ekstraselüler veziküllerin elde edilmesi için değişen hızlarda ultrasantrifüj tekniği uygulanmıştır. Değişen hızlarda ve sürelerde santrifüj edilen bakteri süspansiyonu protokolü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 5). Elde edilen veziküllerin değerlendirilmesi ve karakterizasyonu için SDS-PAGE ve TEM kullanılmıştır.

## SANTRİFÜJ



## ULTRASANTRİFÜJ

Şekil 5: Ultrasantrifüj ile Vezikül Elde Edilme Aşamaları

SDS-PAGE için öncelikle veziküller RIPA ile muamele edilmiş, vezikül yoğunluğu protein konsantrasyonu üzerinden değerlendirilmiştir. Protein yoğunluğu değerlendirilmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyon hesaplaması sonrasında %10 yoğunlukta SDS-PAGE üzerinde yürütülerek gece boyu Coomassie mavisi ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün boyanan jel görüntüsü ChemiDoc (MP Biosystems, Biorad) kullanılarak karanlık odada değerlendirilmiştir.

*A. muciniphila* kaynaklı vezikülleri içeren örnekler, 2,5 saat boyunca PBS (0.1 M, pH 7.2) içinde hazırlanmış %2,5 glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Bir damla glutaraldehit ile muamele edilmiş vezikül süspansiyonu, 10 dakika boyunca karbon kaplı grid üzerine yerleştirilmiştir. Kalan çözelti, bir filtre kâğıdı ile emildi ve grid, negatif boyama işlemi yapılarak (gridler %2'lik uranil asetat solusyonu içerisinde 5 dakika bekletildi) boyanmıştır. Daha sonra SEM (Thermo Fisher Scientific- Talos L120C) ile örneklerin morfolojisi ve boyutları incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### **3.9 Differansiye olan Nörosferlerin İmmunofloresan Boyanması**

Fikse edilen nörosferler 10 dakika boyunca %0,5 Triton (Serva) ve sonrasında %10 normal eşek serumu (NDS, Sigma Aldrich), ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında birincil antikorlar (Tubulin III, HuC/D ve S100B, Sox10, GFAP ile hasar göstergesi için iNOS) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda üç defa steril PBS ile yıkanarak ikincil antikorlar ile (Alexa Flour 488 veya Alexa Flour 555) 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra steril su ile yıkanan lamellerde hücre çekirdeği DAPI ile işaretlenmiştir. Görüntüler Axionvision 4.8 uygulaması kullanılarak Cell Observer Z1 (Zeiss) ile değerlendirilmiştir.

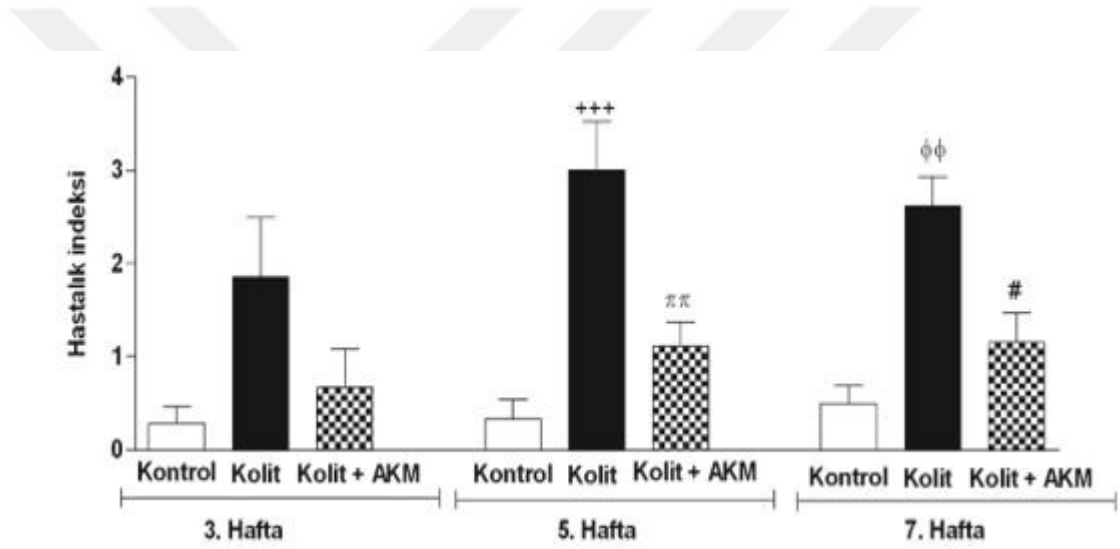
### **3.10 İstatistiksel Analiz**

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi Graphpad Prism 5.1 programı ile yapılmıştır. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arası fark tek yönlü ANOVA ve Tukey-Kramer testleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için  $P < 0.05$  kullanıldı. Makroskopik verilerin istatistiksel olarak değerlendirmek için tek yönlü ANOVA ve Tukey-Kramer testi kullanıldı.

## 4 BULGULAR

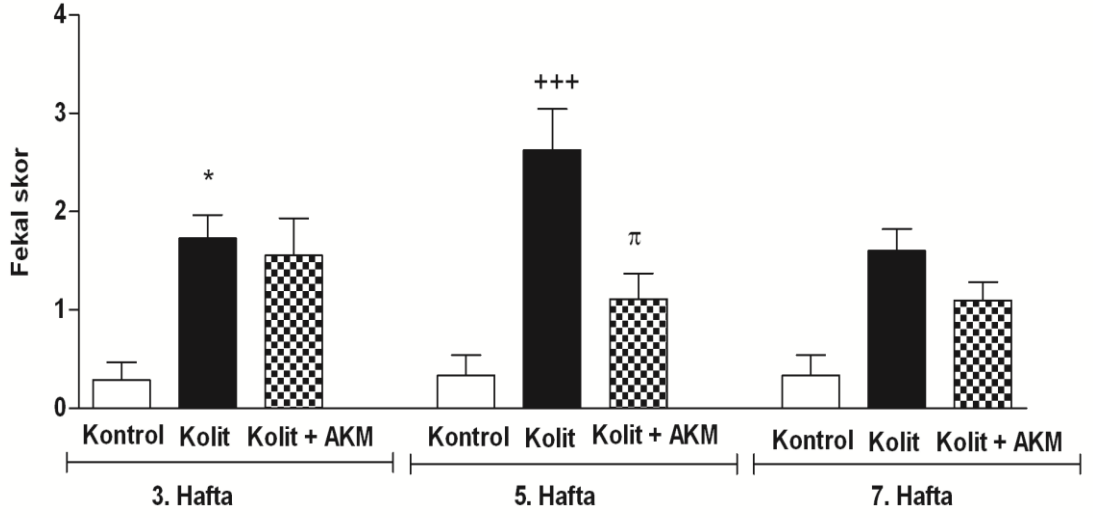
### 4.1 Makroskopik Bulguların Değerlendirilmesi

7 haftalık TNBS ile indüklenen kronik kolitin 3., 5. ve 7. Haftada periyodik olarak değerlendirilen hastalık skor indeksi üzerine etkisi incelenmiştir. Hastalık indeksi değerlendirildiğinde TNBS uygulamasının 5 ve 7. haftalarda anlamlı şekilde hastalık indeksinde artışa neden olduğu ( $P<0.001$  ve  $P<0.01$ ), tedavi ile hastalık indeksinde kolit grubuna göre yine anlamlı bir şekilde azalma olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$  ve  $P<0.05$ ) (Şekil 6).



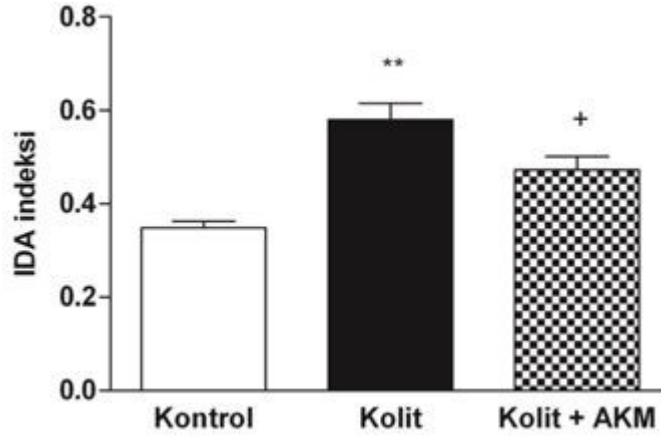
Şekil 6: Haftalık Hastalık İndeksi. +++ 5. Hafta Kontrol grubuna göre  $P<0.001$ ,  $\pi\pi$  5. Hafta Kolit grubuna göre  $P<0.01$ ,  $\phi\phi$  7. Hafta Kontrol grubuna göre  $P<0.01$ , # 7. Hafta Kolit grubuna göre  $P<0.05$ .

3, 5 ve 7. haftalarda hastalığın gelişiminin değerlendirilmesi için fekal örneklerde skorlama yapılmıştır (Şekil 7) 3. Haftadan itibaren fekal skor TNBS grubunda anlamlı bir şekilde artmış ( $P<0.05$ ), 5. Haftada bu artış anlamlı olarak devam etmiştir ( $P<0.001$ ). 7. Haftada ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bunun yanında verilen tedavi kolit grubuna göre anlamlı olarak 5. Haftada fekal skorda bir azalma göstermiştir ( $P<0.05$ ).



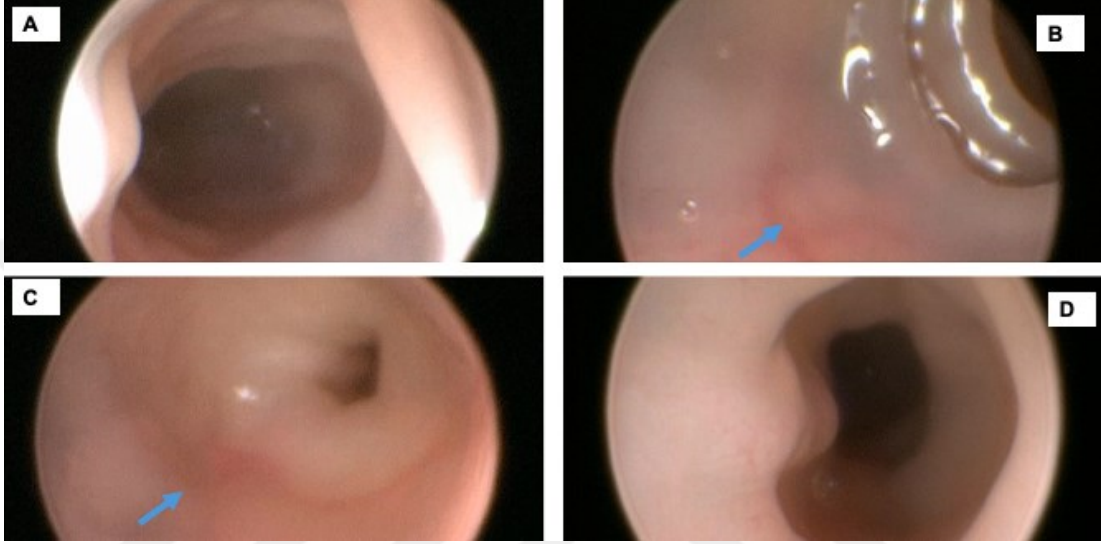
Şekil 7: Fekal skor \* 3. Hafta Kontrol grubuna göre  $P<0.05$ ; +++ 5. Hafta Kontrol grubuna göre  $p<0,001$ ;  $\pi$  5. Hafta Kolit grubuna göre  $P<0.05$

Deney sonunda toplanan kolon doku örneklerinde gruplar arası hasar analizi için gruplar arası ıslak doku ağırlığı (IDA) indeksi değerlendirilmiştir (Şekil 8). Deney sonunda doku ağırlığı gr/100gr olacak şekilde indeks olarak hesaplanarak ifade edilmiştir. Kolit grubunda IDA indeksi anlamlı bir şekilde artmış ( $P<0.01$ ), tedavi ile kolit grubuna göre istatistiksel anlamlılık ile azalmıştır ( $P<0.05$ ).



Şekil 8: Islak Doku İndeksi (İDA) \*\* Kontrol grubuna göre  $P<0.01$  + Kolit grubuna göre  $P<0.05$

Deney grupları arasında makroskopik değerlendirme için periyodik olarak farelere kolonoskopi uygulanmıştır (Resim 5). Resim 5A'da kontrol grubuna ait sağlıklı kolon yapısı gözlenirken, 3.haftadan itibaren hiperemi ve hafif ülserasyon bulguları kolonda gözlenmeye başlamıştır (Resim 5B ve Resim 5C). Tedavi grubunda ise hafif hiperemi gözlenirken, ülserasyon gözlenmemiştir (Resim 5D).

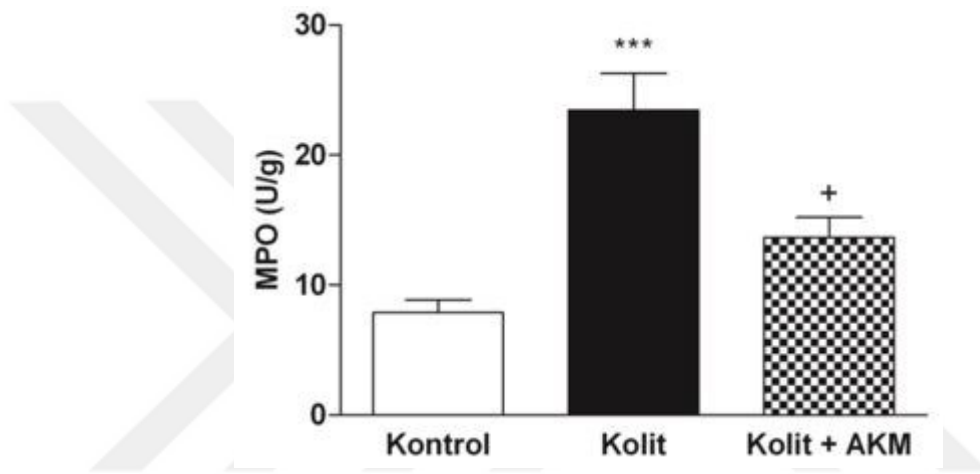


Resim 5: Kolonoskopi Görüntüleri A: Kontrol Grubu B, C: TNBS Grubu D: Tedavi Grubu Mavi Ok: Hiperemi ve hafif ülserasyon

## 4.2 Biyokimyasal Bulgular

### 4.2.1 Nötrofil infiltrasyonu değerlendirmesi

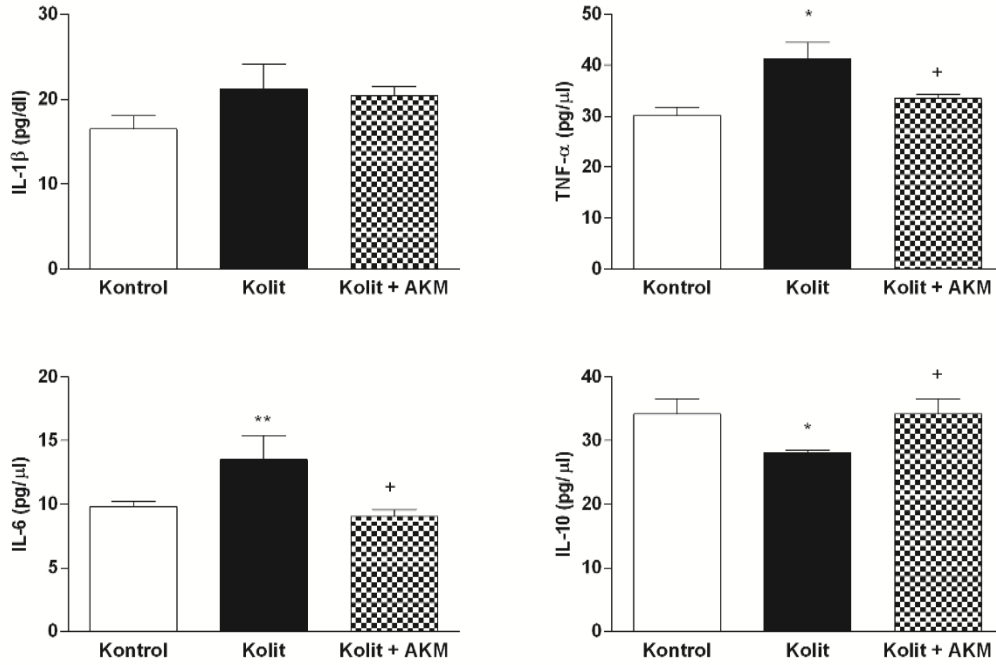
Nötrofil infiltrasyonu göstergesi olarak MPO aktivitesi değerlendirilmiştir (şekil 9). Kolit grubunda MPO aktivitesi anlamlı bir şekilde artarken ( $P<0.001$ ), tedavi ile kolit grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $P<0.05$ ).



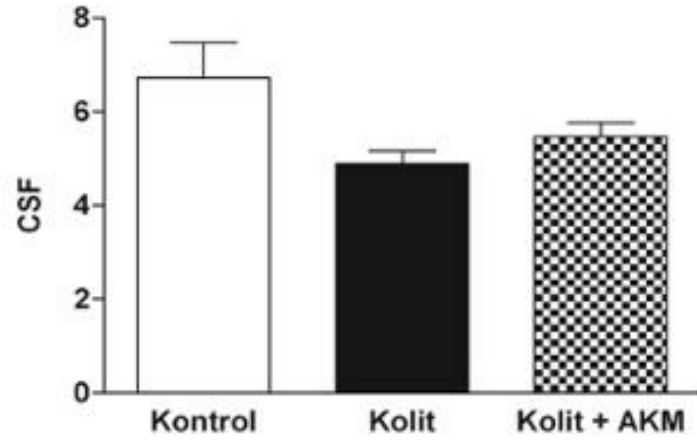
şekil 9: MPO Sonuçları \*\*\* Kontrol grubuna göre  $P<0.001$ , + Kolit grubuna göre  $P<0.05$ .

#### 4.2.2 İnflamatuvar sitokinlerin değerlendirilmesi

İnflamasyon durumunun değerlendirilmesi için inflamatuvar sitokin IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 ve anti inflamatuvar sitokin IL-10 ELISA ile değerlendirilmiştir (Şekil 10). TNF- $\alpha$  ve IL-6 kolit modelinde anlamlı bir şekilde artarken ( $P<0.05$  ve  $P<0.01$ ), tedavi ile belirgin bir azalma bulunmuştur ( $P<0.05$ ).IL-1 $\beta$  sonuçlarında ise gruplar arası anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Anti-inflamatuvar sitokin IL-10 ise kolit ile anlamlı bir şekilde azalmış ( $P<0.05$ ), tedavi ile istatistiksel anlamlılık göstererek artmıştır ( $P<0.05$ ).



Şekil 10: ELISA Sonuçları \* Kontrol grubuna göre  $P<0,05$ , \*\* Kontrol grubuna göre  $P<0,01$ , + Kolit grubuna göre  $P<0,05$

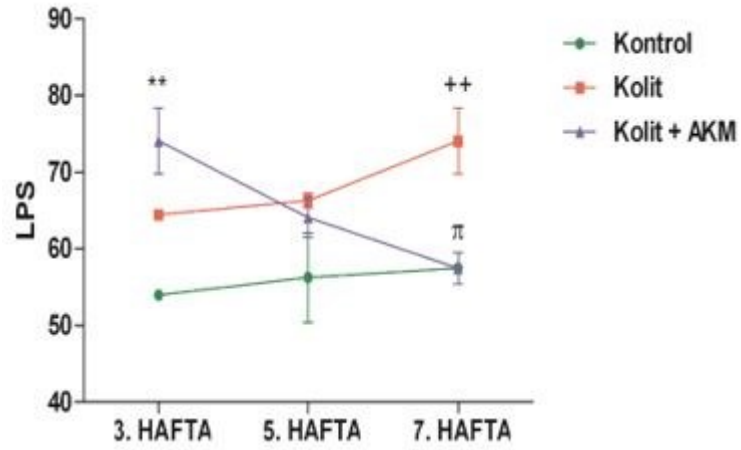


Şekil 11: CSF-1 Sonuçları

İnflamatuvar sitokin etkinliği ve nöronal hasarın değerlendirilmesi için CSF-1 etkinliği değerlendirilmiştir (Şekil 11). Gruplar arası istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır.

#### 4.2.3 Geçirgenlik değerlendirmesi

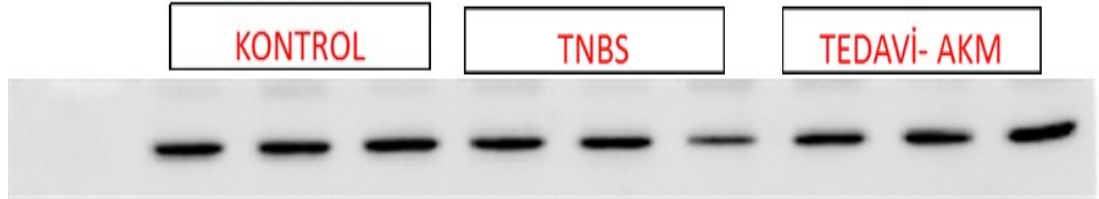
Bağırsak bütünlüğünün ve geçirgenliğin değerlendirilmesi için lipopolisakkarit (LPS) değerlendirmesi ELISA kit yardımı ile yapılmıştır (Şekil 12). Periyodik olarak 3, 5 ve 7. Haftalarda toplanan kan örnekleri ile analizler gerçekleştirilmiştir. 3. haftada kolit ve tedavi grubunda LPS miktarı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ( $P>0.05$  ve  $P<0.01$ ). Tedavi etkinliğinin artışı ile beraber 5.haftada LPS azalmış, 7. Haftada ise kolit grubuna göre anlamlı bir değişim göstermiştir ( $P<0.05$ ). 7. haftada kolit grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $P<0.01$ ).



Şekil 12: LPS Sonuçları. \*\* Kontrolle göre  $P < 0.01$ , ++ Kolit+AKM grubuna göre  $P < 0.01$ ,  $\pi$  Kolit grubuna göre  $P < 0.05$ .

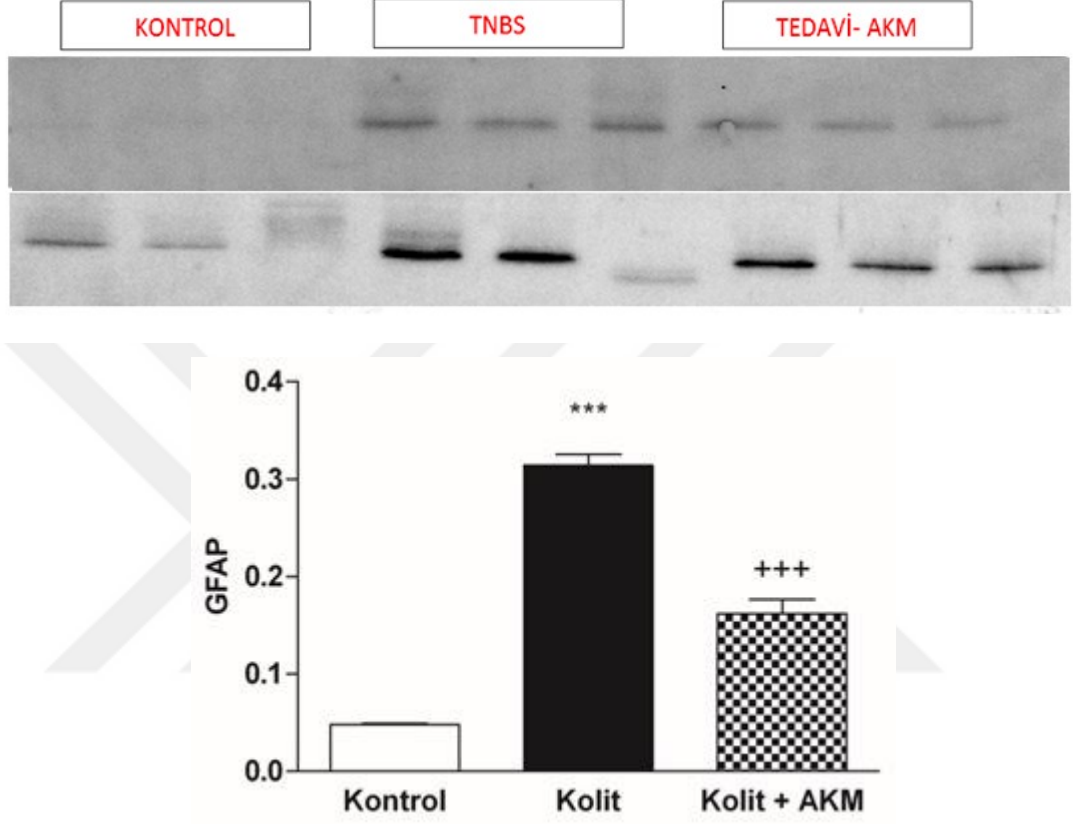
#### 4.2.4 Protein ekspresyonu değerlendirilmesi

Protein ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi için Western blot yöntemi kullanılmıştır. Resim 6'da beta aktin sonuçları görülmektedir.



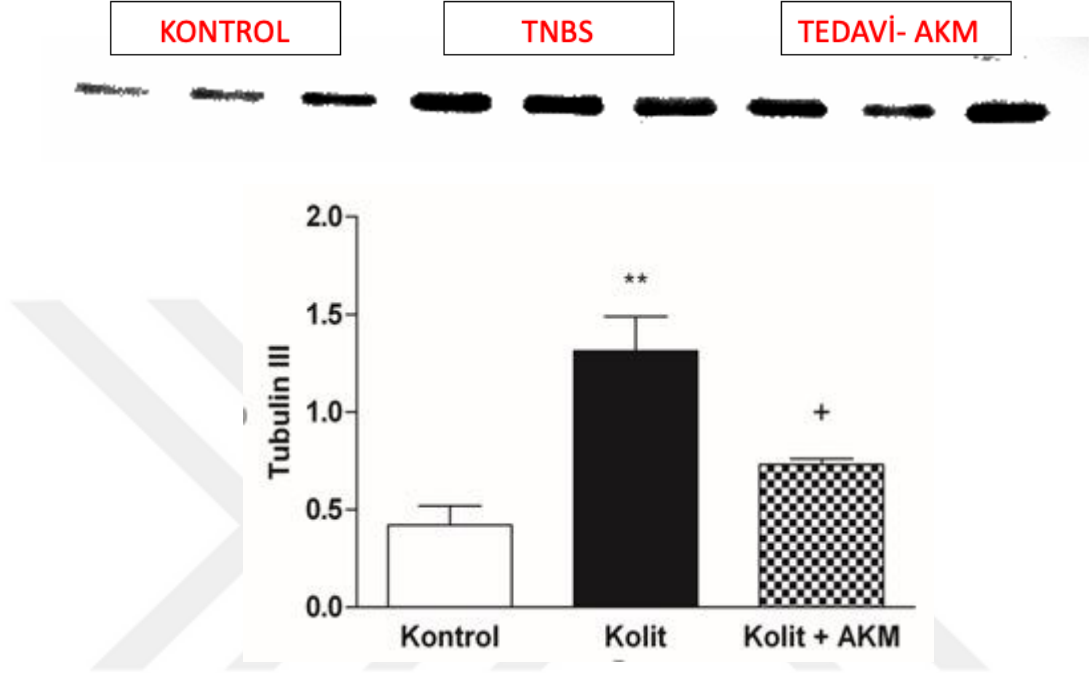
Resim 6: Beta Aktin Jel Görüntüleri

Deney sonunda elde edilen kolon doku örneklerinde gliyal hücre belirteci olarak kullanılan GFAP ekresyonunu gösterilmiştir (Şekil 13). TNBS grubunda GFAP eksresyonu belirgin bir şekilde artarken ( $P<0.001$ ), tedavi ile kolit grubuna göre yine belirgin şekilde azalma gösterilmiştir ( $P<0.001$ ).



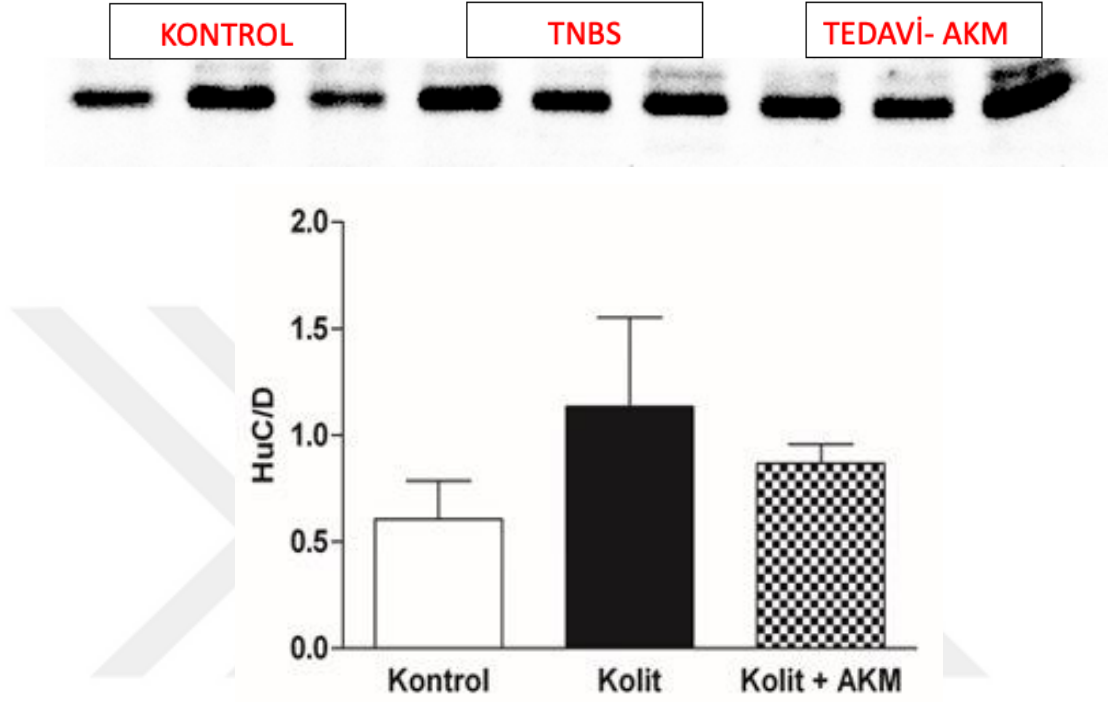
Şekil 13: GFAP Sonuçları. A: GFAP Jel Görüntüleri, B: GFAP İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

Deney sonunda elde edilen kolon doku örneklerinde nöron belirteci olarak kullanılan Tubulin III protein ekspresyon seviyelerini gösterilmiştir (Şekil 14). TNBS uygulaması sonrası Tubulin III ekspresyonu belirgin bir şekilde artarken ( $P<0.01$ ), tedavi ile anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $P<0.05$ ).



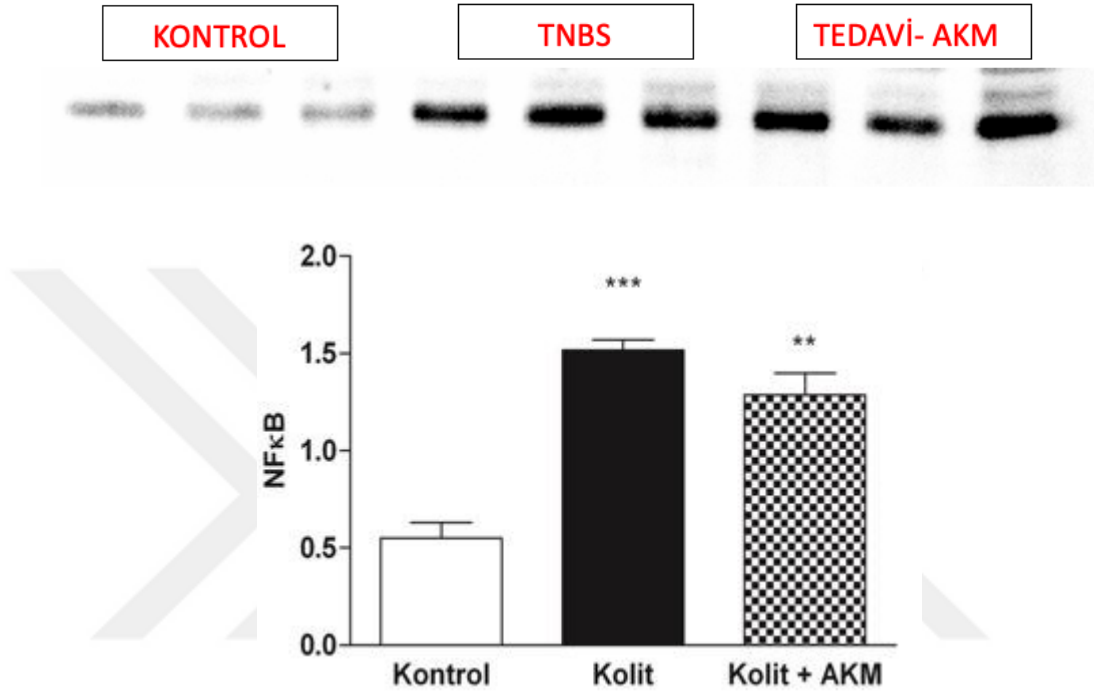
Şekil 14: Tubulin III Sonuçları. A: Beta Tubulin III Jel Görüntüleri, B: Beta Tubulin İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

Deney sonunda elde edilen kolon doku örneklerinde diğerk bir nöron belirteci olarak kullanılan HuC/D proteini ekspresyon seviyelerini gösterilmiştir (Şekil 15). Gruplar arasında bir trend oluşmasına rağmen istatistiksel bir anlamlılık sağlanamamıştır ( $P>0.05$ ).



Şekil 15: HuC/D Sonuçları. A: HuC/D Jel Görüntüleri, B: HuC/D İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

İnflamasyonun sinyal altı yolağının değerlendirilmesi için nükleer faktör-kappa B (NFκB) aktivasyonu değerlendirilmiştir (Şekil 16). TNBS ile indüklenen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenirken ( $P<0.001$ ), tedavi ile kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $P<0.01$ ).

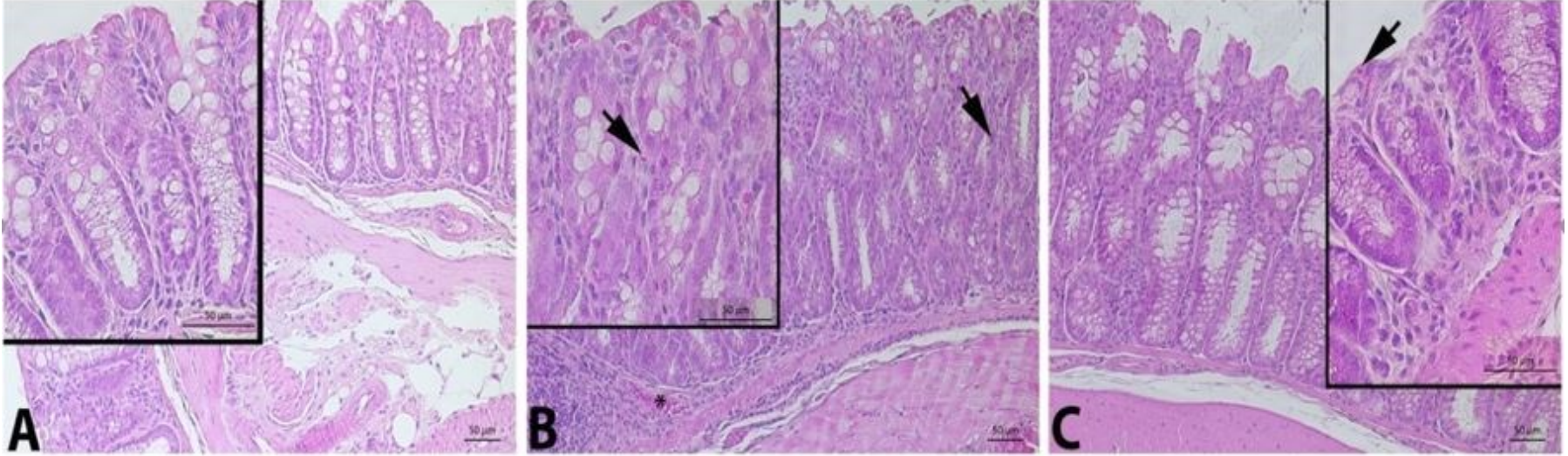


Şekil 16: NFκB Sonuçları. A: NFκB Jel Sonuçları, B: NFκB İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

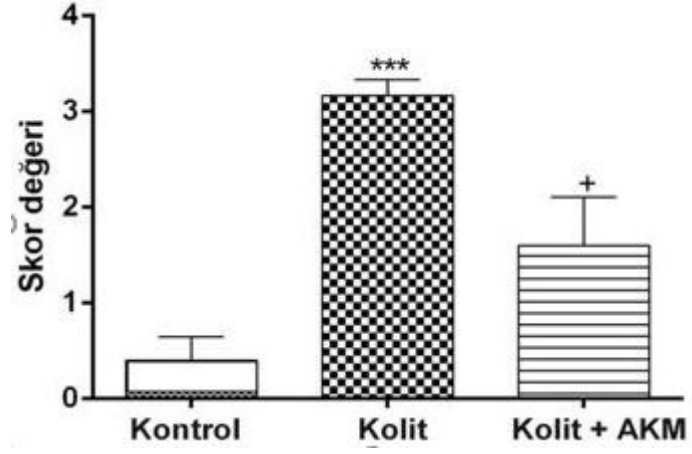
### 4.3 Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

#### 4.3.1 Hematoksilen eozin boyama

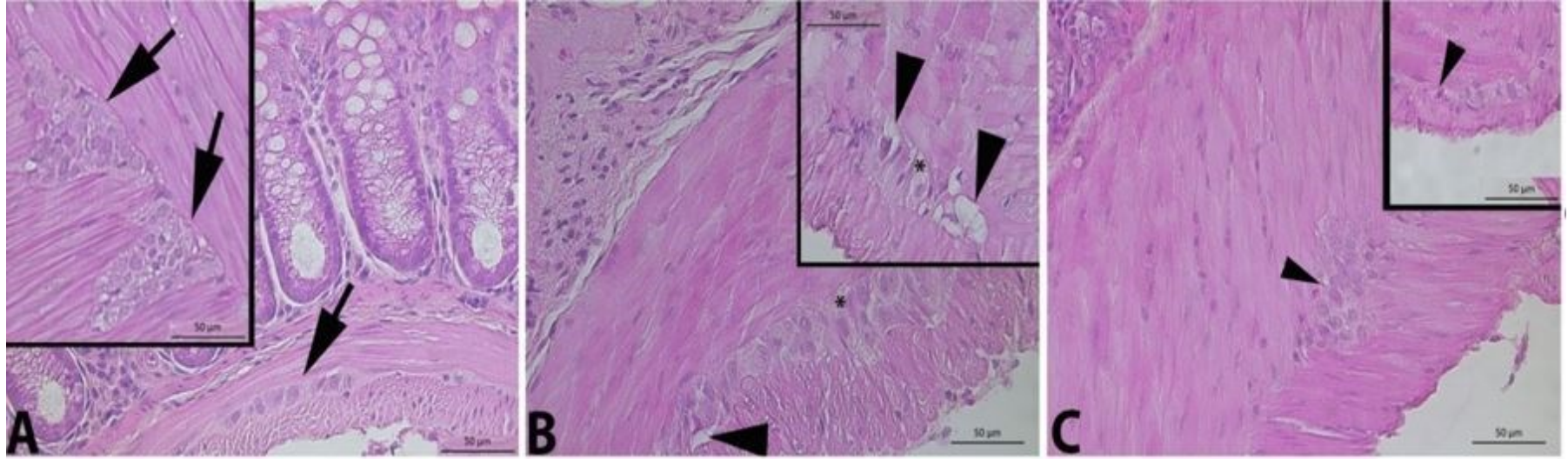
Kolon doku kesitlerinde histolojik organizasyon için hemoksilen eozin boyama uygulanmış ve Resim 7’de gösterilmiştir. Kontrol grubunda normal yapıda histolojik organizasyon gözlemlenirken (Resim 7A), TNBS grubunda epitelde dökülme ve kanama bölgeleri, bez yapısında dejenerasyon, goblet hücrelerinde sayıca azalma ve vazokonjesyon gözlemlenmiştir (Resim 7B). AKM grubunda ise grubunda yüzey epiteli genel olarak düzenli bir yapı sergilemekte olup, mukozadaki bez yapısında düzenli yapılanma ve goblet hücrelerinde sayıca artış gözlemlenmiştir (Resim 7C). Histopatolojik skor analizleri ise Şekil 17’de gösterilmiştir. TNBS grubunda anlamlı olarak skor artarken ( $P<0.001$ ), tedavi ile anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ).



Resim 7: Kontrol grubuna ait kolon doku kesitinde normal yapıda kolon histolojik organizasyonu (A), TNBS grubunda epitelde dökülme ve kanama bölgeleri, bez yapısında dejenerasyon, goblet hücrelerinde sayıca azalma ve vazokonjesyon (B), AKM grubunda yüzey epiteli genel olarak düzenli bir yapı sergilemekte olup, mukozadaki bez yapısında düzenli yapılanma ve goblet hücrelerinde sayıca artış gözlemlenmiştir (C) Inset: mukozada nötrofil infiltrasyonu(ok) (Parafin kesit, H&E boyaması).



Şekil 17: Deney gruplarının histopatolojik skor analiz grafiği. \*\*\*  $p < 0,001$  Kontrol grubuna göre; +  $p < 0,5$  Kolit grubuna göre.

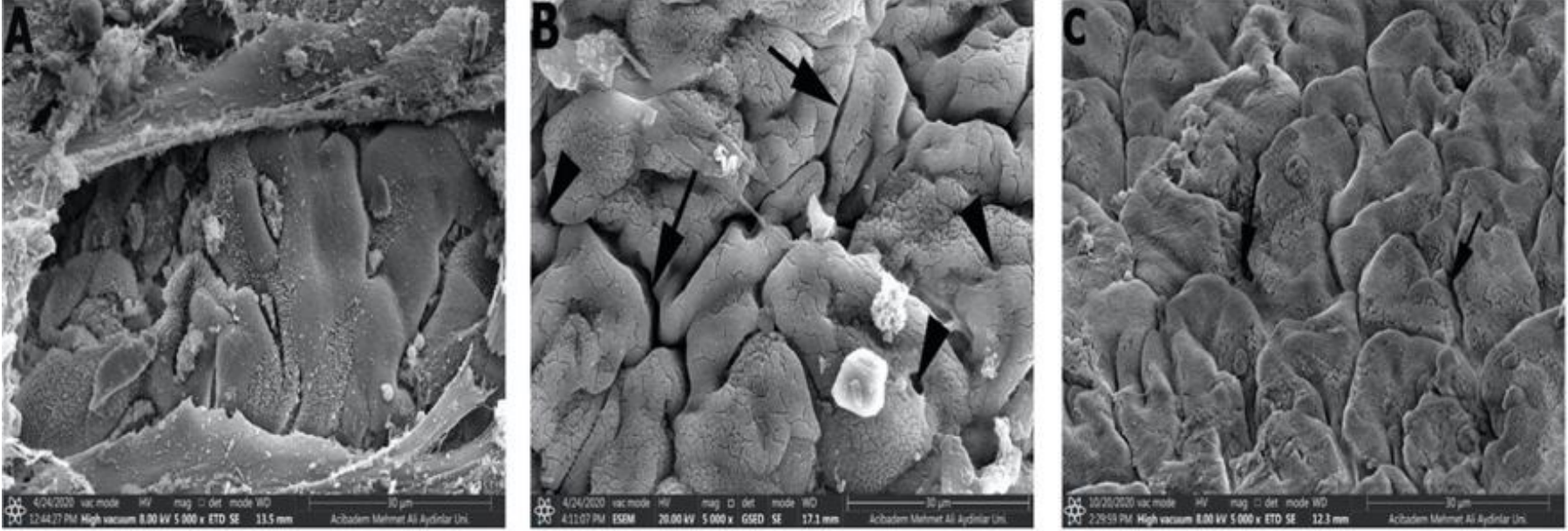


Resim 8: Hematoksilen Eozin Boyama ile Myenterik Pleksus Görüntüleme. A: Kontrol grubu, B: TNBS grubu, C: AKM Grubu

Myenterik pleksus yapısı incelendiğinde ise; kontrol grubuna ait kolon kesitlerinde dairesel ve uzamına düz kas demetleri arasında yerleşik myenterik pleksus yapısının normal morfolojide olduğu görülmüştür. (Resim 8A). TNBS grubunda, myenterik pleksus yapısında vakuolleşme gösteren yer yer de tamamen dejeneratif bulgular içeren nöron ve genişlemiş akson yapıları dairesel ve uzamına düz kas demetleri arasında gözlenmiştir (Resim 8B). AKM grubunda ise myenterik pleksusdaki akson yapılarında minimal genişleme eşliğinde normale yakın histolojik organizasyon izlenmiştir (Resim 8C).

#### **4.3.2 Taramalı elektron mikroskopi incelemesi**

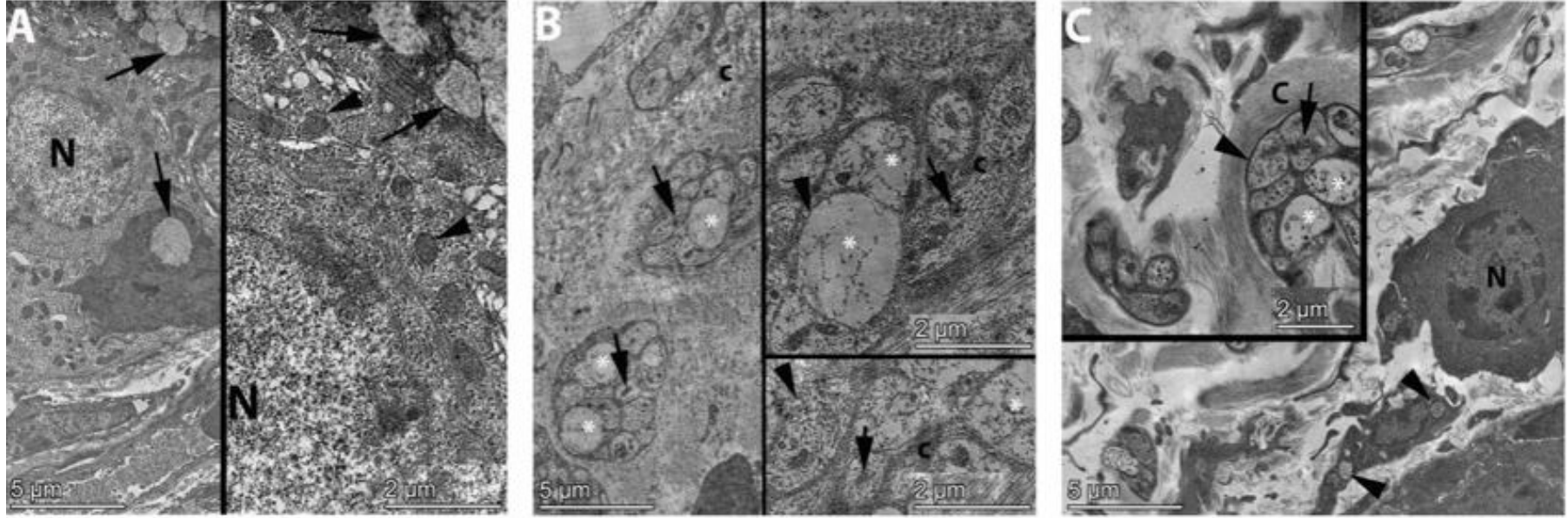
Mikroskopik hasar değerlendirmesi için SEM mikrografları 5000x olarak paylaşılmıştır (Resim 9). Alınan görüntülerde kontrol grubuna ait kolon dokusunda normal morfolojiye sahip epitel hücreleri gözlemlenirken (Resim 9A), TNBS grubunda ise epitel hücreleri arasında ayrılma ve hücre yüzeyinde belirgin çukursu dejenerasyonlar bulunmuştur (Resim 9B). AKM grubunda ise normal morfolojiye sahip epitel hücrelerin yanında, lokalize hücreler arasında ve TNBS grubuna görece daha az sayıda ayrılma görülmektedir (Resim 9C).



Resim 9: SEM Mikrografları A: Kontrol Grubu B: TNBS Grubu C: AKM Grubu Siyah Ok: Epitel hücreler arası ayrılma Siyah Ok Başlı: Hücre yüzeyinde çukursu dejenerasyon

Myenterik pleksus yapısındaki ultrastrüktürel inceleme ve yapısal değişim bulguları için TEM görüntüleme sonuçları Resim 10'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait kolon kesitlerinde myenterik pleksus yapısında normal morfolojiye sahip nöronlar, akson sonlanmaları ve normal morfolojide mitokondriler görülmüştür. (Resim 10A) TNBS grubunda ise morfolojisi bozulmuş mitokondriler, dejenere akson demetleri ve sitoplazmada kolajen yapısında düzensizlik gözlenmiştir (Resim 10B). Bunun yanında AKM grubunda ise normal morfolojiye sahip nöronlar, düzenli morfolojide kolajen yapısı ve akson sonlanmalarının yanında yer yer az sayıda dejenere yapıda akson sonlanmaları görülmüştür (Resim 10C).



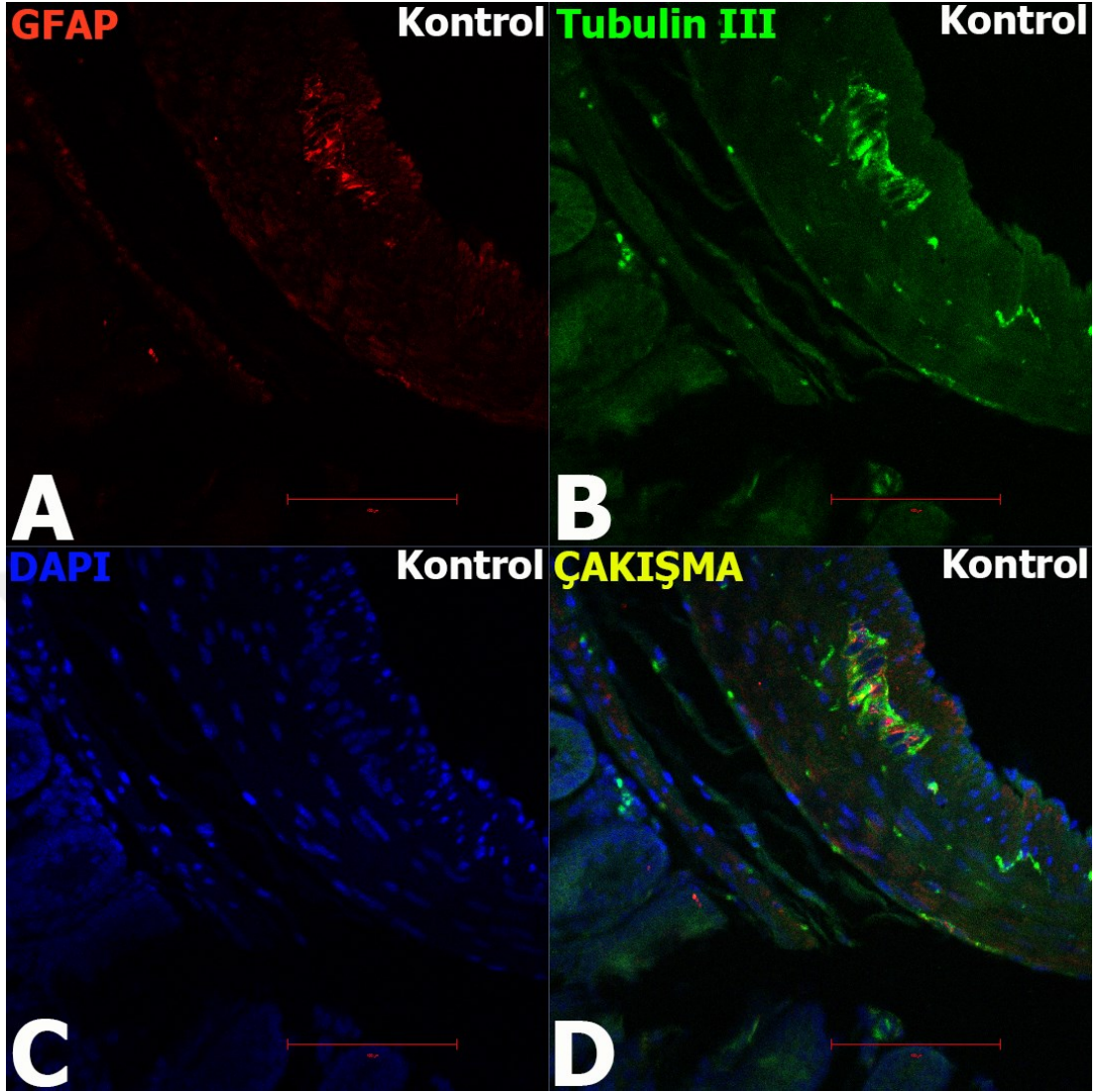


Resim 10: Ultrastrüktürel İnceleme Görüntüleri

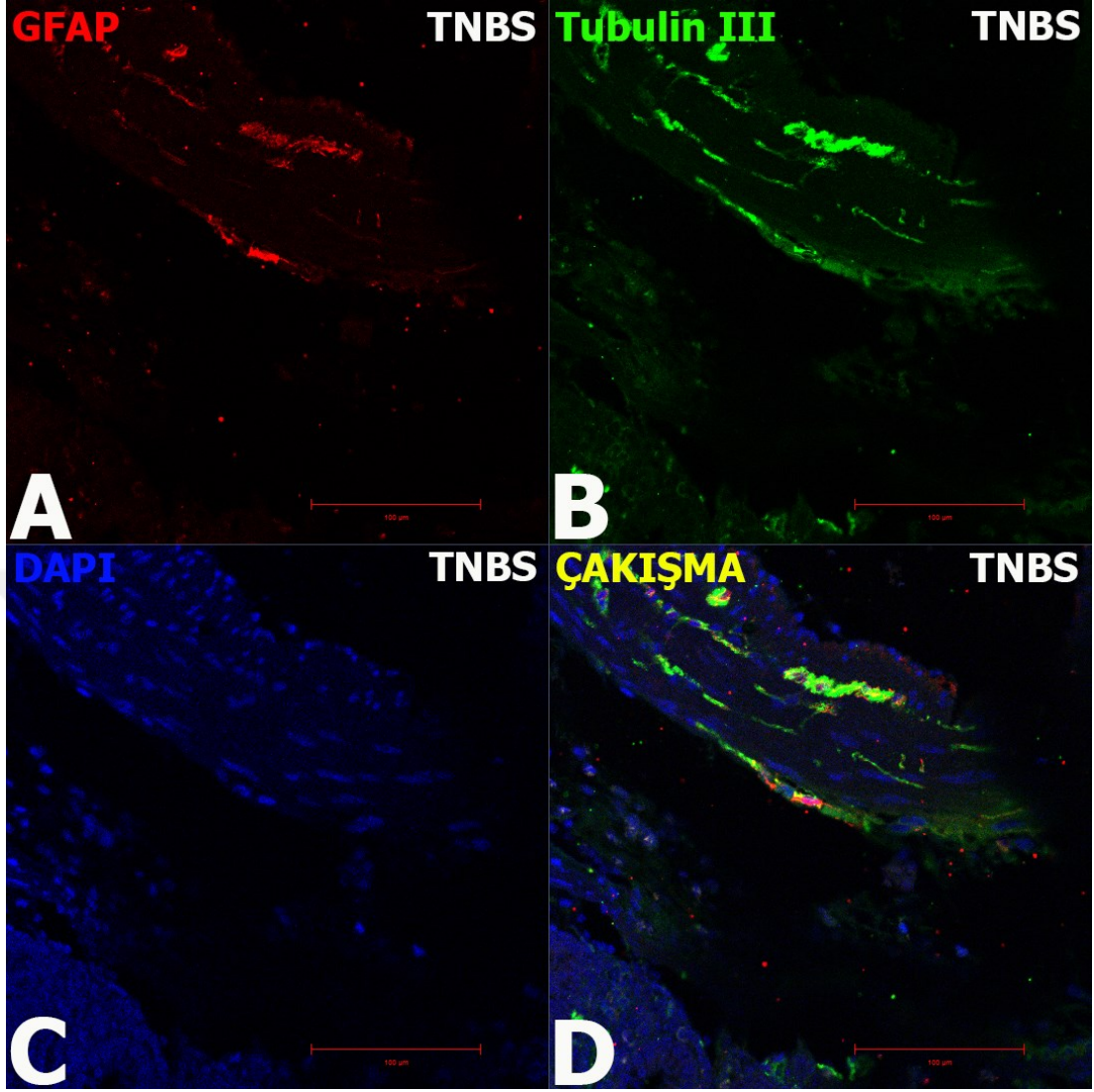
### 4.3.3 İmmunofloresan sonuçları

Enterik nöron hasarı ve tedavi sonrası değişimlerinin değerlendirilmesi için immünofloresan boyama yapılmıştır (Resim 11-28). Enterik gliya hücre belirteci olarak kullanılan GFAP ekspresyon seviyeleri TNBS kolit grubunda artarken, tedavi ile azalma gözlemlenmiştir (Resim 11-13, Resim 20-22). Yapılan istatistiksel analizler doğrultusunda değişim anlamlı olarak bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (Şekil 18). Bir diğer enterik gliya hücre belirteci olarak S100B TNBS grubunda azalırken, tedavi ile artış gözlemlenmiştir (Resim 14-16, Resim 23-25). Yapılan değerlendirmeler sonrasında değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ( $P<0.05$ ) (Şekil 20). Ek olarak diğer bir enterik gliyal belirteç olarak kullanılan Sox10 üzerinde TNBS uygulaması ile azalma, tedavi ile bir artış gözlemlenmiştir (Resim 17-19, Resim 26-28). Bunun yanında istatistiksel olarak bir değişim bulunmamıştır ( $P>0.05$ ) (Şekil 19).

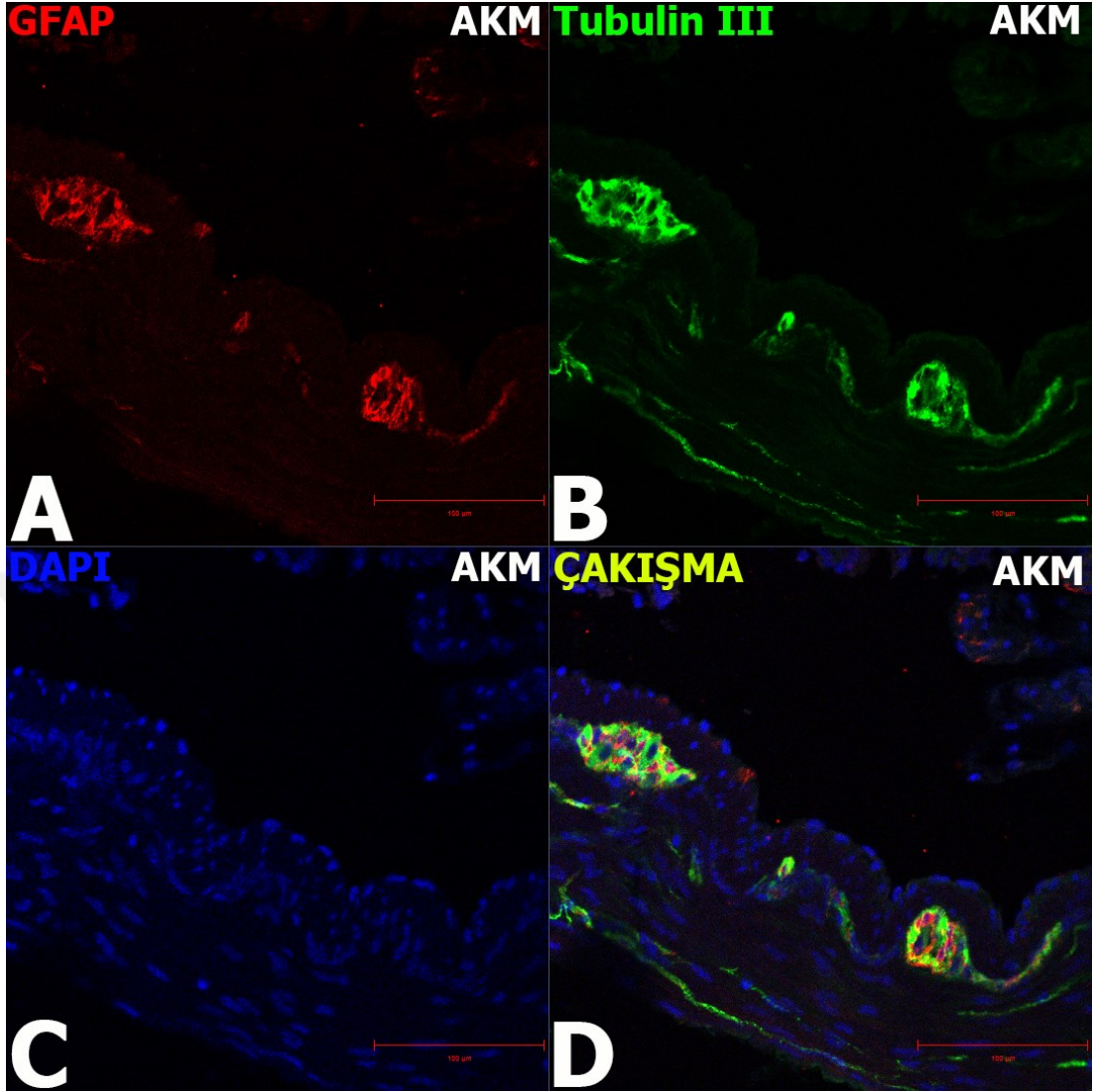
Enterik nöron belirteci olarak Tubulin III ve HuC/D belirteçleri kullanılmıştır. Tubulin III TNBS ile bir azalma gözlemlenirken, tedavi sonrası bir artış bulunmuştur (Resim 11-19). Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı olarak gösterilmiştir ( $P<0.05$ ) (Şekil 21). Diğer bir enterik nöron belirteci olarak kullanılan HuC/D ise TNBS uygulaması sonrası artış ve tedavi ile bir azalma göstermektedir (Resim 20-28). Bu değişim istatistiksel analizler sonrası anlamlı bir değişim olarak bulunmamıştır ( $P>0.05$ ) (Şekil 22).



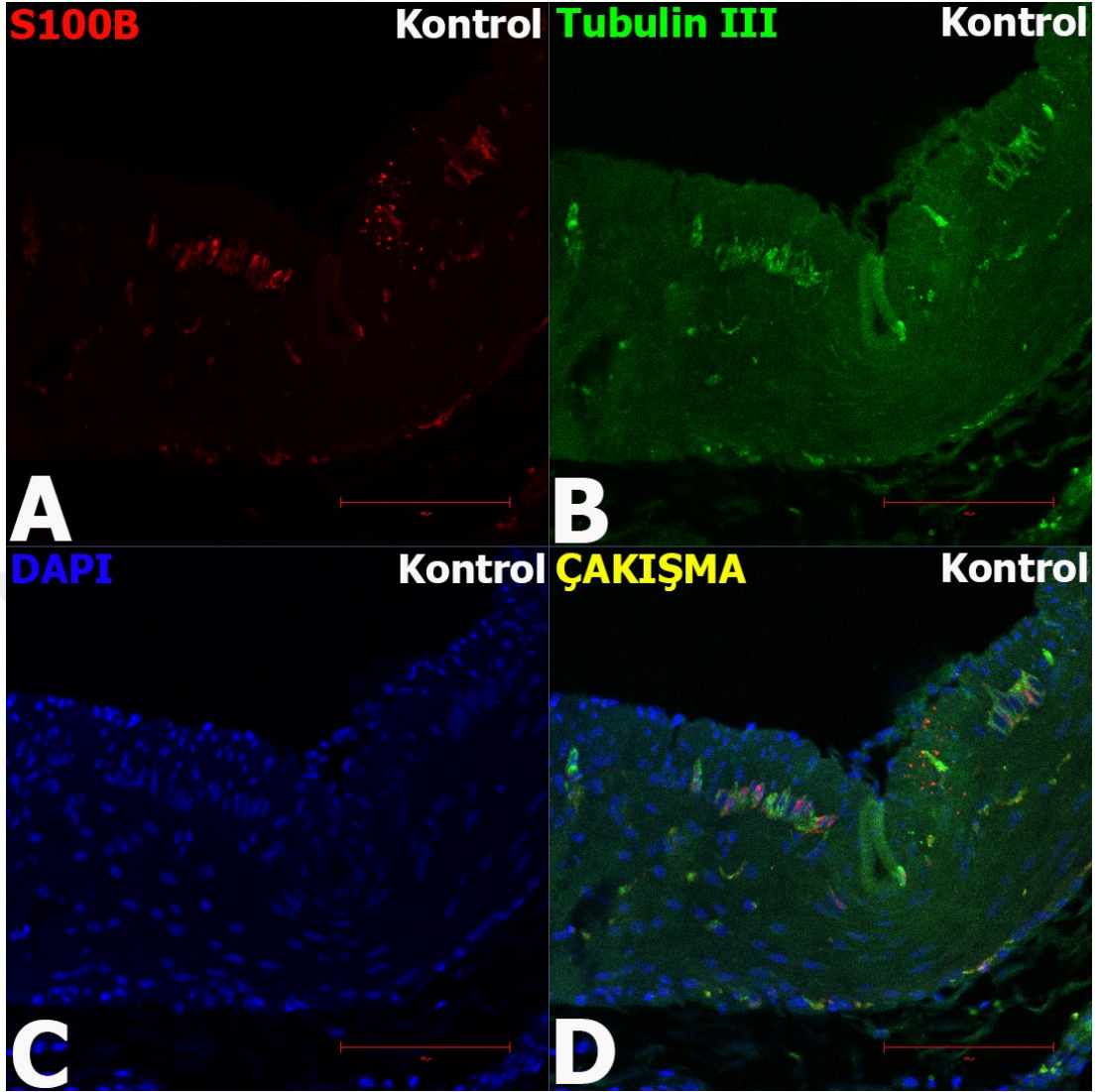
Resim 11: Kontrol grubu Tubulin III ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



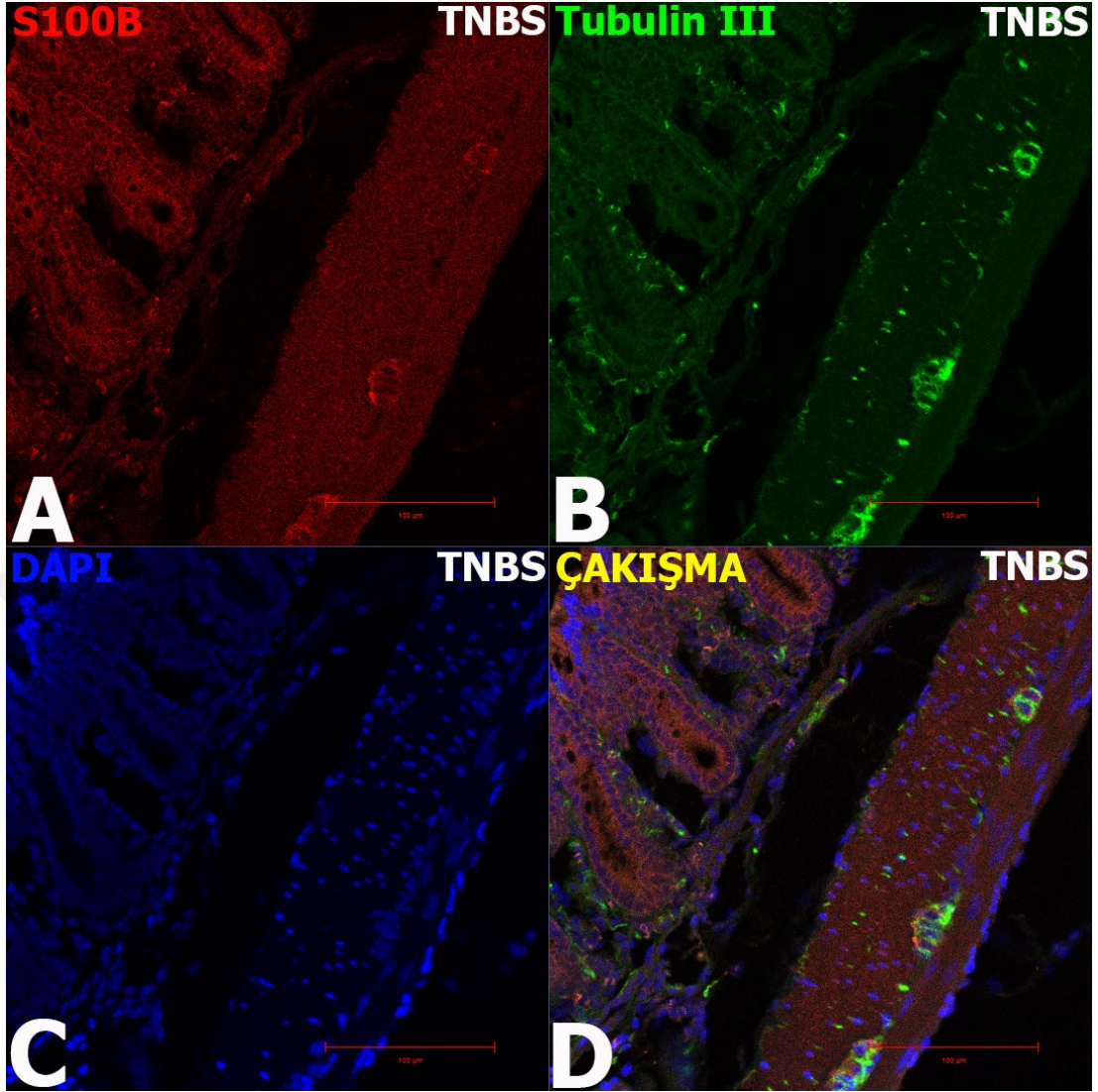
Resim 12: TNBS grubu Tubulin III ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



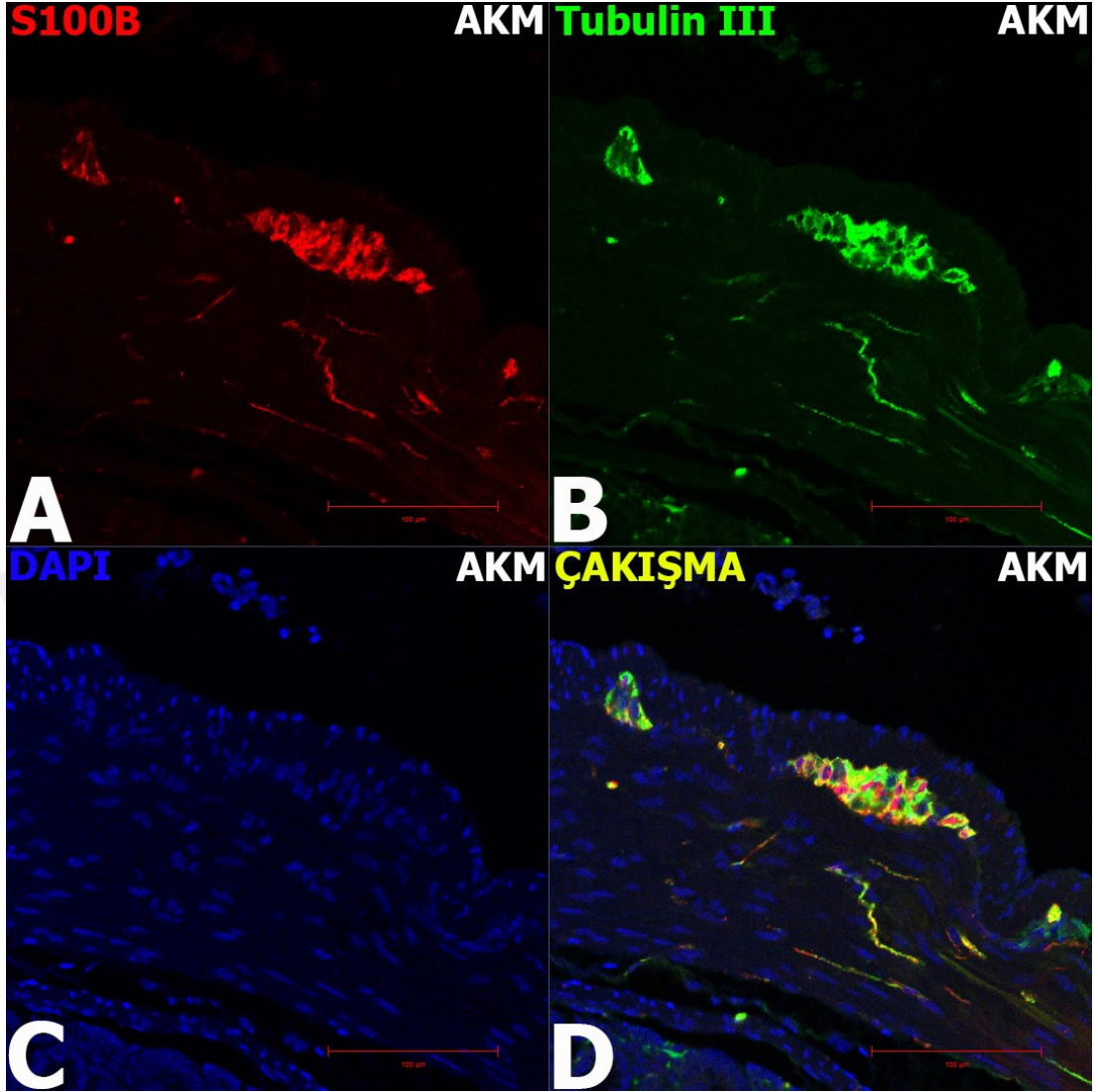
Resim 13: AKM grubu Tubulin III ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



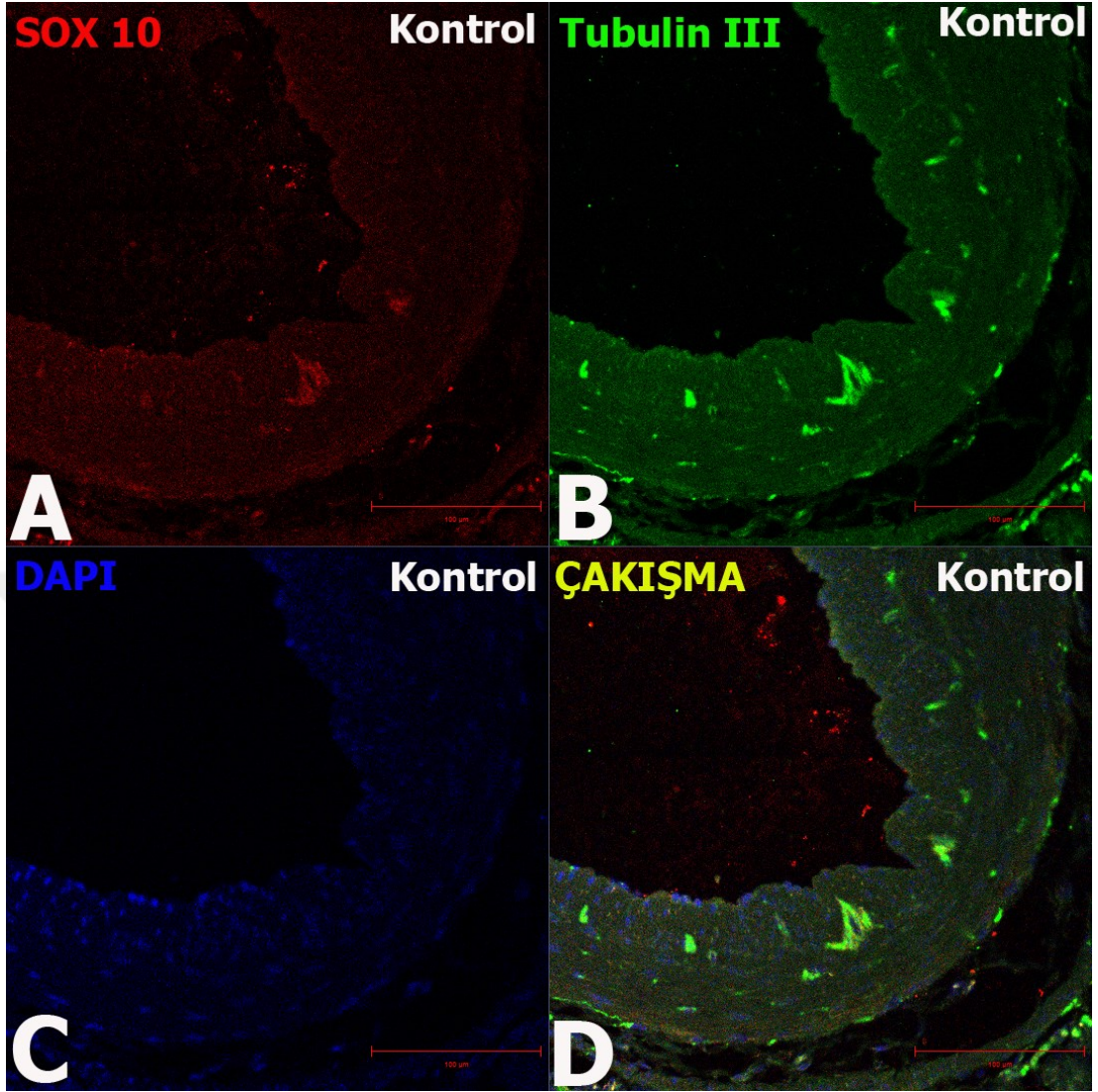
Resim 14: Kontrol grubu Tubulin III ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin karşılaştırılması



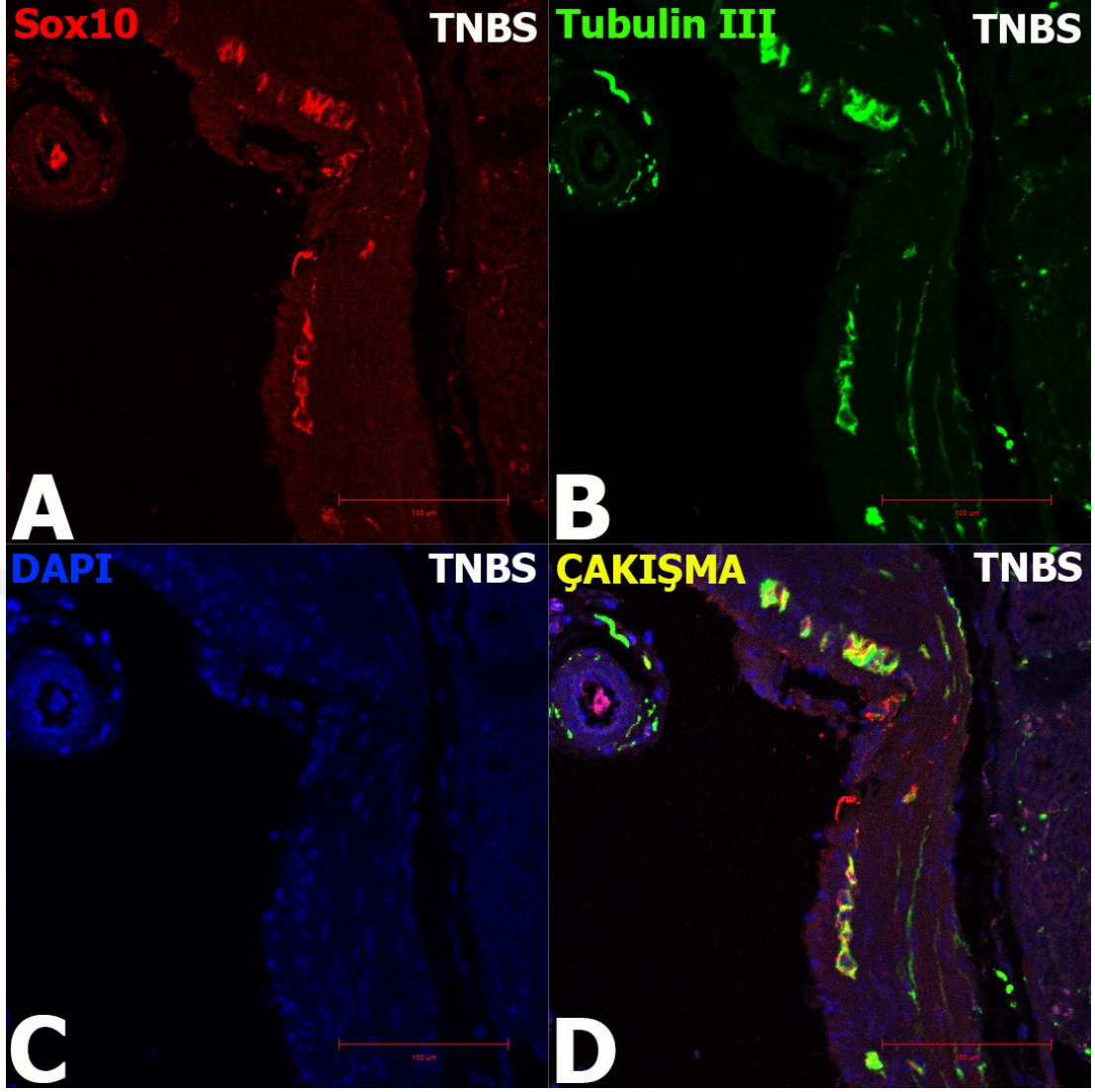
Resim 15: TNBS grubu Tubulin III ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



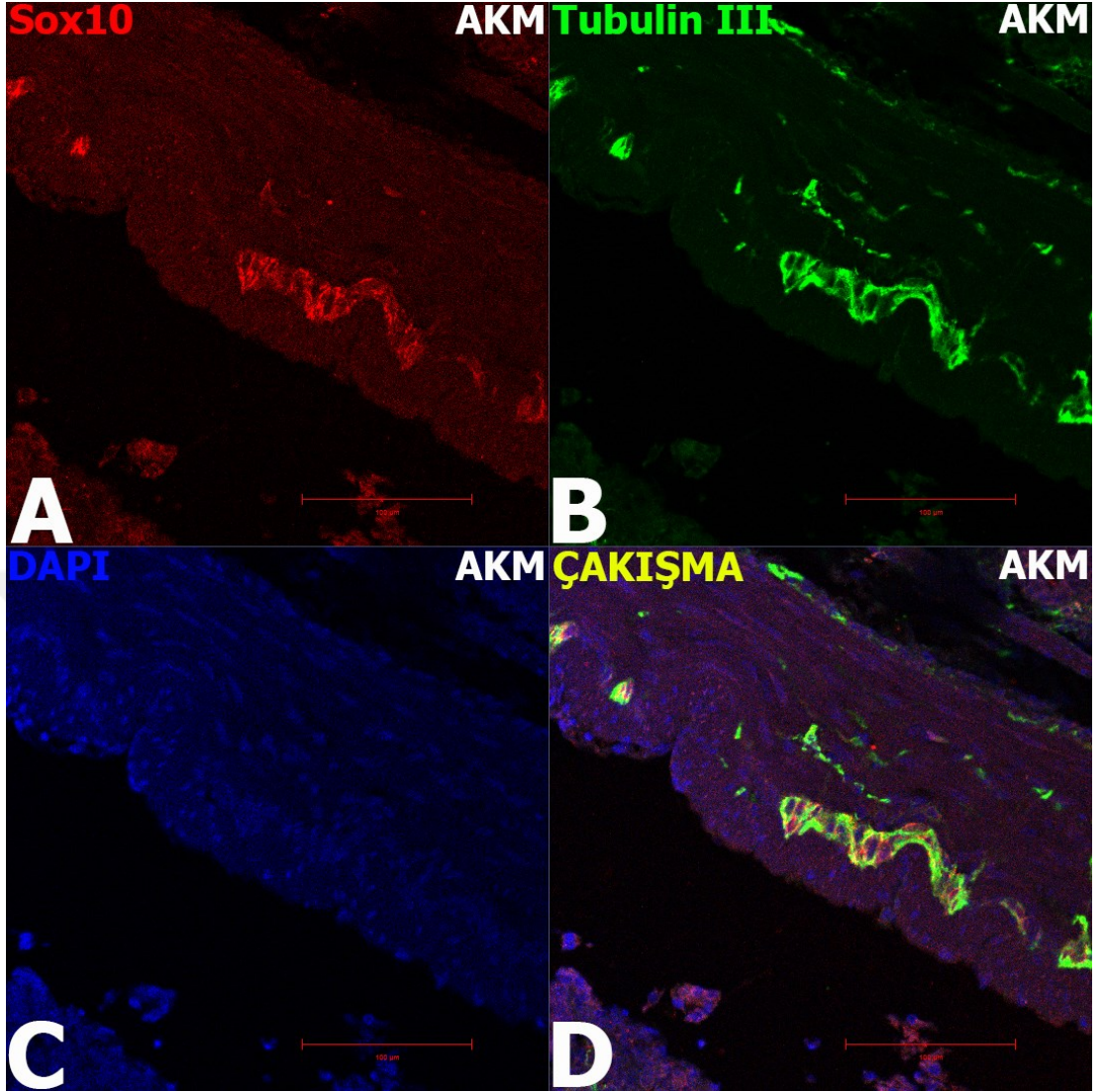
Resim 16: AKM grubu Tubulin III ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



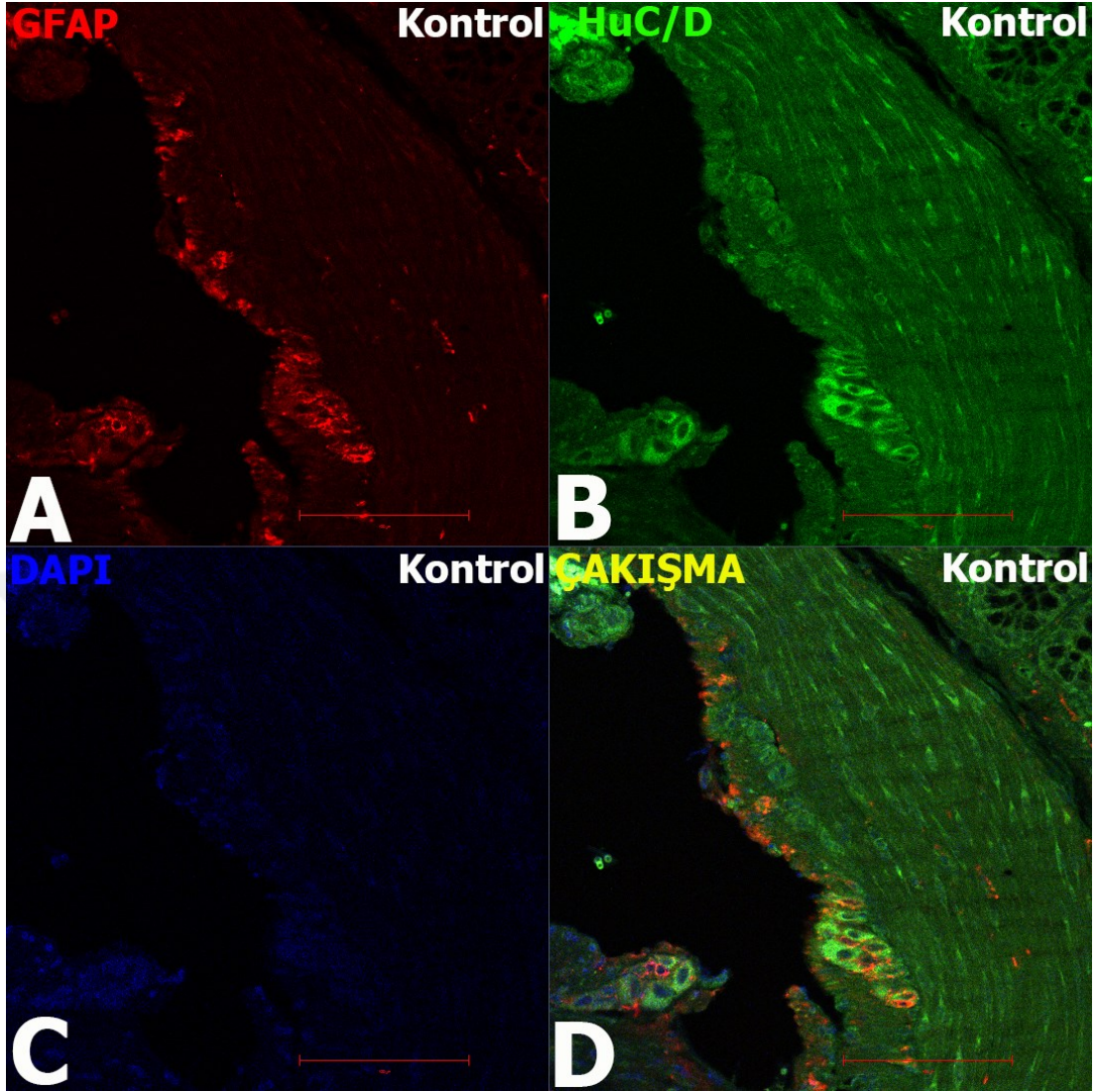
Resim 17: Kontrol grubu Tubulin III ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin karşılaştırılması



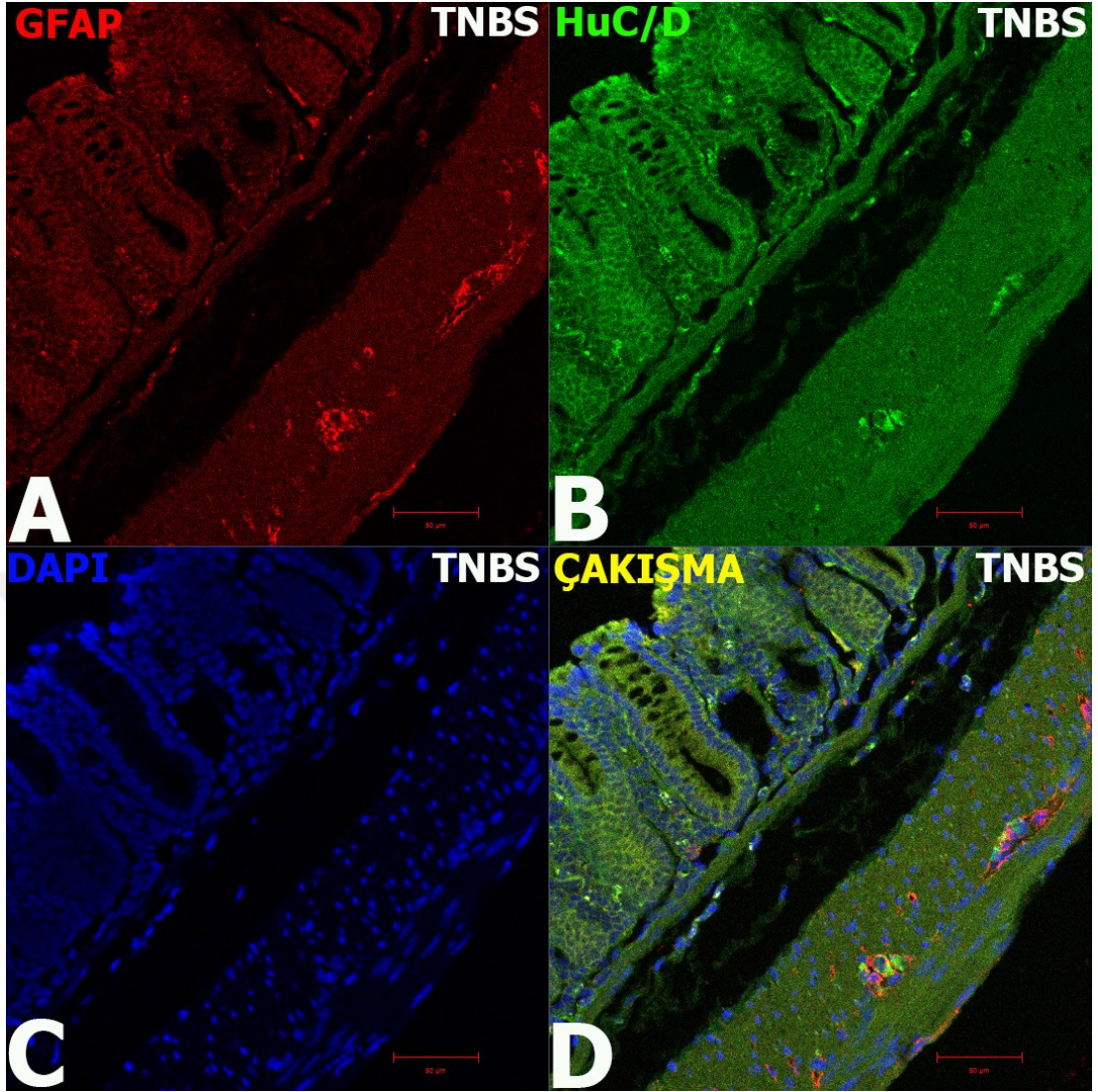
Resim 18: TNBS grubu Tubulin III ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



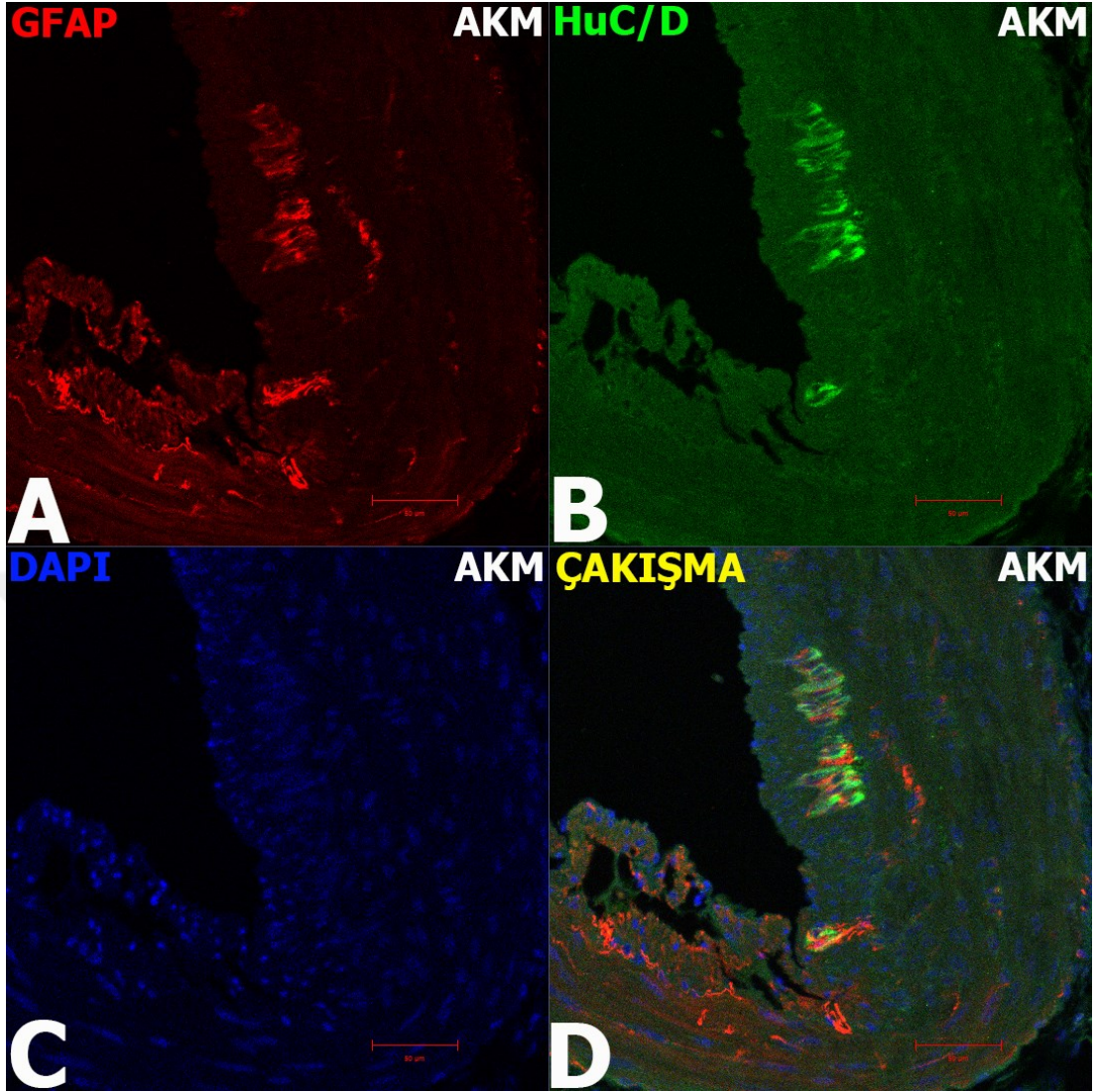
Resim 19: AKM grubu Tubulin III ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, Tubulin III ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



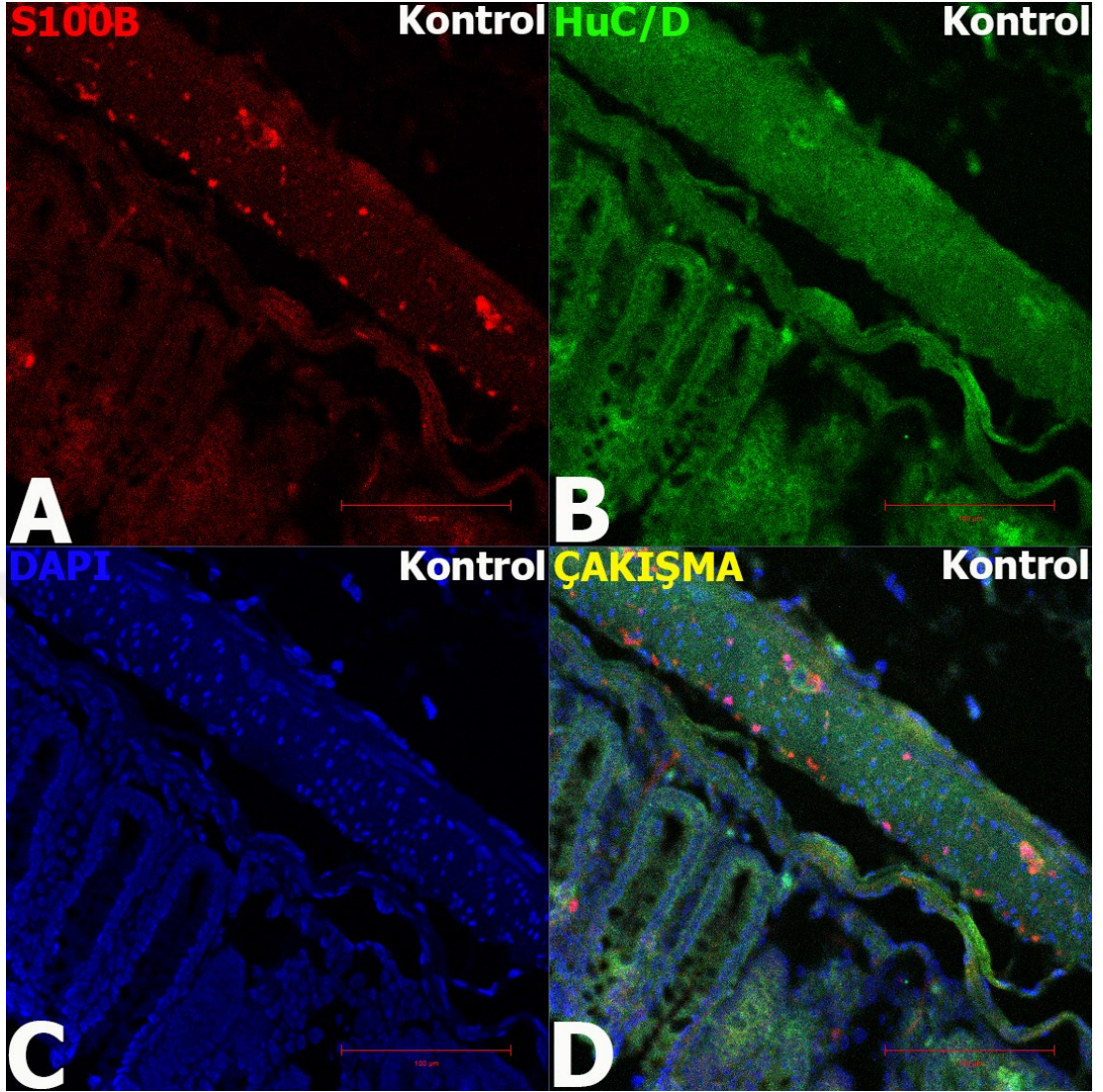
Resim 20: Kontrol grubu HuC/D ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



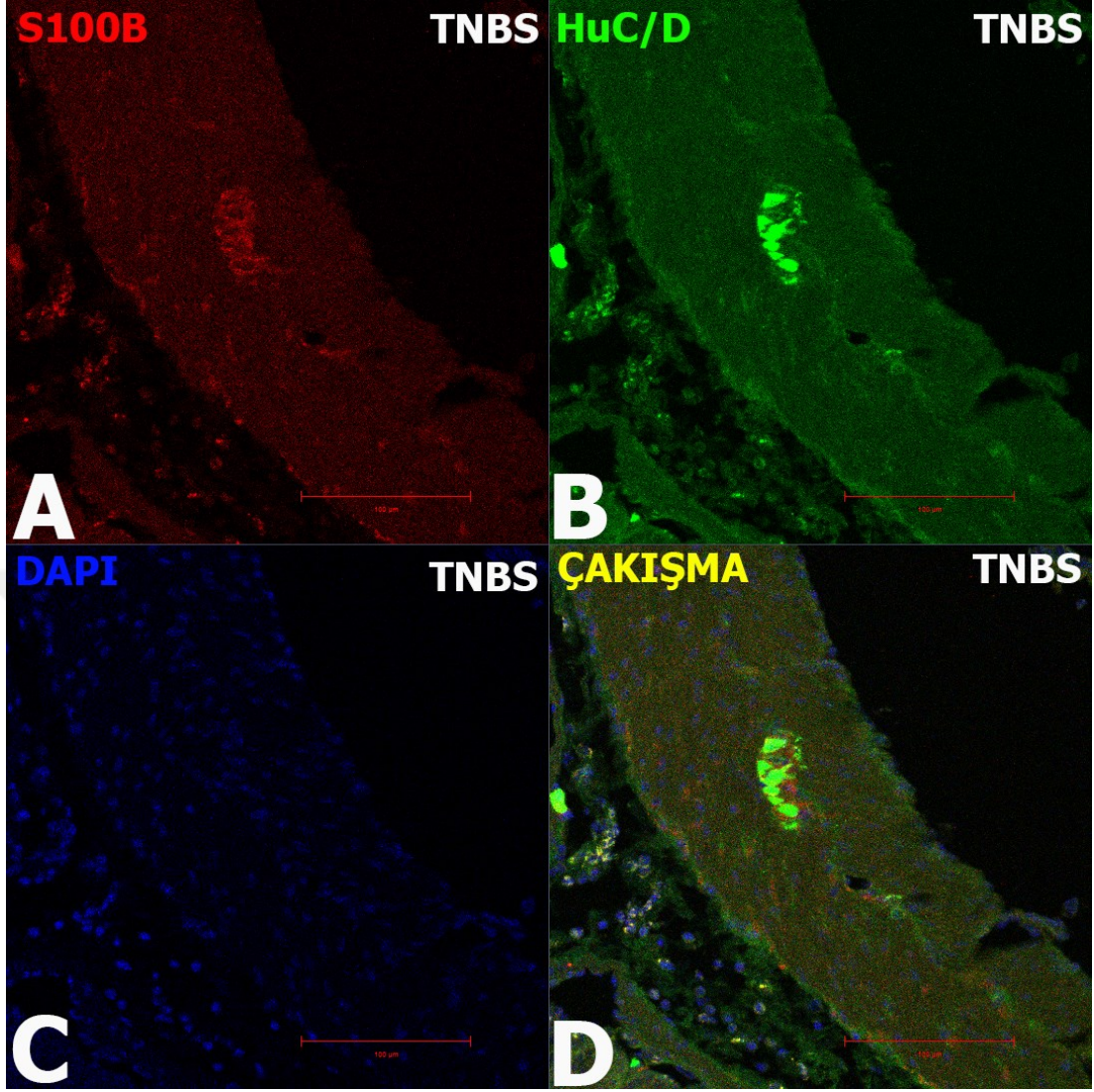
Resim 21: TNBS grubu HuC/D ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



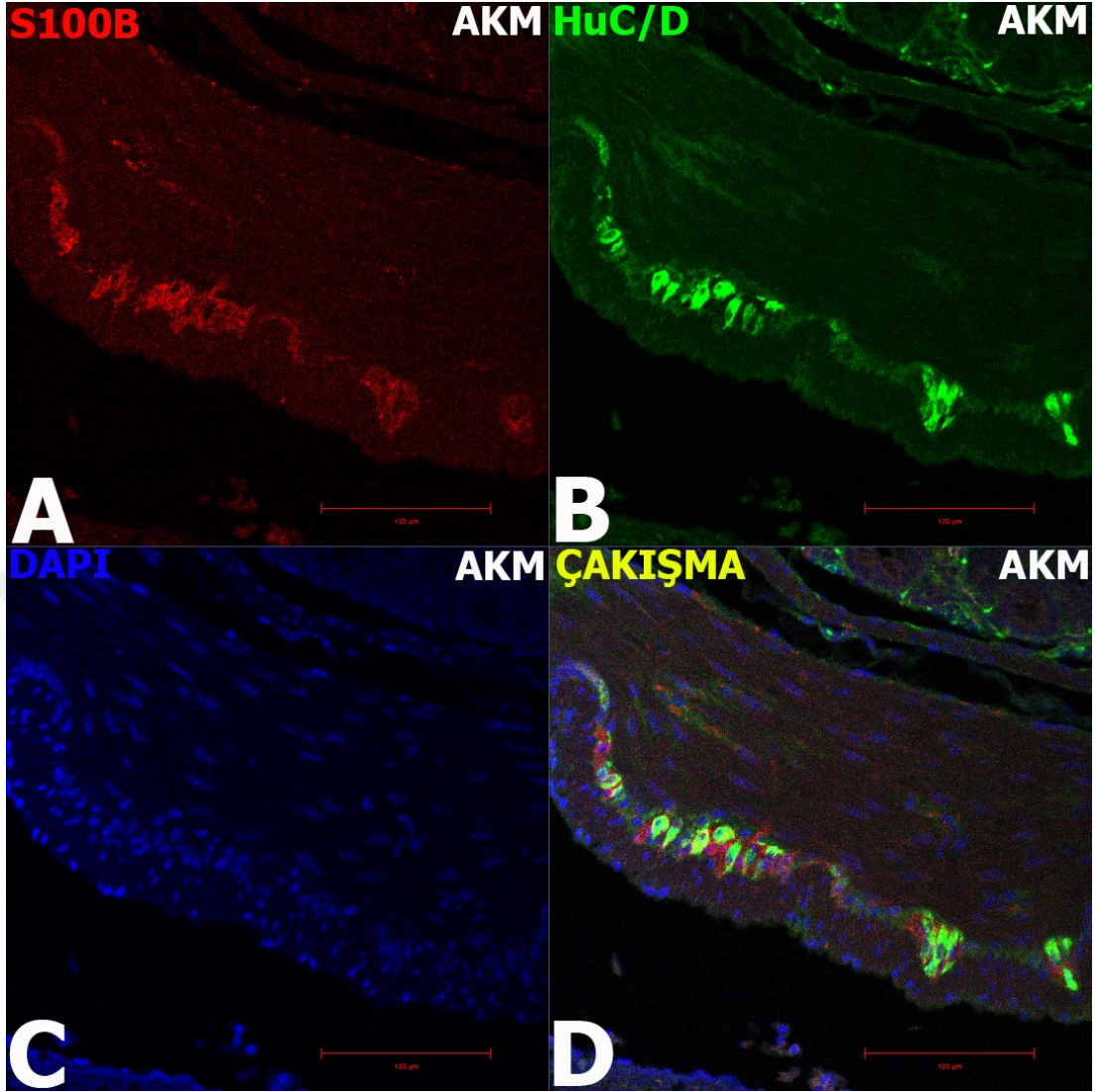
Resim 22: AKM grubu HuC/D ve GFAP İmmunofloresan Görüntüleri. A: GFAP İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: GFAP, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



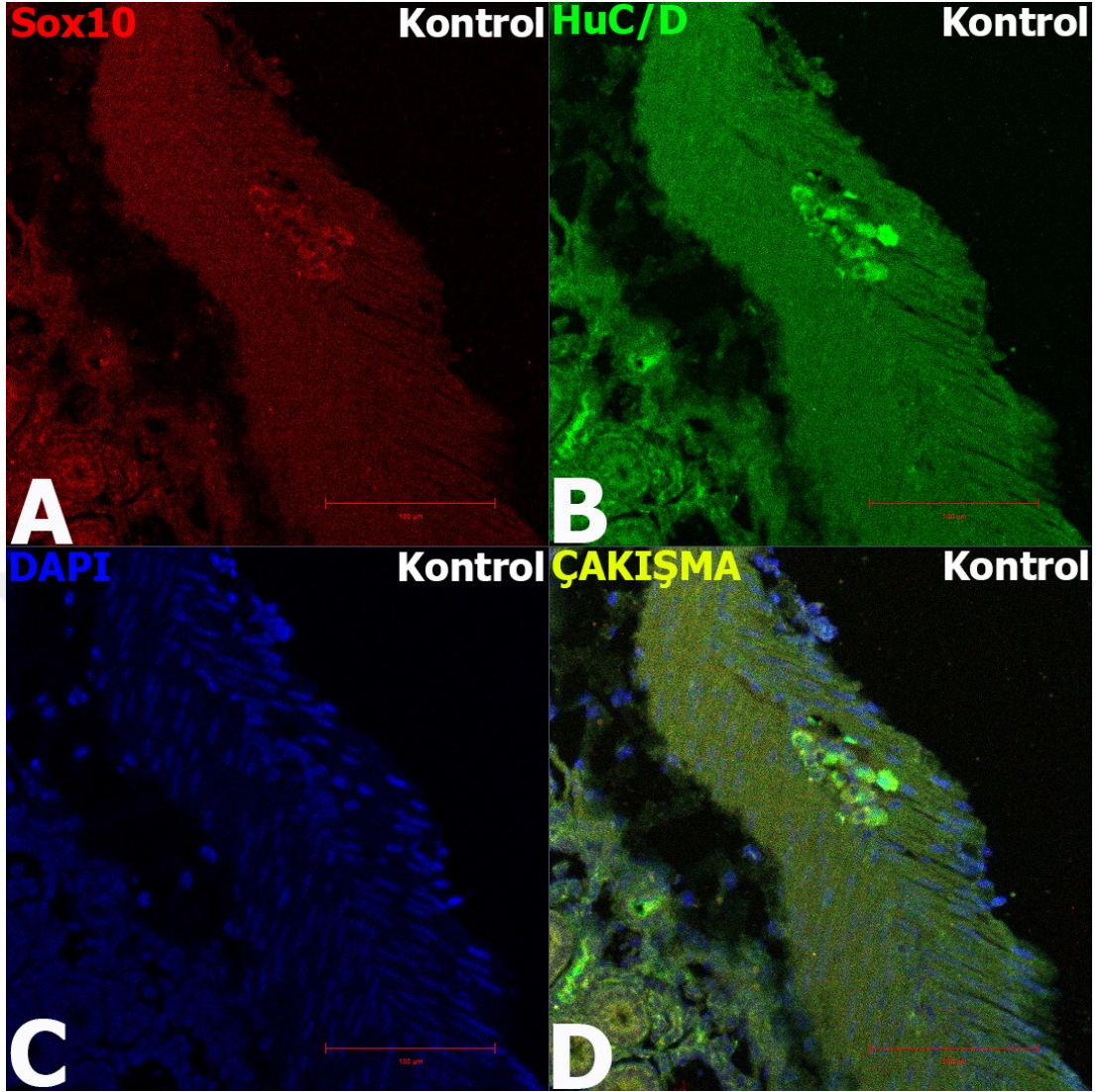
Resim 23: Kontrol grubu HuC/D ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



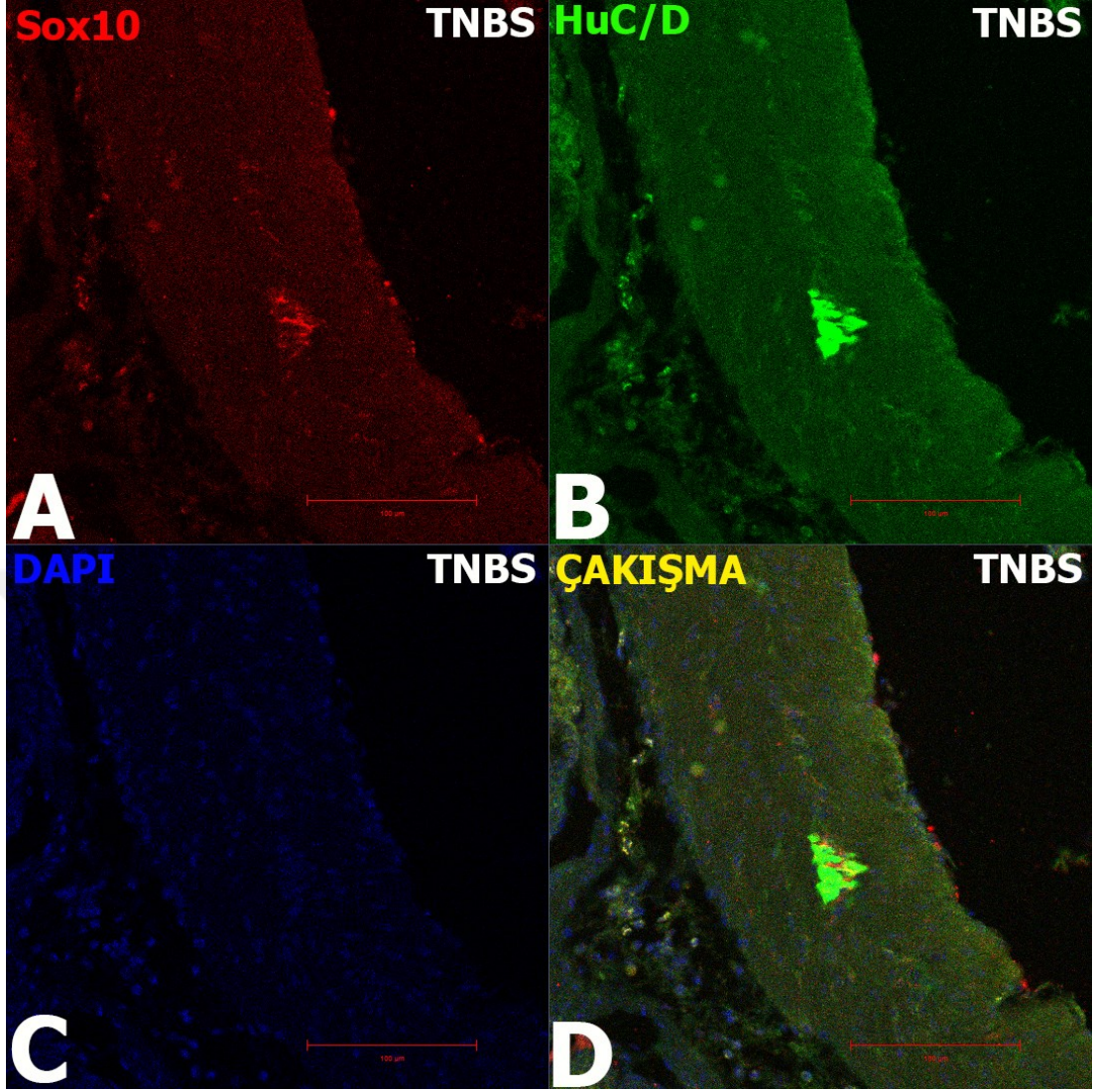
Resim 24: TNBS grubu HuC/D ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



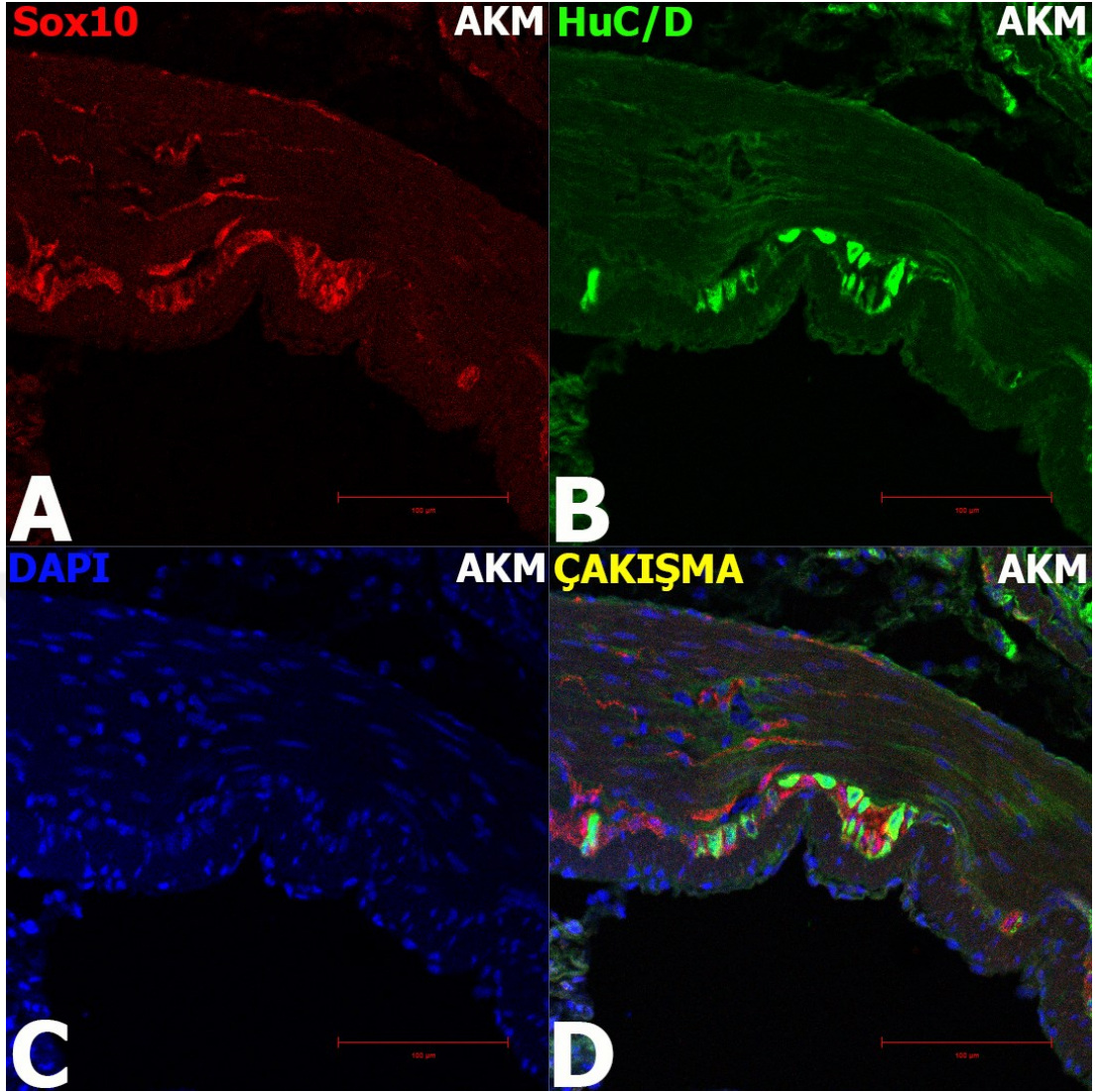
Resim 25: AKM grubu HuC/D ve S100B İmmunofloresan Görüntüleri. A: S100B İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: S100B, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



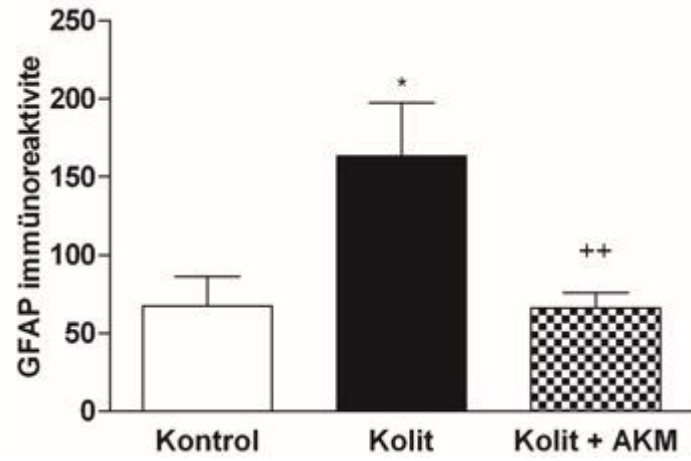
Resim 26: Kontrol grubu HuC/D ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: Sox10 İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



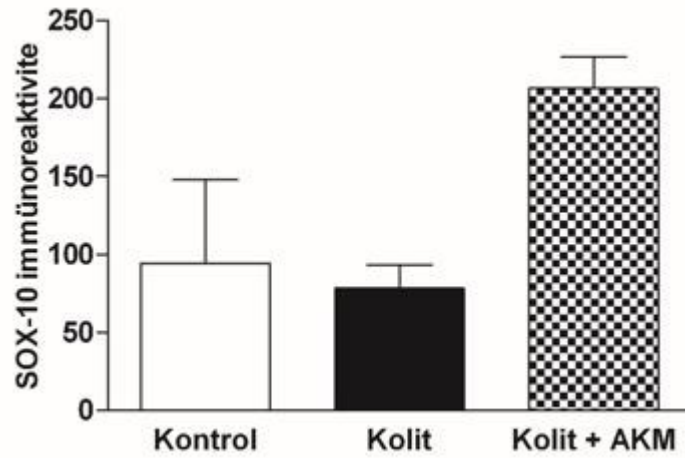
Resim 27: TNBS grubu HuC/D ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: Sox10 İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



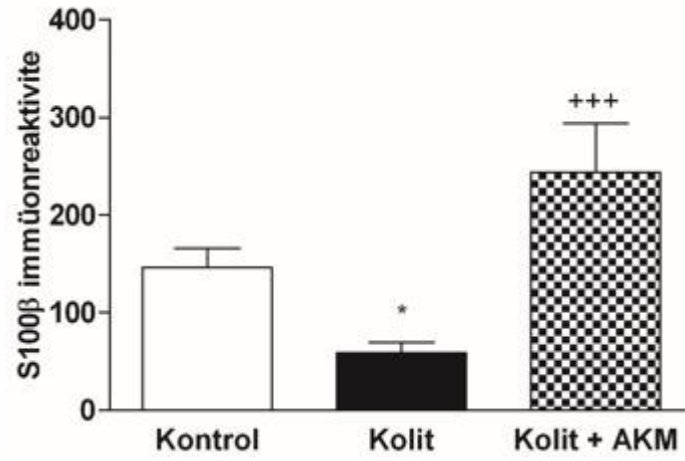
Resim 28: AKM grubu HuC/D ve Sox10 İmmunofloresan Görüntüleri. A: Sox10 İmmunoreaktivitesi B: HuC/D İmmunoreaktivitesi C: DAPI ile nukleusların işaretlenmesi D: Sox10, HuC/D ve DAPI görüntülerinin çakıştırılması



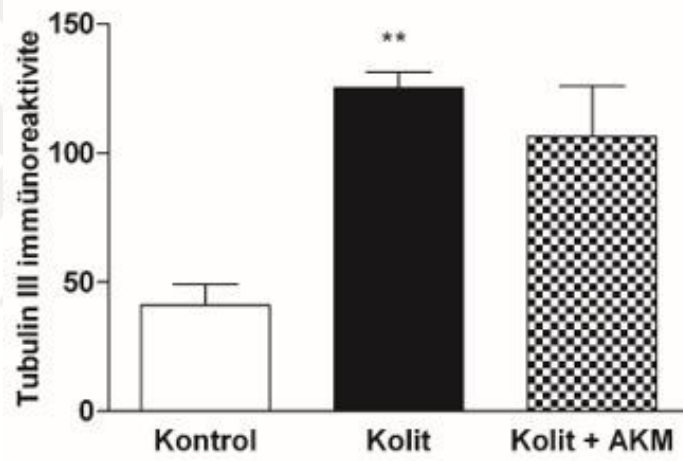
Şekil 18: GFAP immünoreaktivite Sonuçları. \* Kontrol grubuna göre  $P < 0.05$ , \*\* Kolit grubuna göre  $P < 0.01$ .



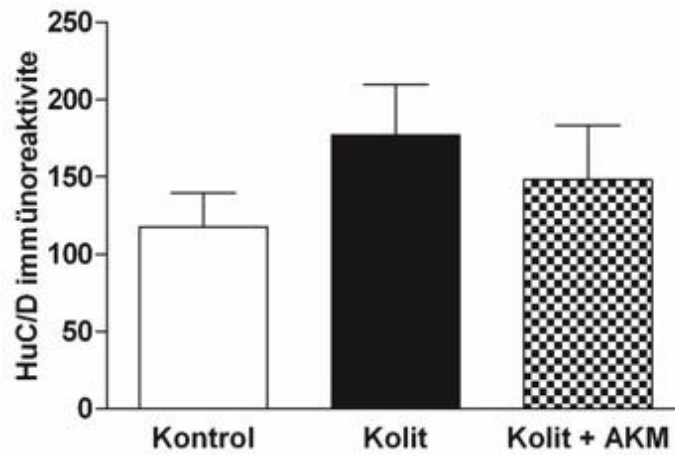
Şekil 19: Sox10 immünoreaktivite Sonuçları



Şekil 20: S100B immünoreaktivite Sonuçları. \* Kontrol grubuna göre  $P < 0.05$ , +++ Kolit grubuna göre  $P < 0.001$ .



Şekil 21: Tubulin III immünoreaktivite Sonuçları. \*\* Kontrol grubuna göre  $P < 0.01$

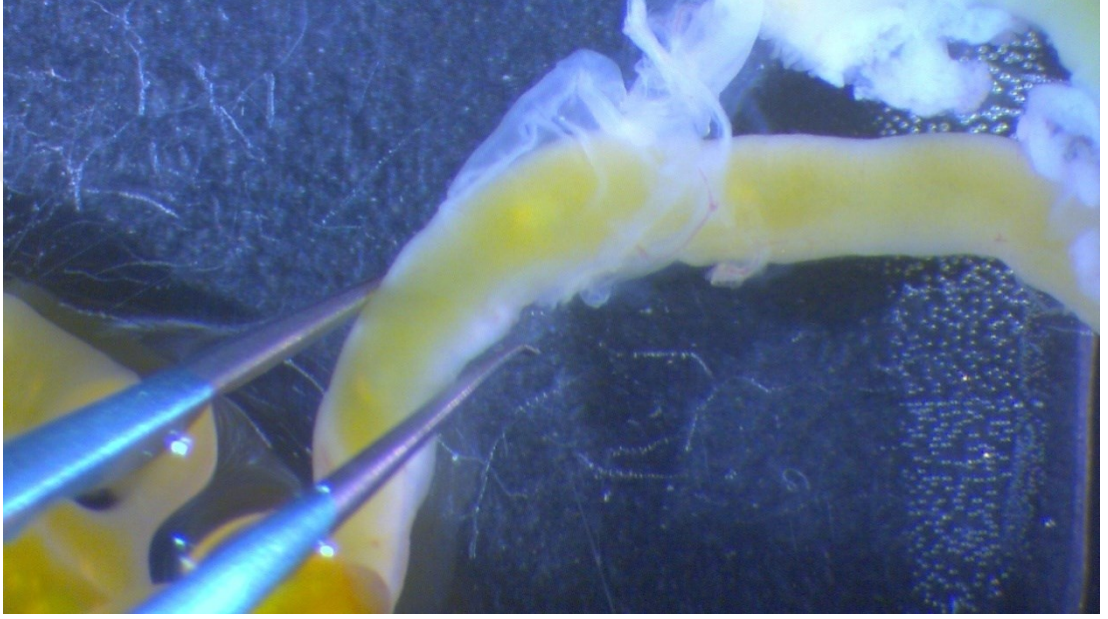


Şekil 22: HuC/D immünoreaktivite Sonuçları

#### 4.4 *İn vitro* Değerlendirme Sonuçları

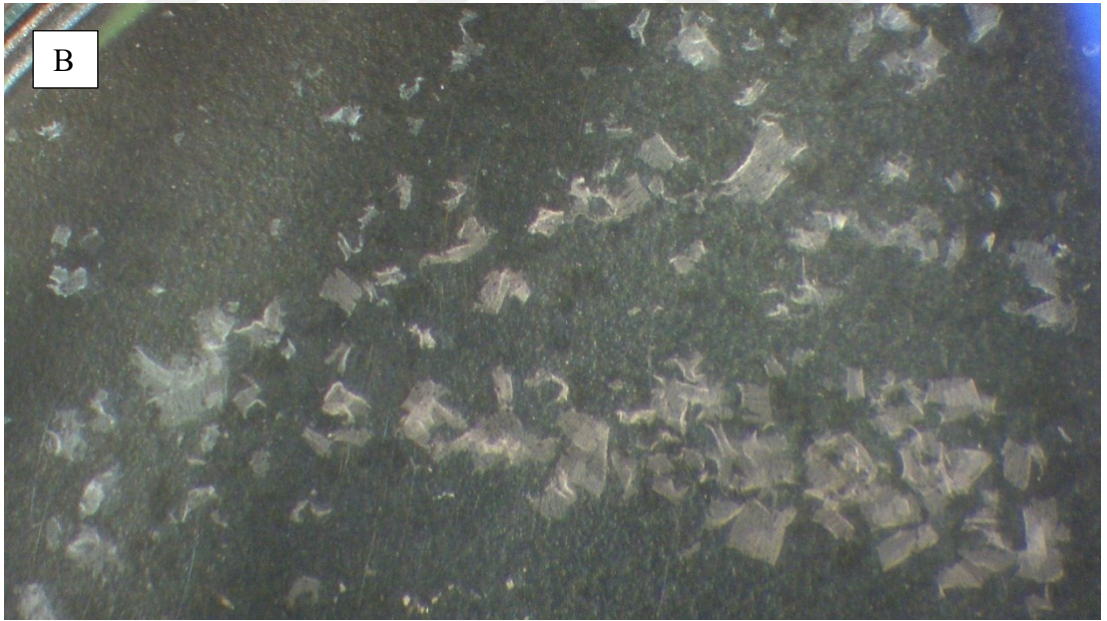
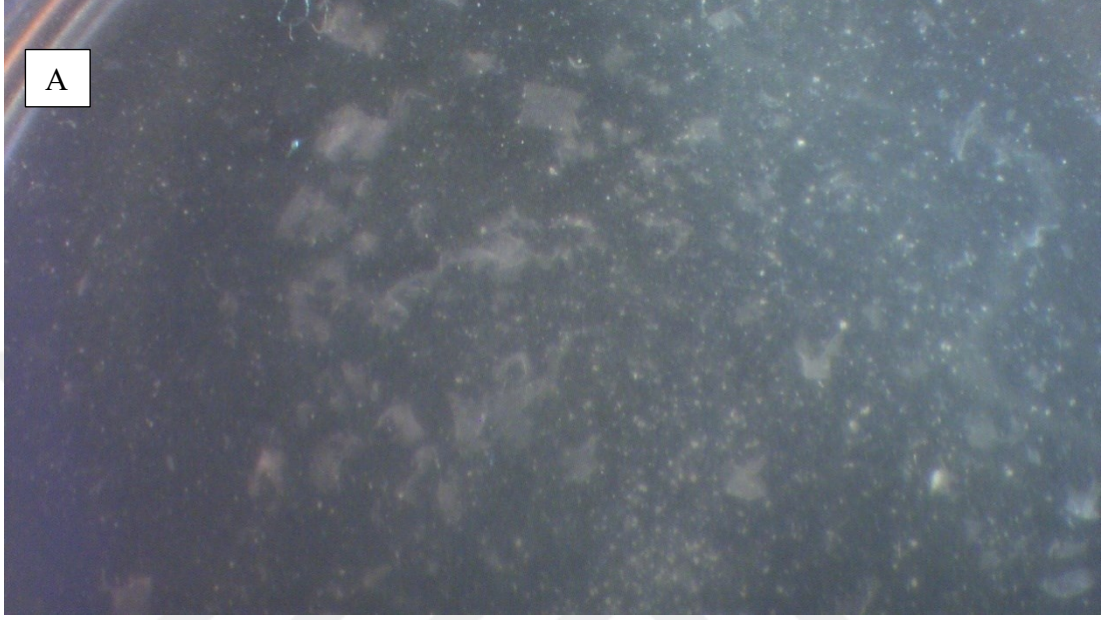
##### 4.4.1 Myenterik pleksus izolasyonu

Disekte edilen yenidoğan farelerden (1-3 günlük) elde edilen longitudinal kas tabakasında ışık mikroskopi altında myenterik pleksus izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Resim 5).



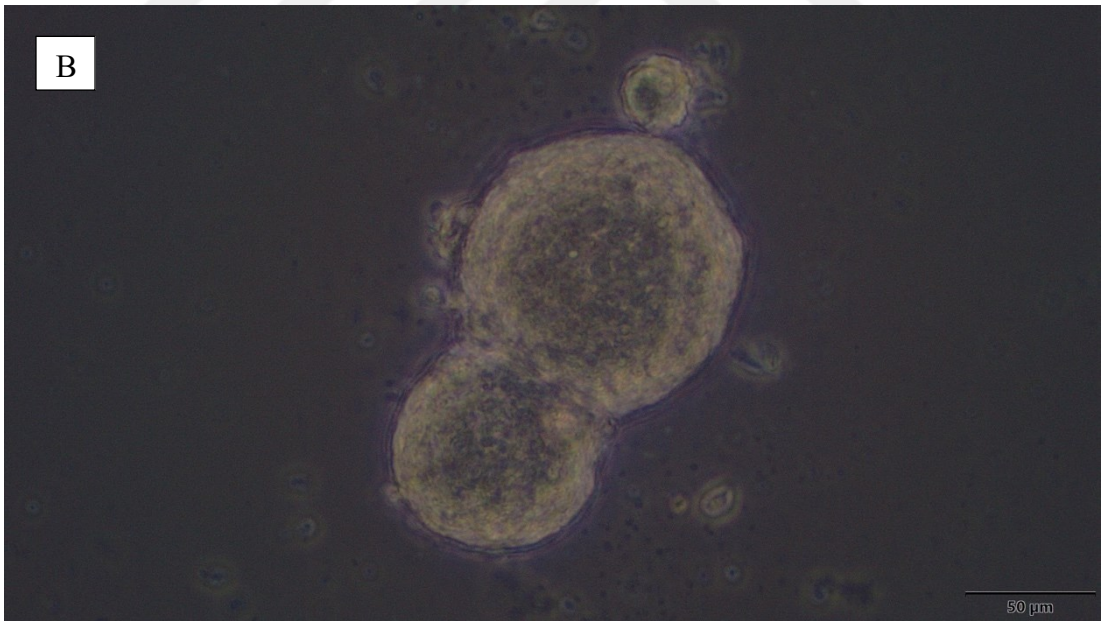
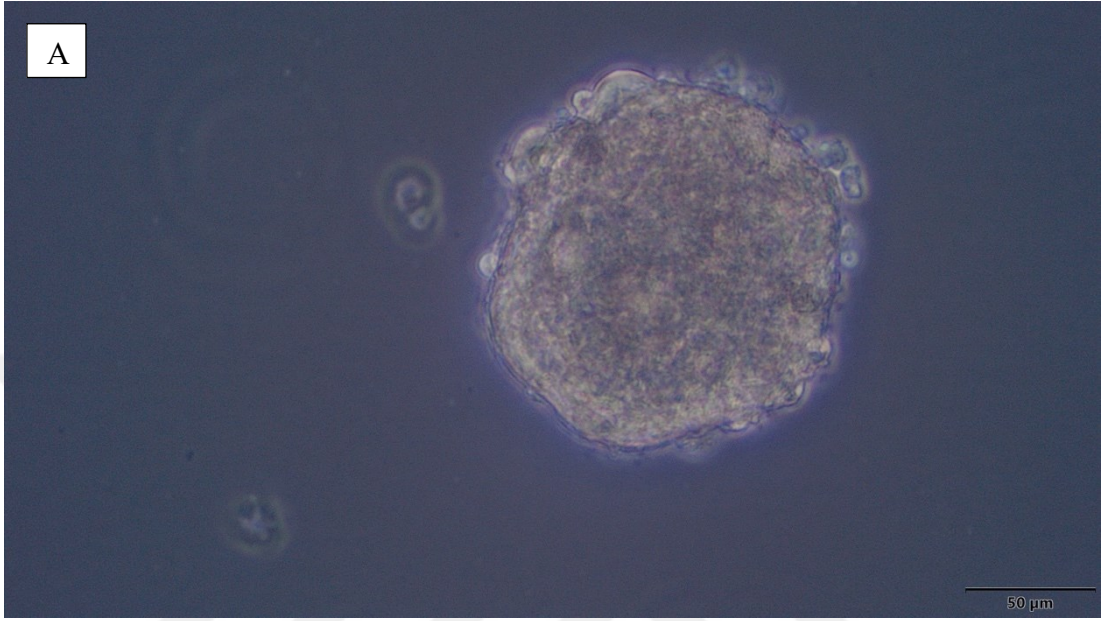
Resim 29: Diseksiyon Mikroskopi altında Post-natal Longitudinal Kas İzolasyonu

Disekte edilen longitudinal kas tabakası iki saat inkübasyon sonrasında sindirilmemiş arter, mezenterik yapı, sindirilmemiş kas yapısından arındırılarak saflaştırılmıştır (Resim 30A ve 30B).



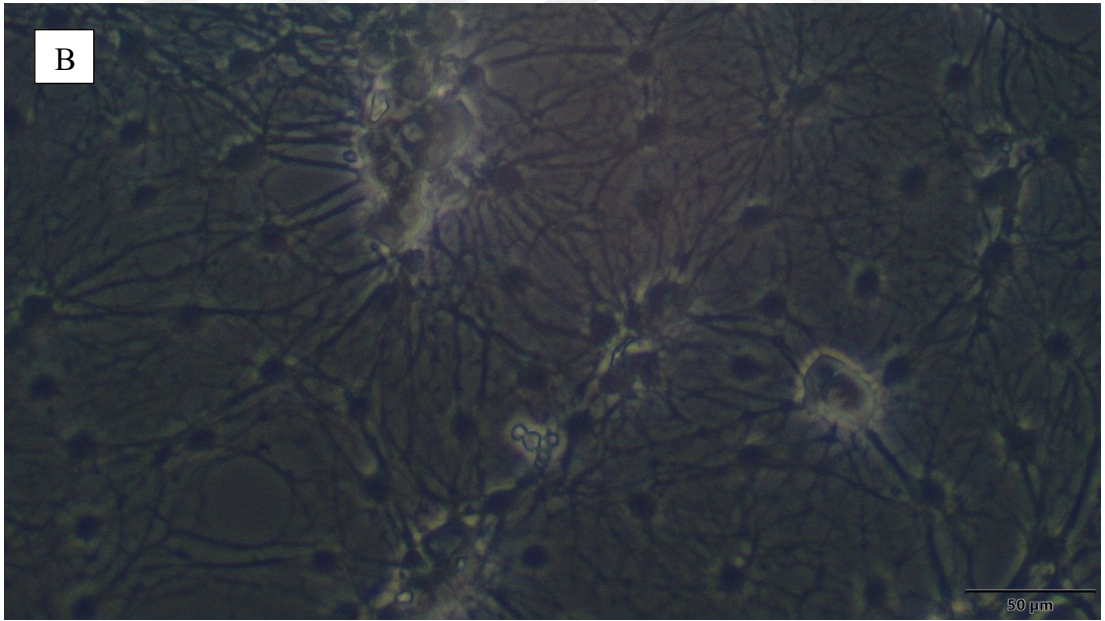
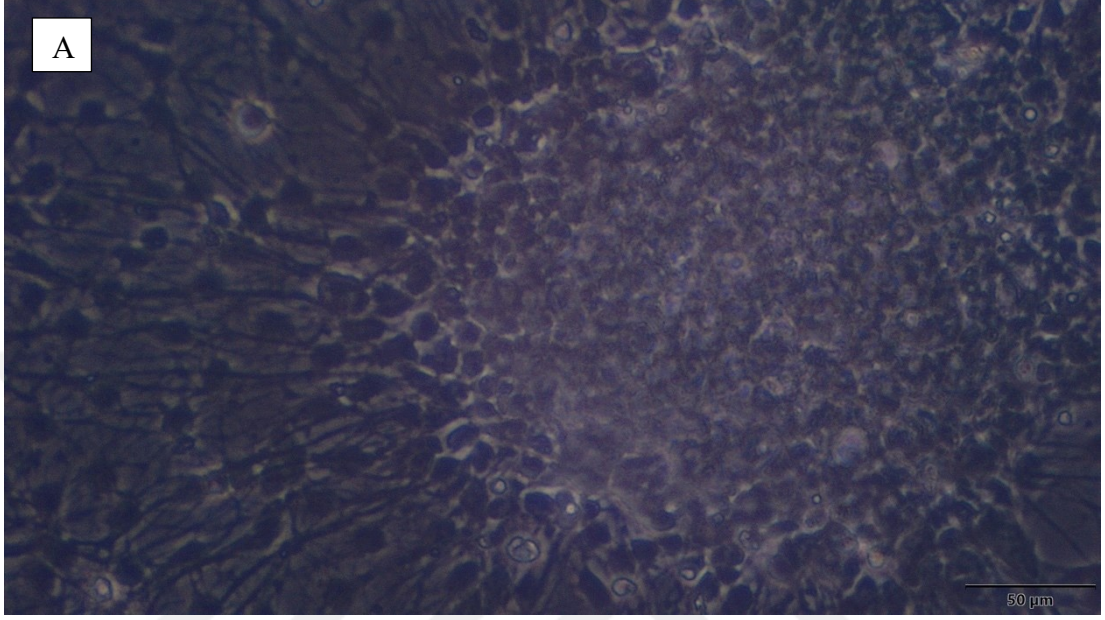
Resim 30: İnkübasyon Sonrası Görüntü. A: Saflaştırma Öncesi myenteric pleksus yapısı B: Saflaştırma Sonrası myenteric pleksus yapısı

Proliferasyon medya içinde proliferasyona bırakılan izole myenterik pleksus yapılarının 3. ve 6. günde nörosfer oluşumu Resim 31A ve Resim 31B’de gösterilmiştir.



Resim 31: Nörosfer Oluşumu. A: 3. Gün nörosfer oluşumu B: 6. gün nörosfer oluşumu

Nörosfer oluşumu tamamlandıktan sonra ECM kaplı kuyucuklarda differansiyasyon medya içinde inkübasyona bırakıldıktan sonra 3 ve 6. Günde hücre kültürü görüntüsü Resim 32A ve Resim 32B’de sırasıyla gösterilmiştir.



Resim 32: Differansiye Olmuş Nörosfer Yapıları

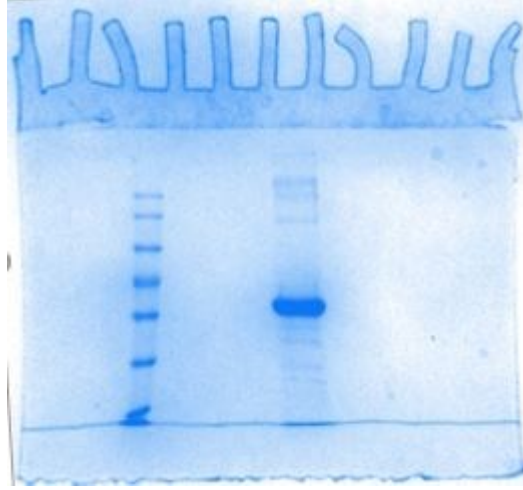
#### 4.4.2 Vezikül karakterizasyonu sonuçları

AmEV izolasyonu ve karakterizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. Toplanan bakterilerin değişen hızlarda döndürülmesi ile bakteri peleti elde edilmiştir (Resim 33).



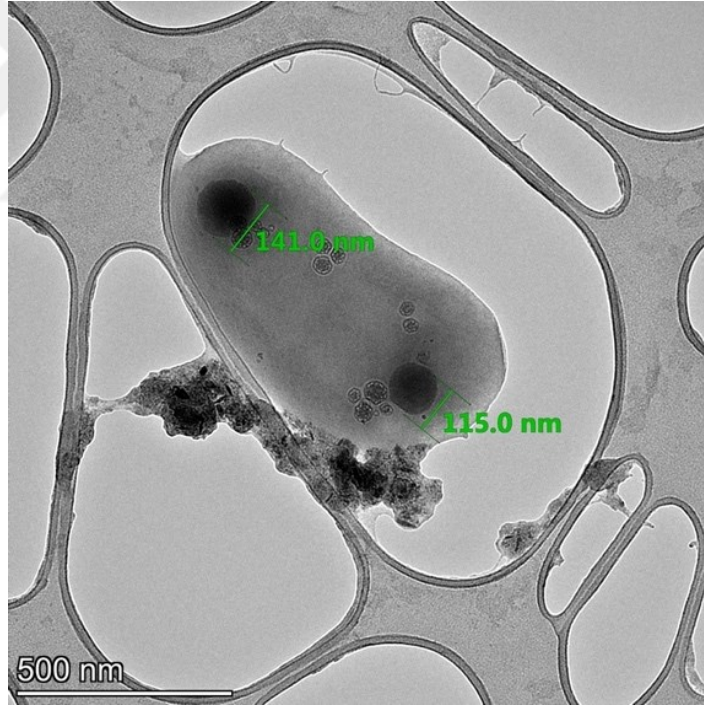
Resim 33: Ultrasantrifüj sonrası vezikül peleti

Elde edilen veziküllerin karakterizasyonu için SDS-PAGE ve TEM görüntüleme yöntemleri seçilmiştir. SDS PAGE yöntemi ile vezikül proteinleri %10'luk jelde yürütülmüş ve Coomassie mavisini boyama sonrası görüntüleri alınmıştır (Resim 34).



Resim 34: SDS PAGE görüntüsü

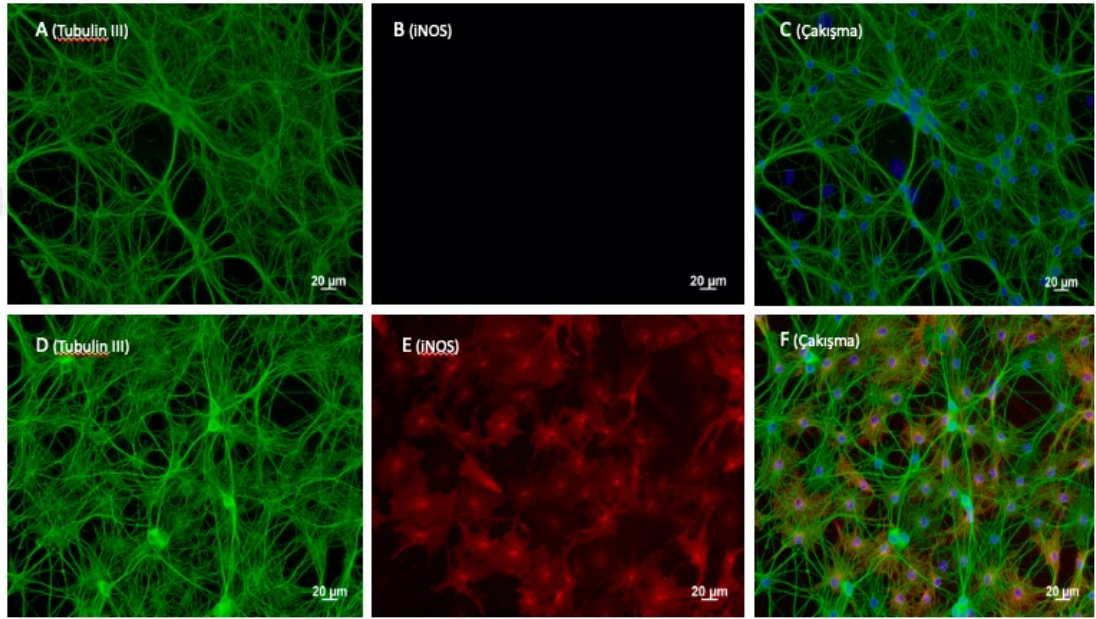
Veziküller daha sonra TEM görüntüleme ile değerlendirilmiş, sağlıklı ve uygun boyutlu olma durumlarına göre analiz edilmiştir (Resim 35).



Resim 35: TEM ile vezikül görüntüsü

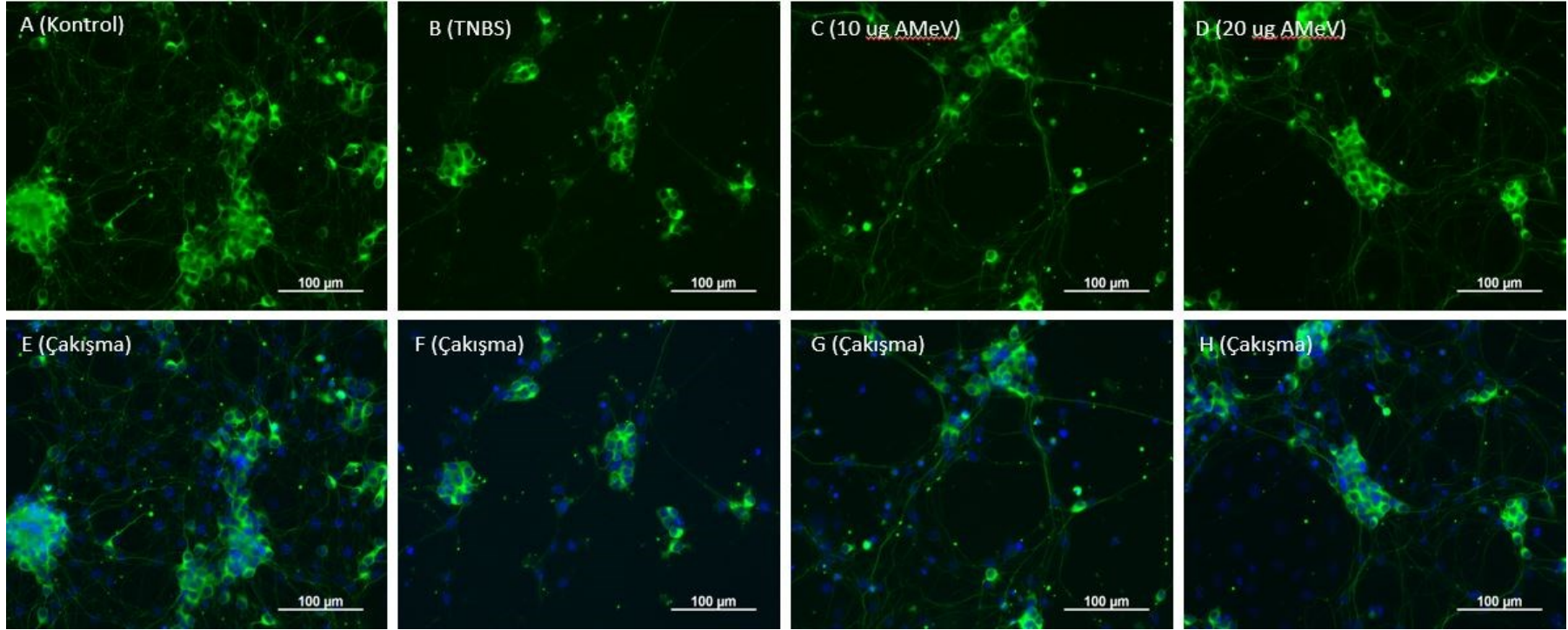
#### 4.4.3 Myenterik pleksus hasar sonuçları

*in vitro* olarak izole edilen Myenterik pleksus yapısında nöronal ağların histolojik değerlendirilmesi gösterilmiştir (Resim 36-38). Kontrol grubunda hasar göstergesi olarak iNOS2 ışınması gözlemlenmezken, sitokin kokteyli ile inkübe edilen kesitlerde iNOS2 ışınması belirgin bir şekilde artmıştır (Resim 36).

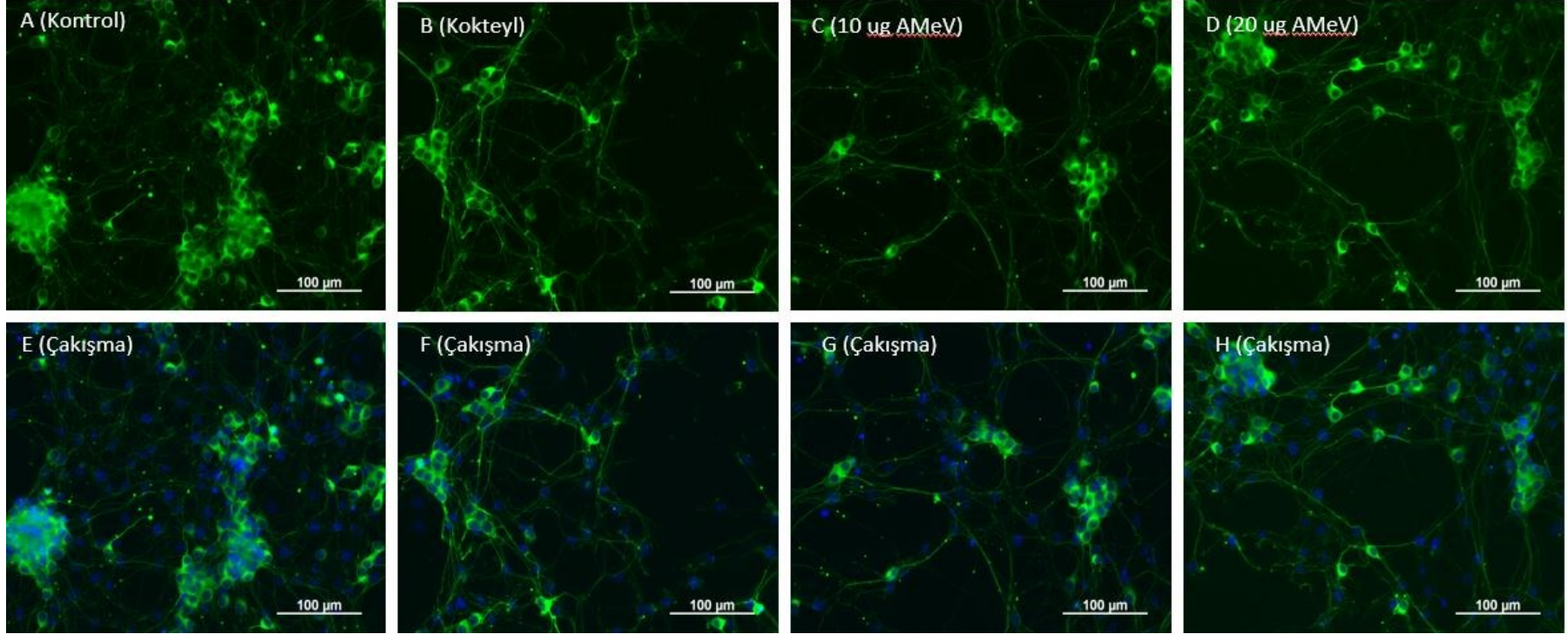


Resim 36: *in vitro* Hasar Görüntüleri. Tubulin III:Yeşil, Kırmızı: iNOS2, Mavi: DAPI

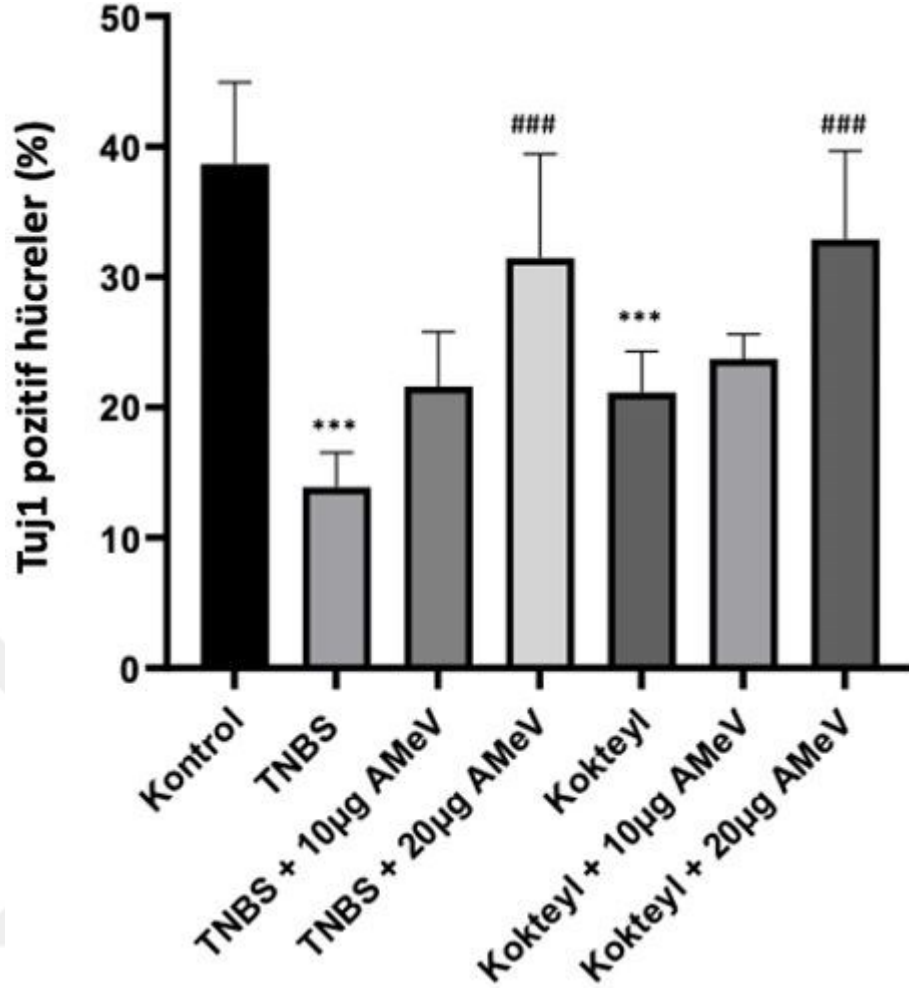
TNBS ile hasarlanan Myenterik pleksus kültüründe AMeV uygulaması sonrası Tubulin III immünoreaktivitesi değerlendirilmiştir (Resim 37). TNBS grubunda anlamlı olarak Tubulin III immünoreaktivitesi azalırken, tedavi ile anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Sitokin kokteyli ile hasarlanan kültürde ise yine aynı şekilde Tubulin III immünoreaktivitesi anlamlı bir şekilde azalmış, AMeV ile anlamlı bir artış elde edilmiştir. Tüm sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi Şekil 23'de gösterilmiştir.



Resim 37: *in vitro* TNBS ve AMeV Uygulaması. A: Kontrol Grubu Tubulin III İmmunoreaktivitesi B: TNBS Grubu Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: 10 µg AMeV uygulaması D: 20 µg AMeV uygulaması. E-H: Çakışma Görüntüleri.



Resim 38: *in vitro* Sitokin ve *A. muciniphila* Ekstraselüler Vezikül Uygulaması. A: Kontrol Grubu Tubulin III İmmunoreaktivitesi B: TNBS Grubu Tubulin III İmmunoreaktivitesi C: 10 ug *A. muciniphila* ekstraselüler uygulaması sonrası Tubulin III D: 20 ug *A. muciniphila* ekstraselüler uygulaması. E-H: Çakışma Görüntüleri



Şekil 23: *in vitro* Tubulin III immünoreaktivite sonuçları

## 5 TARTIŞMA

Yapılan çalışmada *A. muciniphila* tedavisinin TNBS ile indüklenen kronik kolit modelinde enterik hasar üzerine olan etkinliği değerlendirilmiştir. Araştırma *in vivo* ve *in vitro* düzeyde üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada kronik kolit modelinde *A. muciniphila*'nın inflamasyon parametreleri üzerine etkinliği değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonunda pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmiştir. Bunun yanında nötrofil infiltrasyonu için MPO ve NF-κB sinyal yolağı değerlendirilmesi yapılmış, istatistiksel olarak literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. İkinci aşamada kronik kolite bağlı *in vivo* myenterik plexus hasarının değerlendirilmesi için enterik nöron ve gliyal protein ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve histolojik analizler yapılmıştır. Deneysel sonucunda toplanan kolon doku örneklerinde gliyal hücreler ve enterik nöronlar üzerinde protein ekspresyon seviyelerinde pozitif ayrışmalar gözlemlenmiştir. Bu değişimler hematoksilen eozin boyama, konfokal mikroskopi ve elektron mikroskopi analizleri ile desteklenmiştir. Son aşamada ise kolite bağlı myenterik plexus hasarı üzerine *A. muciniphila* ekstraselüler veziküllerinin etkisi *in vitro* düzeyde değerlendirilmiştir. Post-natal farelerden izole edilen myenterik plexus yapısında hasar oluşturulmuş, *A. muciniphila* ekstraselüler vezikülleri uygulanması ile histolojik olarak anlamlı değişimler değerlendirilmiştir.

İBH patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber sitokin konsantrasyonundaki değişimler anahtar immünoregülatör olarak görev yapmakta, buna bağlı biyo-belirteç ve tedavi olarak kullanılabilir (168). T hücre aktivasyonuna bağlı salınan pro-inflamatuvar sitokinlerde dengesizlik ile İBH ilişkisi çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (169-171). Luminal antijenlerin algılanması ile T hücre aktivasyonu ve buna bağlı sitokin salınımında artış İBH progresyonunda yakından ilişkili olduğu aynı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle inflamatuvar sitokin konsantrasyonundaki değişimler inflamasyon sürecinde önemli bir yer tutmaktadır (172). Bu veriler ışığında İBH tedavisinde sitokinlerin hedeflenmesi ve sitokin yollarının blokajı üzerine çalışmalar sürmektedir (2).

Pro-inflamatuvar sitokin bazlı ajanların kullanımı İBH klinik tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır (173). Yapılan çalışmalarda İBH hastalarında anlamlı bir şekilde TNF- $\alpha$  artışı gözlemlenmektedir (2). Ek olarak İBH hastalarına ait mukoza ve lamina propria örneklerinde artmış TNF- $\alpha$ 'nın mukozal bağışıklık ve doku hasarında etkin olduğu gösterilmiştir (174,175). 2009 yılında Alex ve ark. in vivo akut ve kronik DSS ve TNBS kolit modellerinde sitokin profilleri incelenmiş ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonu anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (176). 2017 yılında Lin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise TNBS kolit modeli uygulanan sıçanlarda TNF- $\alpha$  konsantrasyonu anlamlı bir şekilde yine yüksek bulunmuştur (177). Günümüzde klinikte anti-TNF- $\alpha$  ajanları kullanılarak, kronik inflamasyonun baskılanması ve mukozal iyileşme hedeflenmektedir. Ancak, tedavinin yan etkilerinden dolayı potansiyel ajanlar ve tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

IL-6, İBH hastalarında bir diğer önemli pro-inflamatuvar sitokin olarak gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda Crohn hastalarında IL-6 konsantrasyonunda anlamlı bir artış bulunmuştur (2). Bunun yanında TNF- $\alpha$  inhibitörlerine dirençli hastalarda IL-6 konsantrasyonunun daha yüksek olduğu raporlanmıştır (178). Bu nedenle IL-6 pro-inflamatuvar sitokininin TNF- $\alpha$ 'dan bağımsız olarak inflamasyona neden olabildiği düşünülmektedir. Aynı zamanda hayvan çalışmaları da insan çalışmalarını destekler nitelikte İBH modellerinde IL-6 artışını göstermektedir (176,177). 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada akut TNBS modelinde IL-6 konsantrasyonunun anlamlı bir şekilde arttığı, anti-inflamatuvar etkinliği bilinen tedavi ile azaldığı gösterilmiştir (179).

IL-1 $\beta$ , sistemik ve lokal etkileri olan bir diğer önemli pro-inflamatuvar sitokindir. İBH hastalarında mukozadan lamina propria monositleri ve makrofajları tarafından salgılanmaktadır. Bunun yanında intestinal düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından da üretildiği bilinmektedir (180). Yapılan klinik çalışmalarda aktif İBH hastalarından alınan kolon örneklerinde yüksek IL-1 $\beta$  seviyeleri raporlanmıştır (181-184). Bunun yanında kolon dokusunda yüksek IL-1 $\beta$  seviyelerinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (185). Bu sonuçlar doğrultusunda lokal inflamasyonda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Klinik çalışmaların yayında in vivo

İBH modellemelerinde de kolon IL-1 $\beta$  seviyeleri yüksek bulunmuştur (186,187). Anti IL-1 $\beta$  ajanlarının uygulanması ile akut intestinal hasar ve inflamasyon modellerinde iyileşmeler gözlemlenmiştir (188,189). Bu çalışmaların yanında enfeksiyona bağlı olarak gelişen *Clostridium difficile* kolit ve *Salmonella typhimurium* enterit modellerinde IL-1 $\beta$  seviyelerinin intestinal inflamasyonda önemli bir parametre olduğu gösterilmiştir (190,191).

Bunların yanında IL-10, anti-inflamatuvar etkinliği olan önemli bir sitokindir (192). IL-10, inflamasyon ile oluşan hasarı ve immun cevapları inhibe ederek etkinliğini göstermektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda immünmodülatör olarak merkezi görev üstlenmektedir (193). IL-10 knockout veya IL-10 reseptör knockout fareler ile yapılan çalışmalarda erken dönem spontane kolit gelişimi gözlemlenmiştir (112). Bunun yanında Kühn ve ark. tarafından IL-10 knockout farelerde enterokolit gelişimi raporlanmıştır (63).

Çalışmamızda pro-inflamatuvar sitokin IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 ve anti-inflamatuvar IL-10 sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmada kronik kolit uygulaması ile TNF- $\alpha$  ve IL-6 belirgin şekilde artmış, *A. muciniphila* tedavisi ile anlamlı bir azalma gösterilmiştir. Sonuçları destekler nitelikte, anti-inflamatuvar sitokin IL-10 ise kolit grubunda azalırken, *A. muciniphila* tedavisi ile anlamlı bir artış sağlanmıştır. Bunların yanında IL-1 $\beta$  düzeyleri kolit grubunda artış, tedavi ile azalma göstermesine rağmen istatistiksel bir anlam kazanmamıştır. 2019 yılında Bian ve ark. tarafından *A. muciniphila*'nın DSS kolit modelinde etkinliği üzerine yapılan çalışmada anti-inflamatuvar etkinlik gösterdiği bulunmuştur (158). Bu sonuçlar literatürde çeşitli çalışmalar ile desteklenmiş olup, elde edilen sonuçları literatür ile uyumlu olarak göstermektedir (158, 194,195).

Sitokin salınımının yanında, nötrofil infiltrasyonu önemli bir inflamasyon göstergesidir (196). Patojenik veya irritan stimülasyon sonrası salgılanan sitokin ve kemokinler nötrofilleri uyarır, daha sonra uyarılan nötrofiller vasküler duvardan infiltre olarak inflamasyon alanına göç etmektedir. Bu göç mekanizması koruyucu etkinliklerin yanında doku hasarına neden olabilmektedir. Literatürde nötrofil

infiltrasyonu belirteci olarak MPO aktivitesi önemli bir parametredir (197). Kolon mukozasından inflamasyon durumunda salgılanır ve dokudaki konsantrasyon değişimi kolonda nötrofil akümülyasyonunu göstermektedir (198). 2012 yılında yapılan bir araştırmada MPO aktivitesindeki değişimlerin inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tedaviye bağlı mukozal iyileşme ile MPO aktivasyonunda anlamlı azalma bulunmuştur (199). Yapılan çeşitli çalışmalarda TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde MPO artışı gösterilmiş, artan kolonik inflamasyon belirteci olarak kullanılmıştır (200). 2017 yılında Lin ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada TNBS kolit modelinde MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (177).

Çalışmamızda ise kolit grubunda kontrol grubuna göre MPO konsantrasyonu anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bunun yanında tedaviyle anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Diğer taraftan nötrofil infiltrasyonu göstergesi olarak değerlendirilen MPO, *A. muciniphila* tedavisi ile anlamlı bir azalma göstermiştir. TNBS uygulaması sonrası salgılanan sitokinler ve kemokinlere bağlı olarak nötrofiller vasküler duvardan infiltre olarak hasar bölgesine göç etmektedir. Bu göç sırasında MPO enzimi salınımını arttırmaktadır. *A. muciniphila* tedavisi ile MPO aktivasyonunda azalma olmasının yanında değerlendirilen sitokinlerdeki değişimlerinin de bu sonuçları desteklemesi potansiyel terapötik etkinliğini göstermektedir.

NF- $\kappa$ B inflamatuvar cevapta merkezi bir yol oynayan transkripsiyon faktörüdür. İnflamatuvar süreçte pro-inflamatuvar sitokin genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir (202). NF- $\kappa$ B p65 alt ünitesinin ekspresyonunun artması ile inflamatuvar sürecin başladığı çalışmalar ile desteklenmiştir (177,202,203). 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada ise İBH etiyolojisinde önemli bir parametre olduğu, artışının inflamasyon yanıtında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (204). Bunun yanında Quaglio ve ark. tarafından NF- $\kappa$ B sinyal yolağı aktivasyonunun TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 salınımını indüklediği bir çalışmada bulunmuştur (205). 2017 yılında Zhao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *A. muciniphila* supplementasyonunun NF- $\kappa$ B inhibitör protein ekspresyonunu arttırarak NF- $\kappa$ B aktivasyonunu azalttığı bulunmuştur (206). Metabolik inflamasyonu azalttığı ve potansiyel terapötik etkinlik gösterdiği de aynı çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda da p65 alt ünitesinin protein

ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş, TNBS grubunda anlamlı olarak artış ve tedavi ile azalma görülmüştür. Bu sonuçlar literatür ile uyumlu olup, *A. muciniphila*'nın anti-inflamatuvar etkinliğini NF- $\kappa$ B sinyal yolağını inhibe ederek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Çalışmanın inflamatuvar sonuçlar değerlendirildiğinde TNBS ile uygulanan kronik kolit modelinde potansiyel *A. muciniphila* etkinlik mekanizmasının NF- $\kappa$ B yolağı inhibe edilmesi ile pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını ve nötrofil infiltrasyonunu önlemesi ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

İBH'nin patogenezinde çeşitli yaklaşımlar olmasına rağmen, bağırsak permeabilite bozulmasının önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Yayınlanan çalışmalar intestinal permeabilite bozukluklarının önemli bir etken olabileceğini desteklemektedir. (207,208). Diğer taraftan ağırlık kazanan bu yaklaşımla bazı araştırmacılar İBH'yi bozulmuş bariyer bütünlüğü hastalığı olarak da tanımlamaktadır (209). Bozulmuş intestinal epitel bariyer fonksiyonunun ve buna bağlı geçirgenliğin bozulmasının inflamatuvar hastalıklara neden olabildiği ve hastalığın atak döneminde etkili olduğu gösterilmiştir (210,211). Bu bozulmaların sıkı bağlantı proteinleri olarak adlandırılan multiprotein komplekslerinde oluşan anormalite ile ilgili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (106,107). 2015 yılında yayınlanan in vivo çalışmada temel sıkı bağlantı proteinlerinden olan Klaudin-7'nin genetik olarak delesyonu ile mukozal inflamasyonun arttığı bulunmuştur (212). Farklı çalışmalar ile İBH modellerinde ve hastalarında intestinal bariyer bütünlüğünü sağlayan goblet hücrelerinde sayıca azalma ve hasar olduğu gözlemlenmiştir (213,214).

Bunun yanında bariyer bütünlüğündeki bozulmalara bağlı bağırsak geçirgenliğinin değişiminin Crohn patogenezinde erken bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (215). Atak evresinde olmayan ve endoskopik bulgusu bulunmayan bireylerde de geçirgenliğin etkisi raporlanmıştır. Ek olarak aynı çalışmada Crohn hastalarından alınan biyopsi örneklerinde geçirgenliğin anlamlı bir şekilde arttığı yine gösterilmiştir 2012 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise in vivo Crohn hastalığı modellerinde hastalığın gelişiminden önce geçirgenliğin arttığı bulunmuştur (216).

LPS gram negatif bakterilerin yüzeyinde bulunan toksik bir bileşendir. Hücre hasarına bağlı içeriğinde bulunan endotoksin molekülü aktifleyerek endotoksinemi kaskatını başlatmaktadır. Toll benzeri reseptör-4 reseptörleri üzerinden ise sitokin salınımı ve kaspaz aktivasyonunu başlatmaktadır (217). Yapılan çalışmalarda İBH hastalarında intestinal bariyer bozulmasına bağlı olarak mikrobiyota tarafından üretilmiş LPS'nin kan akımına geçtiği gösterilmiştir. Buna durumun metabolik endotoksemiye neden olduğu ve İBH obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (218-220). İBH hastalarında artan geçirgenliğe bağlı LPS artışının NFκB aktivasyonuna neden olduğu, IL-1, IL-6, and TNF-α gibi sitokinlerin salınımını arttırdığı gösterilmiştir (221).

Yapılan çalışmada geçirgenlik değerlendirilmesi için periyodik aralıklar ile toplanan kan örneklerinde LPS analizi yapılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda TNBS grubunda LPS anlamlı bir şekilde deney sonuna kadar artış bulunmuştur. 3.haftada başlanan tedavi sonrasında deney sonuna kadar LPS anlamlı bir şekilde azalmış, tedavinin etkinliğini gösterilmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumlu olup, *A. muciniphila* tedavisinin çarpıcı etkinliğini göstermektedir (13).

İBH hastalarında mukus üretiminden sorumlu goblet hücrelerinde azalma olduğu bilinmektedir (222,223). Bunun yanında epitel yüzeyde dökülme ve hasar farklı çalışmalar ile de desteklenmiştir (224,225). Çalışmada histolojik incelemelerde TNBS grubunda epitel dökülme, goblet hücrelerinde belirgin azalma ve vazokonjesyon gözlemlenmiştir. Tedavi ile TNBS grubuna göre epitel yüzeyinde iyileşme ve goblet hücreleri sayısında artış bulunmuştur. Buna ek olarak yapılan taramalı elektron mikroskopi sonuçlarında TNBS grubunda kontrol grubuna göre epitel hücreler arası ayrılma ve belirgin çukursu dejenere yapılaşma gözlemlenmiştir. *A. muciniphila* tedavisi ile epitel hücreler arası ayrılma azalmış, dejenere yapılar daha az olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir (226,227). Elde edilen sonuçlar TNBS kolit uygulaması sonrası histolojik olarak epitel yapının bozulduğu, geçirgenliğin artarak pro-inflamatuvar sitokin salınımını arttırdığını göstermektedir. *A. muciniphila* tedavisi ile goblet

hücrelerinin sayısının arttığı ve epitel yapının iyileşmeye başladığı gözlemlenmektedir.

Enterik sinir sistemi gastrointestinal sistemi sinir lifleri ile inerve etmekte ve intrinsik kontrolden sorumludur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bulgular enterik sinir sisteminin İBH patogeneğinde muhtemel bir rolü olduğunu desteklemektedir (228,229). Enterik nöron ve gliya hücrelerinin inflamasyon durumunda savunmaya geçerek hasardan korunmaya çalıştıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada enterik gliyal hücrelerinin inflamasyon durumunda enterik nöronların ölümüne neden olduğunu göstermektedir (228). Çalışma sonuçlarında inflamasyon sırasında salgılanan pürinler, nöronların panneksin-1 kanallarını aktive eden P2X7 reseptörlerini uyarmaktadır. Daha sonra nöronlar gliyal hücreler üzerindeki P2Y1 reseptörlerini uyaran pürinleri salgılamaktadır. Bu reseptörler gliyal hücreleri aktive eder ve plazma membranlarında konneksin-43 hemikanallarını açan ve daha fazla pürinin salınmasına izin veren nitrik oksit sentezlemek üzere indüklenmektedir. Gliyal pürinler daha sonra nöronları ölüme sürüklemektedir (230,231).

İBH hastalarında enterik nöron sayısında azalma, nörotransmitter sentezinde ve gliyal hücre sayısında değişim, myenterik gangliyonit olarak raporlanmıştır (232). Aynı zamanda enterik nöron hiper-uyarılabilir, sinaptik aktivite artışı, azalmış inhibitör nöromusküler geçiş çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (233-234). Bu sinir sistemi üzerindeki değişimler myenterik nöron kaybına ve buna bağlı olarak uzun süreli kolon motor aktivitesinde bozulmalara neden olmaktadır. Bunun yanında farklı çalışmalar inflamasyona bağlı nöroplastisitenin enterik nöron sayısı arttırabildiğini de göstermektedir. Bu artış ile bozulmuş intestinal motiliteyi düzenlemeye çalışılmaktadır (25,234). Bunun yanında inflame olmamış bağırsak bölgelerinde de motilite bozuklukları gözlemlenmektedir. Bozulan motilitenin yanında inflamasyona bağlı sekresyon da etkilenmektedir. Aynı çalışmada TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde inflame olmamış ileum bölgesinde non-kolinerjik sekresyon anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (235). Deneysel kolit modellerinde de enterik sinir sistemi anormallikleri çeşitli çalışmalar ile desteklenmiştir. Linden ve ark. yayınladığı

bir çalışmada TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde nöronların %20 oranında azaldığını ve artan nötrofil infiltrasyonunu göstermektedir. Aynı sonuçlar Sanovic ve ark. tarafından da desteklenmiştir (236). Ek olarak inflamasyonun sonlandırılmasına rağmen aşırı-uyarılabirlik uzun süre devam etmektedir. Buna bağlı olarak enfeksiyon sonrası irritable bağırsak sendromuna neden olabileceği belirtilmektedir (237,238).

Çeşitli çalışmalar ile enterik nöron ve gliyal hücrelerin inflamasyon durumunda protein ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirilmiştir. Gliya hücrelerinden salınan spesifik bir protein olan GFAP, gliyal hücrelerin işaretlenmesi ve hasar parametresi olarak kullanılmaktadır (239) İnflamasyon sürecinde in vivo ve in vitro deneylerde gliyal marker GFAP ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmektedir (240). Aynı zamanda İBH hastalarından alınan örneklerde GFAP ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı raporlanmıştır (32,37,133). Crohn hastalarından alınan biyopsi örneklerinde de GFAP artışı anlamlı bir şekilde gösterilmiştir (241). S100B enterik gliyal hücrelerde salgılanan bir diğer spesifik bir S100 grubu proteindir. Kalsiyum bağlayıcı protein olarak işlev görerek enterik gliya gelişim ve değişiminde etkinlik göstermektedir. Enterik gliyal hasarın değerlendirilmesi için kullanılan bir diğer belirteçtir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda S100B ekspresyonunun İBH hastalarından alınan fekal örneklerde belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (242). Buna karşın farklı çalışmalarda uygulanan TNBS kolit modelinde S100B ekspresyonunun azaldığı da gösterilmektedir (243).

Beta Tubulin III sadece nöronlar ve testis tarafından salgılanan tubulin ailesine ait bir proteindir. Nöronal hasar ve genel değerlendirme için ekspresyon değişimleri değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda akut TNBS uygulaması sonrasında Beta tubulin III ekspresyonu anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (244). Bunun yanında beta tubulin III ekspresyonunun gastrointestinal inflamasyon ve kanser belirteci olarak arttığını gösteren çalışma da bulunmaktadır (245). HuC/HuD enterik nöron değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer proteindir. Nöronal RNA bağlayan protein olarak işlev görmekte, merkezi ve periferik sinir sistemi gelişiminde görev almaktadır (246). 2014 yılında DNBS ile indüklenen kolit modelinde yapılan bir çalışmada HuC/HuD protein ışına yoğunluğunun değişmediği gösterilmiştir. Buna

karşın 2015 yılında yayınlanan farklı bir çalışmada TNBS ile indüklenen kolit modelinde HuC/D ile işaretlenen nöron yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bunun yanında gine domuzu üzerinde yapılan TNBS kolit araştırmalarında HuC/D nöron ışımada azalma bulunmuştur (25,247). Fare üzerinde yapılan çalışmalar da bu sonuçları desteklemektedir (37).

Yapılan *in vivo* protein analizi sonuçlarında GFAP ekspresyonu TNBS grubunda anlamlı bir şekilde artmış, tedavi ile istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. Histolojik olarak yapılan değerlendirmelerde yine aynı şekilde GFAP ekspresyonu değişimi protein analizleri ile uyumlu şekilde gözlenmiştir. Bu sonuçların yanında diğer gliyal belirteçler S100B ve Sox10 proteinlerinin histolojik incelemesi sonuçları da hasar ve tedavi etkinliğini göstermektedir. Bu sonuçlar TNBS uygulaması sonrası enterik hasarın arttığını ve enterik gliosis gelişimini göstermektedir (248,249). Bunun yanında aynı çalışmalarda yavaş gelişen nöronal hasar ile de ilişkilendirilmektedir. Enterik gliya hücreleri üzerinde yapılan veri analizleri literatür ile uyumlu olmakta olup, tedavinin etkinliğine bağlı değişimleri anlamlı bir şekilde bulunmuştur. Bunun yanında *A. muciniphila* tedavisinin enterik gliyal hücreler üzerine etkinliği daha önce gösterilmemiştir, literatüre ilk çalışma olacaktır.

Enterik nöronlarda Tubulin III ekspresyonu değerlendirildiğinde TNBS grubunda protein ekspresyonu istatistiksel artmış, tedavi ile anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum akut TNBS modelinde azalması beklenen tubulin III ekspresyonunun kronik modelde etkilenmediğini göstermektedir. Kronik olarak uygulanan TNBS kolit modelinin süregelen hasara karşı tepkisi olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda akut olarak uygulanan modellemelerde inflamasyona bağlı motilite bozukluğu ve nöroplastisite değişimi gözlemlendiği raporlanmıştır. Buna karşın, 2015 yılında Mawe ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada uzun süreli motilite bozukluğunun önüne geçmek için enterik nöron ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu nedenler göz önüne alınarak enterik nöron hasarına bağlı problemlerin önüne geçmek için kronik TNBS kolit modelinde Tubulin III ekspresyonunun protein analizlerinde azalmadığı düşünülmektedir. Bunun yanında immunofloresan görüntülemelerinde Tubulin III ekspresyonunda TNBS grubunda artış gözlemlenirken, tedavi ile bir değişim

gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar istatistiksel anlam kazanmamıştır. Bu sonuçlar literatürde daha önce kronik TNBS kolit ve enterik nöron üzerine çalışmamış olan etkinlik üzerine önemli bir katkı sağlayacaktır. Bunun yanında bir diğer nöronal belirteç olarak kullanılan HuC/D, protein ve histolojik analizler sonrasında istatistiksel bir değişim göstermemiştir. HuC/D sonuçları literatür ile uyumlu olup, beklenildiği üzere anlamlı bir değişim göstermemiştir. *A. muciniphila* tedavisinin enterik nöronlar üzerine etkinliği daha önce gösterilmemiştir, literatüre önemli bir katkı olacaktır.

İBH'de enterik sinir sistemi yapısal olarak incelendiğinde gangliyon hücre ve sinir ağı dejenerasyonu ve nekroz eşlik etmektedir. Yapılan çalışmalar İBH hastalarında enterik sinir sisteminde genişlemiş akson uçları, vakuolleşme, mitokondri deformasyonu ve nörofibril yoğunlaşması ile karakterize olduğunu göstermektedir (250). Deneysel kolit modellemelerinde ise aksonal hiperatrofi ve nöronal hücre ölümü raporlanmıştır (251). Bu sonuçlar çalışmamızda ışık mikroskopi altında ile incelenen myenterik pleksusta da gözlenmiştir. Hematoksilen eozin boyama ile incelenen TNBS grubunda dejeneratif bulgular, vakuolleşme ve genişlemiş akson yapıları gözlemlenmiştir. Tedavi grubunda ise TNBS grubuna göre minimal akson genişlemesi ve kontrol grubuna benzer bulgular elde edilmiştir. Ultrastrüktürel inceleme sonucunda ise TNBS grubunda dejenere akson sonlanmaları ve kolajen düzensizlikleri bulunurken, tedavi ile daha az dejenere akson sonlanmaları ve belirgin sayıda normal morfolojiye sahip nöron gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar 2014 yılında Moynes ve ark. tarafından yayınlanan derleme ile uyumlu olduğu görülmektedir (252). 2021 yılında Dora ve ark. tarafından in vivo DSS kolit modelinde de yapılan çalışma ile desteklenmiştir (253). Bu veriler doğrultusunda uygulanan TNBS kolit modelinde myenterik pleksus hasarının oluştuğunu ve tedavi ile iyileşme parametrelerinde olumlu yönde değişimler olduğu gösterilmektedir.

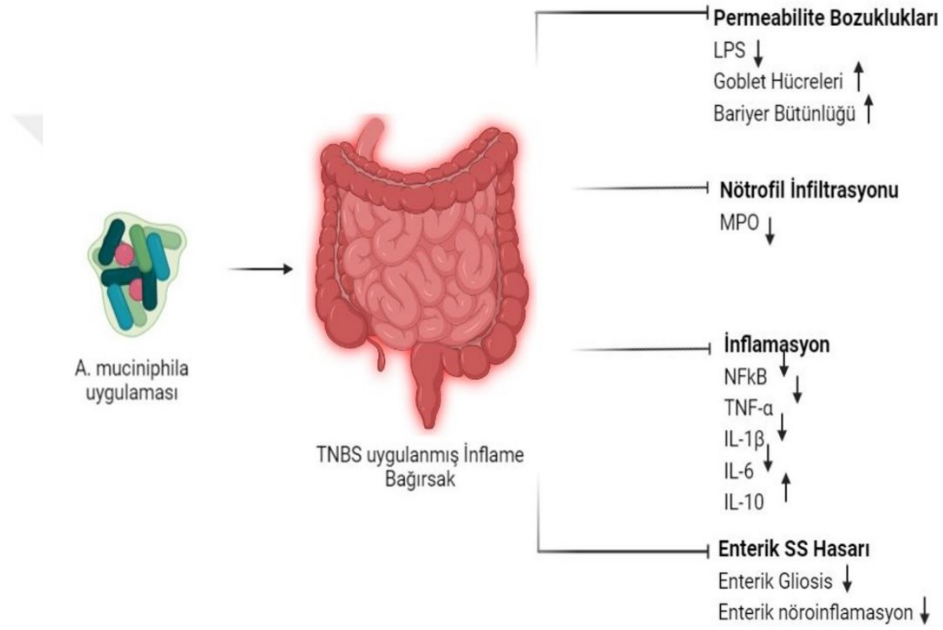
2014 yılında Muller ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışmada enterik nöronlar ve immun hücreler arasında bilinen türde nöron-sinaps ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Enterik nöronlar ve makrofajlar arasında kemik morfogenetik protein (BMP2) ve koloni uyarıcı faktör 1 (CSF-1) salınımı ile inflamasyon sürecinde iletişimde oldukları bulunmuştur (142). 2019 yılında Cipriani ve ark. makrofajların öneminin ve enterik

nöron ilişkisinin değerlendirilmesi için  $Csf1^{op/op}$  fareleri kullanmıştır. Araştırma sonucunda enterik nöron ve muskularis makrofaj ilişkisinin gelişim-olgunlaşma döneminde etkinliğini gösterdiği bulunmuştur (254). Bu sonuçlar 2018 yılında yayınlanan farklı bir çalışmada desteklenmiş, muskularis makrofaj ve ESS ilişkisinin post-natal dönemde geliştiği ve çevresel faktörlerden etkilendiğini göstermiştir (255). Bu yolağın daha önce kronik TNBS modelinde çalışılmamış olması nedeniyle çalışmamızda CSF-1 değerlendirmesi yapılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu nedenle diğer sonuçlar göz önüne alındığında TNBS ile indüklenmiş kronik kolit modelinde immün hücreler ve enterik sinir sistemi hasarında mekanizmanın farklı bir yol ile ilerlediği düşünülmektedir.



## 6 SONUÇ

Yapılan çalışmada kronik TNBS kolit modelinde *A. muciniphila*'nın potansiyel terapötik etkinliği üç hedef üzerinde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda *A. muciniphila*'nın bağırsak permeabilitesini düzenleyerek anti-inflamatuvar bir yolak başlattığı düşünülmektedir. Tüm veriler Şekil 23'te özetlenmiştir.



İllüstrasyon: Özgür Yılmaz, 2021

Şekil 24: *A. muciniphila*'nın Etkinlik Sonuçları

Tüm veriler değerlendirildiğinde TNBS ile uygulanan kronik kolit modelinde beklenildiği üzere epitel hasara bağlı permeabilite artışı bulunmuştur. Permeabilite artışına bağlı olarak mikobiyal toksin olan LPS kan dolaşımına geçmiştir. İntestinal permeabilitenin bozulması ile bariyer bütünlüğünü düzenleyen özelleşmiş hücrelerden goblet hücrelerinin histolojik olarak azaldığı bulunmuştur. Bunun yanında TEM ile yapılan değerlendirme sonrası epitel hücreler arası ayrılmanın artışı kullanılan modelde bariyer bütünlüğünün bozulduğunu ve geçirgenliğin arttığını desteklemektedir. Tedavi sonrası hasar parametrelerinde anlamlı düzelmelerin

görülmesi ve sonuçların literatür ile uyumlu olması nedeniyle *A. muciniphila* tedavisinin İBH hastalarında potansiyel bir terapötik etkinliği olabileceği düşünülmektedir. Etki mekanizmasının goblet hücre sayısını arttırarak mukus üretimini düzenlediği, buna bağlı olarak geçirgenliği azaltarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Bunun yanında TNBS uygulaması sonrası nötrofil infiltrasyonu göstergesi MPO anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu sonucun yanında inflamasyon kaskadının başladığı NFκB ve sitokin salınımındaki anlamlı değişimler gösterilmiştir. *A. muciniphila* tedavisi ile MPO ve NFκB anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bunun yanında sitokin konsantrasyonundaki olumlu yönde anlamlı değişimler gözlemlenmiştir.

Çalışmanın ikinci hedefi doğrultusunda TNBS uygulaması sonrası enterik nöron ve gliya hücreleri protein ekspresyon seviyeleri ve histolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. TNBS uygulaması ile oluşan enterik nöron hasarı ve gliosis literatüre uyumlu olarak belirlenmiştir. *A. muciniphila* tedavisi ile enterik gliya ve nöron hasarı üzerinde iyileşme yönünde çarpıcı sonuçlar bulunmuştur. *A. muciniphila*'nın bağırsak bütünlüğünü düzenleyerek nöroinflamatuvar süreci engellediği düşünülmektedir. Bu çalışma *A. muciniphila*'nın enterik nöron ve gliya hasarı üzerinde etkinliğinin incelendiği ilk çalışmadır. İleri çalışmalar ve bu sonucu destekler nitelikte farklı araştırmaların gelişimi ile İBH hastalarında önemli bir terapötik seçenek olabilecektir.

## 7 KAYNAKLAR

1. Hanauer S. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006; 12: 3-9.
2. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):329-342.
3. Mehta S, Silver A, Lindsay J. Review article: strategies for the management of chronic unremitting ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;38(2):77-97.
4. Podolsky D. Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(6):417-429.
5. Lakatos P. Is the disease course predictable in inflammatory bowel diseases? *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(21):2591.
6. Sandborn W, Feagan B, Wolf D, D'Haens G, Vermeire S, Hanauer S, Ghosh S, Petersen A, Hua SY, Lee JH, Charles L, Chitkara D, Usiskin K, Colombel F, Laine L, Danese S. Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(18):1754-1762.
7. Stallmach A, Hagel S, Bruns T. Adverse effects of biologics used for treating IBD. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010;24(2):167-182.
8. Walsh D, McCarthy J, O'Driscoll C, Melgar S. Pattern recognition receptors Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2013;24(2):91-104.
9. Lee J, Lee K. Endoscopic Diagnosis and Differentiation of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Endoscopy*. 2016;49(4):370-375.
10. Hilsden R, Verhoef M, Best A, Pocobelli G. A national survey on the patterns of treatment of inflammatory bowel disease in Canada. *BMC Gastroenterology*. 2003;3(1).
11. Derrien M, Vaughan E, Plugge C, de Vos W. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54(5): 1469-1476.
12. Zhang, Q., Wu, Y., Wang, J., Wu, G., Long, W., Xue, Z., Wang, L., Zhang, X., Pang, X., Zhao, Y., Zhao, L., & Zhang, C. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
13. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk J, Druart C, Bindels L, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110(22): 9066-9071.
14. Reid G, Abrahamsson T, Bailey M, Bindels LB, Bubnov R, Ganguli K, Martoni C, O'Neill C, Savignac HM, Stanton C, Ship N, Surette M, Tuohy K, van Hemert S. How do probiotics and prebiotics function at distant sites? *Benef Microbes*. 2017;8(4):521-533.

15. Png C, Lindén S, Gilshenan K, Zoetendal E, McSweeney C, Sly L, McGuckin MA, Florin THY. Mucolytic Bacteria with Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(11):2420-2428.
16. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*. 2013;8(8): e71108.
17. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L, 7MICRO-Obes Consortium, Dumas ME, Rizkalla SW, Dore J, Cani PD, Clement K. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*; 2016; 65(3):426–36.
18. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen A-M, Härkönen T, Ryhänen SJ, Franzosa EA, Vlamakis H, Huttenhower C, Gevers D, Lander ES, Knip M, Xavier RJ. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Science Translational Medicine* *Science Translational Medicine*; 2016; 8(343): 343ra81.
19. Grander C, Adolph TE, Wieser V, Lowe P, Wrzosek L, Gyongyosi B, Ward DV, Grabherr F, Gerner RR, Pfister A, Enrich B, Ciocan D, Macheiner S, Mayr L, Drach M, Moser P, Moschen AR, Perlemuter G, Szabo G, Cassard AM, Tilg H. Recovery of ethanol induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut*. *Gut*; 2018; 67(5): 891–901.
20. Chelakkot C, Choi Y, Kim D-K, Park HT, Ghim J, Kwon Y, Jeon J, Kim MS, Jee YK, Gho YS, Park H, Kim Y, Ryu S. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Experimental & Molecular Medicine*. *Experimental & Molecular Medicine*; 2018; 50(2): e450–.
21. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. *Akkermansia Muciniphila* Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe<sup>-/-</sup> Mice. *Circulation*. 2016;133(24):2434-2446.
22. Kang C-S, Ban M, Choi E-J, Moon H-G, Jeon J-S, Kim D-K, Park SK, Jeon SG, Roh TY, MS, Gho YS, Kim JG, Kim YK. Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially *Akkermansia muciniphila*, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLOS ONE*; 2013;8(10):e76520.
23. Goyal RK, Hirano I. The Enteric Nervous System. *New England Journal of Medicine* 1996; 334:1106–15.
24. Mottet NK. Histopathologic spectrum of regional enteritis and ulcerative colitis. *Major Probl Pathol*. 1971; 2:1-249.
25. Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2005;17(5):751-760.
26. Sarnelli, G, De Giorgio, R, Gentile, F, Cali, G, Grandone I, Rocco A, Cosenza V, Cuomo R, D'Argenio. Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue transglutaminase-induced apoptosis. *Dig Liver Dis*. 2009;41(3):185-193.

27. Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(1):4-15.
28. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science.* 2011;334(6053):255-258.
29. Broussard DL, Bannerman PG, Tang CM, Hardy M, Pleasure D. Electrophysiologic and molecular properties of cultured enteric glia. *J Neurosci Res.* 1993;34(1):24-31.
30. Sternini C, Anselmi L, Rozengurt E. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity;* 2008;15(1):73–8.
31. Bradley JS Jr, Parr EJ, Sharkey KA. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 1997;289(3):455-461.
32. Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassman H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(23):13306-13311.
33. Esposito G, Cirillo C, Sarnelli G, De Filippis D, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Petruzzelli R, Grosso M, Izzo P, Iuvone T, Cuomo R. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology.* 2007;133(3):918-925.
34. Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Grosso M, Petruzzelli R, Izzo P, Cali G, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Iuvone T, Steardo L, Cuomo R. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21(11):1209-e112.
35. Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008;263(6):577-583.
36. Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest.* 2007;87(8):731-736.
37. von Boyen GB, Schulte N, Pflüger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 2011;11:3.
38. Esposito G, Capoccia E, Sarnelli G, Scuderi C, Cirillo C, Cuomo R, Steardo L. The antiprotozoal drug pentamidine ameliorates experimentally induced acute colitis in mice. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:277.
39. Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility;* 2014;26(1):98–107.
40. Mcvey Neufeld KA, Mao YK, Bienenstock J, Foster JA, Kunze WA. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. *Neurogastroenterology & Motility.* 2013;25(2):183–e88.

41. Rolig AS, Mittge EK, Ganz J, Troll JV, Melancon E, Wiles TJ, Alligood K, Stephens WZ, Eisen JS, Guillemin K. The enteric nervous system promotes intestinal health by constraining microbiota composition. *PLOS Biology*; 2017;15(2): e2000689.
42. Tommasini A, Pirrone A, Palla G, Taddio A, Martelossi S, Crovella S, Ventura A. The universe of immune deficiencies in Crohn's disease: a new viewpoint for an old disease? *Scand J Gastroenterol*. 2010;45(10):1141-1149.
43. Stenson WF: Inflammatory bowel disease. In Goldman L, Ausiello D (eds): *Cecil textbook of medicine*, 22nd edition.861-868,2004.
44. Kirsner JB, ed. *Inflammatory Bowel Disease*. 5th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 2000.
45. Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-1794.
46. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SPL, European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: current management. *J Crohns Colitis*. 2010;4(1):28-62.
47. Travis SPL, Stange EF, Le'mann M, Oresland T, Bemelman WA, Chowers Y, Colombel JF, D'Haens G, Ghosh S, Marteau P, Kruis W, Mortensen, NJ Penninckx, Gassull FM, European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. *J Crohns Colitis*. 2008;2(1):24-62.
48. Fumery M, Dauchet L, Vignal C, Gower-Rousseau C. Epidemiology, risk factors and factors associated with disabling course in inflammatory bowel disease. *Revue du Praticien* 2014;64(9):1210-15.
49. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikçi A, Parlak E, Dağlı Ü, Ülker A, Hulagu S, Akpınar H, Tuncer C, Süleymanlar İ, Övünç O, Hilmioğlu F, Aslan S, Türkdoğan K, Bahçecioglu Hİ, Yurdaydın C. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in turkey: a multicenter epidemiologic survey. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(1):51-57.
50. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev* 2010;9(5): A372-8.
51. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(3):254-261.
52. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(4):294-303.
53. Kappelman MD, Rifas Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(12):1424-1429.

54. Wiese DM, Lashner BA, Lerner E, Demichele SJ, Seidner DL. The effects of an oral supplement enriched with fish oil, prebiotics, and antioxidants on nutrition status in Crohn's disease patients. *Nutr Clin Pract.* 2011;26(4):463-473.
55. Lee SH, Kwon JE, Cho M-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*; 2018;16(1):26.
56. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus.* 2017;9(4): e1177.
57. Zhou G, Sprengers D, Boor PPC, Doukas M, Schutz H, Mancham S, Pedroza-Gonzalez A, Polak WG, de Jonge J, Gaspersz M, Dong H, Thielemans K, Pan Q, IJzermans JNM, Bruno MJ, Kwekkeboom J. Antibodies Against Immune Checkpoint Molecules Restore Functions of Tumor-Infiltrating T Cells in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology.* 2017;153(4):1107-1119.e10.
58. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1736-45.
59. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4+T Cell Subsets. *BioMed Research International*; 2015; 1–3.
60. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998; 31(5): 311-25.
61. Latinne D, Fiasse R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg.* 2006; 69(4): 393-405.
62. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(11):1073-1083.
63. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75(2):263-274.
64. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR Jr, Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008;28(4):546-558.
65. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*; 2008;8(7):523–32.
66. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*; 2005;201(2):233–40.
67. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(5):199-207.
68. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*; 2013;8(1):477–512.

69. Bogaert S, Laukens D, Peeters H, Melis L, Olievier K, Boon N, Verbruggen G, Vandesompele J, Elewaut D, De Vos M. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunology*; 2010;11(1):61.
70. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14<sup>+</sup> intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2269-2280.
71. Witowski J, Książek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(5):567-579.
72. Paradowska A, Maśliński W, Grzybowska-Kowalczyk A, Łacki J. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2007;55(5):329–34.
73. Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, Kang HR, Zhang X, Lee PJ, Elias JA, Lee CG. Role of Early Growth Response-1 (Egr-1) in Interleukin-13-induced Inflammation and Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(12):8161–8.
74. Fujino S. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65–70.
75. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324(2):84-88.
76. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol* 2013; 5:237-47.
77. Wisner DM, Harris LR, Green CL, Poritz LS. Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon- $\gamma$  and interleukin-4. *J Surg Res* 2008;144(1):1-7.
78. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. IL-1 $\beta$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Pathol* 2010;177(5):2310-22.
79. Hering NA, Andres S, Fromm A, Van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J. Transforming growth factor- $\beta$ , a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr* 2011;141(5):783-9.
80. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(1):100- 13.
81. Johansson ME. Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(11):2124-31.
82. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3(5):394-400.
83. Krishnan A, Korzenik JR. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31(1):21-39.
84. Ng SC. Emerging leadership lecture: inflammatory bowel disease in asia: emergence of a "western disease". *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30(3):440-5.

85. Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD, Wu GD. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2015;148(6):1087-106.
86. Dixon LJ, Kabi A, Nickerson KP, McDonald C. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21(4):912-22.
87. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(2):154-163.
88. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2011;106(4):563-73.
89. Martin TD, Chan SS, Hart AR. Environmental factors in the relapse and recurrence of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *Dig Dis Sci* 2015;60(5):1396-405. 41.
90. Cornish EJ, Hurtgen BJ, McInerney K, Burritt NL, Taylor RM, Jarvis JN, Wang SY, Burritt JB. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-independent resistance to *Aspergillus fumigatus* in alveolar macrophages. *J Immunol.* 2008;180(10):6854-6867.
91. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the asia-pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *J Dig Dis* 2010;11(3):134-47.
92. Firouzi F, Bahari A, Aghazadeh R, Zali MR. Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study in Iran. *Int J Colorectal Dis* 2006;21(2):155-9
93. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for IBD. *Gastroenterol Hepatol* 2013;9(6):367-74.
94. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: an environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis* 2011;5(4):279-86.
95. Khan I, Ullah N, Zha L, Bai Y, Khan A, Zhao T, Che T, Zhang C.. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? *IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. Pathogens*; 2019;8(3):126.
96. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut.* 2004;53(7):1057.
97. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134(2):577-594.
98. Casén C, Vebø HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Ciemniejewska E, Dzankovic S, Frøyland C, Nestestog R, Engstrand L, Munkholm P, Nielsen OH, Rogler G, Simrén M, Öhman L, Vatn MH, Rudi K Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(1):71-83.
99. Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood–Adulthood Transition. *Inflammatory Bowel Diseases. Inflammatory Bowel Diseases*; 2016;22(2):487–504.

100. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, D'Amato M, Bonfiglio F, McDonald D, Gonzalez A, McClure EE, Dunkleberger MF, Knight R, Jansson JK. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*. 2017;2(5):17004.
101. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR, Li E. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*; 2011;17(1):179–84.
102. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*; 2012;13(9): R79.
103. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(9):1034–1041.
104. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*; 2010;464(7285):59–65.
105. Söderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzén LE, Weström B, Magnusson KE, Sjö Dahl R. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. *Gastroenterology*; 1999;117(1):65–72.
106. Salim SY., Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011;17(1):362–381.
107. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*; 2015;13(1):11.
108. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36:166-76.
109. Secondulfo M, de Magistris L, Fiandra R, Caserta L, Belletta M, Tartaglione MT, Riegler G, Biagi F, Corazza GR, Carratù R. Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relatives. *Dig Liver Dis*. 2001;33(8):680-5.
110. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 2000; 119(6): 1740–1744.
111. Jørgensen J, Ranløv PJ, Bjerrum PJ, Diemer H, Bisgaard K, Elsborg L. Is an increased intestinal permeability a valid predictor of relapse in Crohn disease? *Scand J Gastroenterol*. 2001; 36(5): 521–527.

112. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015; 1(2):154-170.
113. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 96(3):795-803.
114. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, Papalois A, Pikoulis E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Annals of Medicine and Surgery*; 2016; 11:9–15.
115. Motavallian-Naeini A, Minaiyan M, Rabbani M, Mahzuni P. Anti-inflammatory effect of ondansetron through 5-HT<sub>3</sub> receptors on TNBS-induced colitis in rat. *EXCLI J*. 2012; 11:30-44.
116. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*; 2014;18(4):279.
117. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541-6.
118. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-Colitis. *International Reviews of Immunology*; 2000;19(1):51–62.
119. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Akagiri S, Suzuki T, Hirata I, Omatsu T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Inhalation of Carbon Monoxide Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Mice Through the Inhibition of TNF- $\alpha$  Expression. *Digestive Diseases and Sciences*; 2010;55(10):2797–804.
120. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*; 2011;140(6):1756–67.e1.
121. Strober W, Lúdvíksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med*. 1998;128(10):848-856.
122. Al-Jahdali E, Mosli M, Saadah O. A cross-sectional survey of Saudi gastroenterologists: Transition strategies for adolescents with inflammatory bowel disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2017;23(4):233-237.
123. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, Kitani A, Strober W. Induction of IL-13 Triggers TGF- $\beta$ 1-Dependent Tissue Fibrosis in Chronic 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis. *The Journal of Immunology*; 2007;178(9):5859–70.
124. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, Neurath MF. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*; 2017;12(7):1295–309.
125. Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut*; 2013;62(7):1072–84.
126. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 2013; Tıbbi Fizyoloji. 9.baskı.
127. Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, Rühl A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *Journal of Comparative Neurology*; 2008;509(4):356–71.

128. Furness JB, Stebbing MJ. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & Motility*; 2018;30(2):e13234.
129. Kim YK, Yun PY, Kim JH, Lee JY, Lee W. The quantitative sensory testing is an efficient objective method for assessment of nerve injury. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2015;37(1):13.
130. Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*; 2016;13(9):517–28.
131. Rescigno M. Don't forget the "second brain". *Mucosal Immunology*; 2008; 1(5): 328-329.
132. Lakhan SE, Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of Neuroinflammation*; 2010;7(1):37.
133. Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B, Geboes K. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterology & Motility*; 2008;20(9):1009–16.
134. Ohlsson B, Sundkvist G, Lindgren S. Subclinical sympathetic neuropathy appears early in the course of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. 2007; 7:33.
135. Schneider SM, Al-Jaouni R, Filippi J, Wiroth JB, Zeanandin G, Arab K, Hébuterne X. Sarcopenia is prevalent in patients with Crohn's disease in clinical remission. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(11):1562-1568.
136. Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, De Giorgio R. Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1230-1237.
137. Sharkey KA. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *Journal of Clinical Investigation*; 2015;125(3):918–25.
138. Kunze WA, Mao YK, Wang B, Huizinga JD, Ma X, Forsythe P, Bienenstock J. *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*; 2009;13(8b):2261–70.
139. Wang B, Mao YK, Diorio C, Pasyk M, Wu RY, Bienenstock J, Kunze WA. Luminal administration ex vivo of alive *Lactobacillus* species moderates mouse jejunal motility within minutes. *FASEB J*. 2010;24(10):4078-4088.
140. Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H, Pettersson S, Pachnis V. Microbiota Controls the Homeostasis of Glial Cells in the Gut Lamina Propria. *Neuron*; 2015;85(2):289–95.
141. De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, Bäckhed F. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2018;115(25):6458–63.
142. Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, Mortha A, Leboeuf M, Li XM, Mucida D, Stanley ER, Dahan S, Margolis KG, Gershon MD, Merad M, Bogunovic M. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell*; 2014;158(2):300–13.

143. Derrien M, Van Passel MWJ, Van De Bovenkamp JHB, Schipper R, De Vos W, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*; 2010;1(4):254–68.
144. Tailford LE, Crost EH, Kavanaugh D, Juge N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet*. 2015; 6:81.
145. Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, Norin E, Müller M, de Vos WM. Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol*. 2011; 2:166.
146. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*; 2009;461(7268):1282–6.
147. Sandhu S, Al-Sarraf A, Taraboanta C, Frohlich J, Francis GA. Incidence of pancreatitis, secondary causes, and treatment of patients referred to a specialty lipid clinic with severe hypertriglyceridemia: a retrospective cohort study. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:157.
148. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J, Cani PD. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. *Diabetes*; 2011;60(11):2775–86.
149. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6718–6721.
150. Sasso G, Khachatryan L, Kondylis A, Battey JND, Sierro N, Danilova NA, Grigoryeva TV, Markelova MI, Khusnutdinova DR, Laikov AV, Salafutdinov II, Romanova YD, Siniagina MN, Vasiliev IY, Boulygina EA, Solovyeva VV, Garanina EE, Kitaeva KV, Ivanov KY, Chulpanova DS, Kletenkov KS, Valeeva AR, Odintsova AK, Ardatskaya MD, Abdulkhakov RA, Ivanov NV, Peitsch MC, Hoeng J, Abdulkhakov SR. Inflammatory Bowel Disease-Associated Changes in the Gut: Focus on Kazan Patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(3):418–433.
151. Lo Presti A, Del Chierico F, Altomare A, Zorzi F, Cella E, Putignani L, Guarino MPL, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M. Exploring the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *Akkermansia muciniphila* in IBD and IBS. *Future Microbiol*. 2019; 14:1497–1509.
152. Zhang T, Lu G, Zhao Z, Liu Y, Shen Q, Li P, Chen Y, Yin H, Wang H, Marcella C, Cui B, Cheng L, Ji G, Zhang F. Washed microbiota transplantation vs. manual fecal microbiota transplantation: clinical findings, animal studies and in vitro screening. *Protein Cell*. 2020;11(4):251–266.
153. Alvarado DM, Chen B, Iticovici M, Thaker AI, Dai N, VanDussen KL, Shaikh N, Lim CK, Guillemin GJ, Tarr PI, Ciorba MA. Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor and Notch Signaling to Increase Differentiation of Secretory Cells and Alter Mucus-Associated Microbiota. *Gastroenterology*. 2019;157(4):1093–1108.e11.

154. Lee Y, Sugihara K, Gilliland MG, Jon S, Kamada N, Moon JJ. Hyaluronic acid–bilirubin nanomedicine for targeted modulation of dysregulated intestinal barrier, microbiome and immune responses in colitis. *Nature Materials*; 2020;19(1):118–26.
155. Van den Bossche L, Hindryckx P, Devisscher L, Devriese S, Van Welden S, Holvoet T, Vilchez-Vargas R, Vital M, Pieper DH, Vanden Bussche J, Vanhaecke L, Van de Wiele T, De Vos M, Laukens D. Ursodeoxycholic Acid and Its Taurine- or Glycine-Conjugated Species Reduce Colitogenic Dysbiosis and Equally Suppress Experimental Colitis in Mice. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(7):e02766-16
156. Yang L, Liu C, Zhao W, He C, Ding J, Dai R, Xu K, Xiao L, Luo L, Liu S, Li W, Meng H. Impaired Autophagy in Intestinal Epithelial Cells Alters Gut Microbiota and Host Immune Responses. *Applied and Environmental Microbiology.* Applied and Environmental Microbiology; 2018;84(18): e00880-18.
157. Wang L, Tang L, Feng Y, Zhao S, Han M, Zhang C, Yuan G, Zhu J, Cao S, Wu Q, Li L, Zhang Z. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumorigenesis by modulation of CD8+ T cells in mice. *Gut*; 2020;69(11):1988–97.
158. Bian X, Wu W, Yang L, Lv L, Wang Q, Li Y, Ye J, Fang D, Wu J, Jiang X, Shi D, Li L. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front Microbiol.* 2019; 10:2259.
159. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(2):396-406.e1-10.
160. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T reg Cell Homeostasis. *Science*; 2013;341(6145):569–73.
161. Zhai R, Xue X, Zhang L, Yang X, Zhao L, Zhang C. Strain-Specific Anti-inflammatory Properties of Two *Akkermansia muciniphila* Strains on Chronic Colitis in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 5(9):239.
162. Seregin SS, Golovchenko N, Schaf B, Chen J, Pudlo NA, Mitchell J, Baxter NT, Zhao L, Schloss PD, Martens EC, Eaton KA, Chen GY. NLRP6 Protects *Il10*<sup>-/-</sup> Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Rep.* 2017; 25;19(4):733-745.
163. Ganesh BP, Klopfleisch R, Loh G, Blaut M. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella Typhimurium*-infected gnotobiotic mice. *PLoS One.* 2013;8(9):e74963.
164. Guo X, Li S, Zhang J, Wu F, Li X, Wu D, Zhang M, Ou Z, Jie Z, Yan Q, Li P, Yi J, Peng Y. Genome sequencing of 39 *Akkermansia muciniphila* isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. *BMC Genomics.* 2017;18(1):800.

165. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017;23(1):107-113.
166. Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 1999;117(5):1078-1088.
167. Grundmann D, Klotz M, Rabe H, Glanemann M, Schäfer K-H. Isolation of high-purity myenteric plexus from adult human and mouse gastrointestinal tract. *Scientific Reports;* 2015;5(1):9226.
168. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28(4):477-487.
169. Múzes G, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18(41):5848-5861.
170. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med.* 2000; 51:289-98.
171. Neuman MG. Signaling for inflammation and repair in inflammatory bowel disease. *Rom J Gastroenterol.* 2004;13(4):309-16.
172. Bento AF, Leite DFP, Claudino RF, Hara DB, Leal PC, Calixto JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *Journal of Leukocyte Biology;* 2008;84(4):1213-21.
173. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2013;369(8):754-762.
174. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity;* 2019;50(4):992-1006.
175. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* 2014;13(1):3-10.
176. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(3):341-352.
177. Lin H, Zhang W, Jiang X, Chen R, Huang X, Huang Z. Total glucosides of paeony ameliorates TNBS-induced colitis by modulating differentiation of Th17/Treg cells and the secretion of cytokines. *Molecular Medicine Reports;* 2017;16(6):8265-76.
178. Danese S, Vermeire S, Hellstern P, Panaccione R, Rogler G, Fraser G, Kohn A, Desreumaux P, Leong RW, Comer GM, Cataldi F, Banerjee A, Maguire MK, Li C, Rath N, Beebe J, Schreiber S. Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). *Gut.* 2019;68(1):40-48.

179. Hu L, Liu J, Yin J. Eriodictyol attenuates TNBS -induced ulcerative colitis through repressing TLR4 / NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences; 2021;37(9):812–8.
180. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, Maloy KJ. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med*. 2012; 209(9):1595-1609.
181. Satsangi J, Wolstencroft RA, Cason J, Ainley CC, Dumonde DC, Thompson RP. Interleukin 1 in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1987;67(3):594-605.
182. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut*; 1989;30(6):835–8.
183. Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. *Gut*; 1990;31(6):686–9.
184. Mcalindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 $\beta$  converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*; 1998;42(2):214–9.
185. Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA, Tilg H. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*; 2004; 138(2):323–9.
186. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702.
187. McCall RD, Haskill S, Zimmermann EM, Lund PK, Thompson RC, Sartor RB. Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology*. 1994;106(4):960-972.
188. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology*. 1992;103(1):65-71.
189. Siegmund B, Lehr H-A, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2001;98(23):13249–54.
190. Müller AJ, Hoffmann C, Galle M, Van Den Broeke A, Heikenwalder M, Falter L, Misselwitz B, Kremer M, Beyaert R, Hardt WD. Typhimurium effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe*. 2009;6(2):125-136.
191. Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, Schenck LP, Vilaysane A, Seamone ME, Feng H, Armstrong GD, Tschopp J, Macdonald JA, Muruve DA, Beck PL. Clostridium difficile toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*. 2010;139(2):542-552.e5523.
192. Glocker E-O, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2011;1246(1):102–7.

193. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB. Interleukin 10 Receptor Signaling. *Adv Immunol.* 2014; 122:177-210.
194. Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietilä TE, Kainulainen V, Klievink J, Huuskonen L, Aalvink S, Skurnik M, Boeren S, Satokari R, Mercenier A, Palva A, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173004.
195. Ashrafian F, Keshavarz Azizi Raftar S, Shahryari A, Behrouzi A, Yaghoufar R, Lari A, Moradi HR, Khatami S, Omrani MD, Vaziri F, Masotti A, Siadat SD. Comparative effects of alive and pasteurized *Akkermansia muciniphila* on normal diet-fed mice. *ci Rep.* 2021;11(1):17898.
196. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol.* 2012;188(2):844-853. doi:10.4049/jimmunol.1101736
197. Daneshmand A, Mohammadi H, Rahimian R, Habibollahi P, Fakhfouri G, Talab SS, Mehr SE, Dehpour AR. Chronic lithium administration ameliorates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats; potential role for adenosine triphosphate sensitive potassium channels. *Journal of Gastroenterology and Hepatology;* 2011;26(7):1174–81.
198. Patil VK, Morjaria JB, De Villers F, Babu SK. Associations between procalcitonin and markers of bacterial sepsis. *Medicina (Kaunas).* 2012;48(8):383-387.
199. Motavallian-Naeini A, Minaian M, Rabbani M, Mahzuni P. Anti-inflammatory effect of ondansetron through 5-HT<sub>3</sub> receptors on TNBS-induced colitis in rat. *EXCLI J.* 2012; 11:30-44.
200. Majewska-Szczepanik M, Górska M, Marcińska K, Zemelka-Wiącek M, Strzępa A, Dorożyńska I, Szczepanik M. Epicutaneous immunization with protein antigen TNP-Ig alleviates TNBS-induced colitis in mice. *Pharmacological Reports;* 2012;64(6):1497–504.
201. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017; 2:17023-.
202. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008; 263(6):591–6.
203. Lee SY, Jeong JJ, Eun SH, Kim DH. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 and its metabolites ginsenoside Rh1 and 20(S)-protopanaxatriol in mice with TNBS-induced colitis. *Eur J Pharmacol.* 2015; 762:333–43.
204. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(2):92–9.
205. Quaglio AE, Castilho AC, Di Stasi LC. Experimental evidence of heparanase, Hsp70 and NF- $\kappa$ B gene expression on the response of anti-inflammatory drugs in TNBS-induced colonic inflammation. *Life Sci.* 2015; 141:179-187.
206. Zhao S, Liu W, Wang J, Shi J, Sun Y, Wang W, Ning G, Liu R, Hong J. *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *J Mol Endocrinol.* 2017;58(1):1-14.

207. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(4): 379-383.
208. Antoni L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*; 2014; 20(5):1165.
209. Jäger S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;398(1):1-12. doi:10.1007/s00423-012-1030-9
210. Novak EA, Mollen KP. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Front Cell Dev Biol*. 2015; 3:62.
211. Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V, Hébuterne X, Piche T. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*. 2014;63(5):744–752.
212. Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A, Tsukita S. Intestinal deletion of *Claudin-7* enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*. 2015;64(10):1529–1538.
213. Kim YS, Ho SB. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports*; 2010;12(5):319–30.
214. Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Front Immunol*. 2020; 11:2054.
215. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*; 2007;56(1):61–72.
216. Teshima CW, Dieleman LA, Meddings JB. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2012;1258(1):159–65.
217. Yang J, Li M, Zheng QC. Emerging role of Toll-like receptor 4 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*. 2015; 2:11-17.
218. Mohammad S, Thiernemann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front. Immunol*. 2021, 11, 594150
219. Ramendra R, Isnard S, Mehraj V, Chen J, Zhang Y, Finkelman M, Routy JP. Circulating LPS and (1→3)-β-D-Glucan: A Folie à Deux Contributing to HIV-Associated Immune Activation. *Front Immunol*. 2019;10:465.
220. Tulkens J, Vergauwen G, Van Deun J, Geurickx E, Dhondt B, Lippens L, De Scheerder MA, Miinalainen I, Rappu P, De Geest BG, Vandecasteele K, Laukens D, Vandekerckhove L, Denys H, Vandesompele J, De Wever O, Hendrix A. Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut*. 2020;69(1):191-193.
221. Wu XX, Huang XL, Chen RR, Li T, Ye HJ, Xie W, Huang ZM, Cao GZ. Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. *Inflammation*. 2019;42(6):2215-2225.

222. Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, Griger J, Fritz P, Fellermann K, Schwab M, Wehkamp J, Stange EF. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*. 2009;77(1):84-94.
223. Singh V, Johnson K, Yin J, Lee S, Lin R, Yu H, In J, Foulke-Abel J, Zachos NC, Donowitz M, Rong Y. Chronic Inflammation in Ulcerative Colitis Causes Long-Term Changes in Goblet Cell Function. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;13(1):219-232.
224. Van der Post S, Jabbar KS, Birchenough G, Arike L, Akhtar N, Sjøvall H, Johansson MEV, Hansson GC. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut*. 2019;68(12):2142-2151.
225. Parikh K, Antanaviciute A, Fawcner-Corbett D, Jagielowicz M, Aulicino A, Lagerholm C, Davis S, Kinchen J, Chen HH, Alham NK, Ashley N, Johnson E, Hublitz P, Bao L, Lukomska J, Andev RS, Björklund E, Kessler BM, Fischer R, Goldin R, Koohy H, Simmons A. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567(7746):49-55.
226. Zou Y ve Chen T. Engineered *Akkermansia muciniphila*: A promising agent against diseases. *Experimental and Therapeutic Medicine* 20.6 (2020): 285.
227. Shin J, Noh JR, Chang DH, Kim YH, Kim MH, Lee ES, Cho S, Ku BJ, Rhee MS, Kim BC, Lee CH, Cho BK. Elucidation of *Akkermansia muciniphila* Probiotic Traits Driven by Mucin Depletion. *Front Microbiol*. 2019;10:1137.
228. Margolis KG, Gershon MD. Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends in Neurosciences*; 2016; 39(9):614–24.
229. Holland AM, Bon-Frauches AC, Keszthelyi D, Melotte V, Boesmans W. The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 2021;78(10):4713–33.
230. Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*; 2012; 9(11):625–32.
231. Brown IAM, McClain JL, Watson RE, Patel BA, Gulbransen BD. Enteric Glia Mediate Neuron Death in Colitis Through Purinergic Pathways That Require Connexin-43 and Nitric Oxide. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*; 2016; 2(1):77–91.
232. Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, De Giorgio R, Colucci R, Faussone-Pellegrini MS, Chiarugi M, Campani D, Castagna M, Mattii L, Blandizzi C, Dolfi A. Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. *J Cell Mol Med*. 2012;16(2):318-327.
233. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*. 2004; 72(2): 143-164.
234. Mawe GM. Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and post-inflamed colon. *Journal of Clinical Investigation*; 2015;125(3):949–55.
235. Hons IM, Burda JE, Grider JR, Mawe GM, Sharkey KA. Alterations to enteric neural signaling underlie secretory abnormalities of the ileum in experimental colitis in the guinea pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(4): G717-G726.

236. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol.* 1999;155(4):1051-1057.
237. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1979-1988.
238. Cocciolillo S, Collins SM. The long-term functional consequences of acute infectious diarrhea. *Curr Opin Gastroenterol.* 2016; 32(1): 1-6.
239. Cirillo C, Sarnelli G, Turco F, Mango A, Grosso M, Aprea G, Masone S, Cuomo R. Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(9):e372-e382.
240. Rosenbaum C, Schick MA, Wollborn J, Heider A, Scholz CJ, Cecil A, Niesler B, Hirrlinger J, Walles H, Metzger M. Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151335.
241. Steinkamp M, Schulte N, Spaniol U, Pflüger C, Kirsch J, Von Boyen GB. Apoptosis in enteric glia: Part of the puzzle in Crohn's disease? *Medical Science Monitor;* 2012;18(4):BR117–22.
242. Di Liddo R, Piccione M, Schrenk S, Dal Magro C, Cosma C, Padoan A, Contran N, Scapellato ML, Pagetta A, Romano Spica V, Conconi MT, Parnigotto PP, D'Inca R, Michetti F. S100B as a new fecal biomarker of inflammatory bowel diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(1):323-332.
243. Vieira C, Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso MT, Silva I, Marques P, Correia-de-Sá P. Post-inflammatory Ileitis Induces Non-neuronal Purinergic Signaling Adjustments of Cholinergic Neurotransmission in the Myenteric Plexus. *Front Pharmacol.* 2017; 8:811.
244. Robinson AM, Rahman AA, Miller S, Stavely R, Sakkal S, Nurgali K. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis. *Stem Cell Research & Therapy;* 2017;8(1).
245. Loeser H, Schallenberg S, von Winterfeld M, Tharun L, Alakus H, Hölscher A, Bollschweiler E, Buettner R, Zander T, Quaas A. High protein and mRNA expression levels of TUBB3 (class III  $\beta$ -tubulin) are associated with aggressive tumor features in esophageal adenocarcinomas. *Oncotarget.* 2017;8(70):115179-115189.
246. Akamatsu W, Fujihara H, Mitsuhashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H. The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4625-4630
247. Linden DR. Enhanced excitability of guinea pig inferior mesenteric ganglion neurons during and following recovery from chemical colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(9): G1067-G1075.
248. MacEachern SJ, Patel BA, Keenan CM, Dickey M, Chapman K, McCafferty DM, Savidge TC, Beck PL, MacNaughton WK, Sharkey KA. Inhibiting Inducible Nitric Oxide Synthase in Enteric Glia Restores Electrogenic Ion Transport in Mice With Colitis. *Gastroenterology.* 2015;149(2):445-55.e3.

249. Delvalle NM, Dharshika C, Morales-Soto W, Fried DE, Gaudette L, Gulbransen BD. Communication Between Enteric Neurons, Glia, and Nociceptors Underlies the Effects of Tachykinins on Neuroinflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6(3):321-344. Published 2018 May 29.
250. Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci*. 2006;126-127:264-272.
251. Goode T. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut*; 2000;47(3):387-96.
252. Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, Lomax AE. Effects of Inflammation on the Innervation of the Colon. *Toxicologic Pathology*; 2014;42(1):111-7.
253. Dora D, Ferenczi S, Stavely R, Toth VE, Varga ZV, Kovacs T, Bodi I, Hotta R, Kovacs KJ, Goldstein AM, Nagy N. Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(5):1617-1641.
254. Cipriani G, Terhaar ML, Eisenman ST, Ji S, Linden DR, Wright AM, Sha L, Ordog T, Szurszewski JH, Gibbons SJ, Farrugia G. Muscularis Propria Macrophages Alter the Proportion of Nitroergic but Not Cholinergic Gastric Myenteric Neurons. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7(3):689-691.e4.
255. Avetisyan M, Rood JE, Huerta Lopez S, Sengupta R, Wright-Jin E, Dougherty JD, Behrens EM, Heuckeroth RO. Muscularis macrophage development in the absence of an enteric nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2018;115(18):4696-701.

## **8 EKLER**

### **EK1 Etik Kurul Onayı**



## 9 ÖZGEÇMİŞ



