

# Splenektomili Ratlarda Probiyotiklerin Sistemik ve İntestinal Mukozal İmmünite Üzerine Etkisi

## The Effects of Probiotics, on the Systemic and Intestinal Mucosal Immunity, of Splenectomized Rats

Mutlu Şahin<sup>1\*</sup>, Erkan Ozturk<sup>4</sup>, Mehmet Fatih Can<sup>2</sup>, İsmail Hakki Ozerhan<sup>2</sup>, Gokhan Yagci<sup>4</sup>, Belma Aslim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara

<sup>2</sup>Lokman Hekim Üniversitesi, Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı, Ankara

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Ankara

<sup>4</sup>Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmamızda intestinal mukozal immünite ve sistemik immüniteyi iyileştirici etkileri kanıtlanmış olan probiyotiklerin kullanımı ile splenektomi sonrasında oluşabilecek ikinci faz değişiklikleri saptamayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada toplam 56 adet Sprague-Dawley tipi dişi rat kullanılmıştır. Deney hayvanları toplam sekiz gruba ayrıldı. Ratlara gruplarına göre preoperatif veya postoperatif dönemde olmak üzere EPS'si düşük Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus A13 suşu veya EPS'si yüksek Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus B3 suşu probiyotik uygulandı. Çalışmanın 8. gününde splenektomi uygulandı ve 16. günde kardiyak kan alımı ve ince barsak rezeksiyonu uygulandı.

**Bulgular:** Sistemik immünite açısından grupların istatistiksel karşılaştırmalarında, gruplar arasında TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-12 ve IL-12/IL-4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ( $p < 0.05$ ). Ancak IL-6 ve IL-10 açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

A13 suşunun splenektomi sonrası gelişen TGF- $\beta$  yüksekliğini daha fazla artırdığı; IL-4'ü ise daha da düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca, splenektomi uygulanan gruplarda A13 suşu uygulamanın TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. B3 suşu uygulanan gruplarda da TNF- $\alpha$  düzeylerinin düştüğü; TGF- $\beta$  yüksekliğinin daha arttığı tespit edilmiş, IL-12, IL-4 ve IL-10'u azalttığı saptanmıştır. B3 suşunun splenektomi uygulanan gruplarda IL-12'yi ve TNF- $\alpha$ 'yı düşürücü etkisi A13'e göre fazla bulunmuştur.

**Sonuç:** Splenektomi ile immüno-supressif bir tablo ortaya çıktığı; probiyotiklerin sitokin regülasyonu ile dolaylı olarak anti-inflamatuar bir etki oluşturdıkları ve meydana getirdikleri sitokin profili ile sistemik olarak mukozal immüniteyi destekledikleri görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Splenektomi, Probiyotikler, Lactobacillus delbrueckii, İmmünite, Mukozal İmmünite

### ABSTRACT

**Objectives:** Aim of this study was to determine the second phase changes that may occur after a splenectomy; when probiotics, with proven therapeutic effects of intestinal mucosal immunity and systemic immunity, are utilized.

**Materials and Methods:** Total of 56 female Sprague-Dawley rats were used and divided into eight groups. Low exopolysaccharide (EPS) producing Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus A13 strain, or high EPS producing Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus B3 strain, was orally applied to the rats pre-operatively or post-operatively. Splenectomy was performed on the 8th day of the study and cardiac blood sampling and small bowel resection were performed on the 16th day.

**Results:** In terms of systemic immunity assay whilst there was no significant difference found between IL-6 and IL-10, a significant difference was detected between the groups in TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-12 and IL-12 / IL-4 statistical comparisons ( $p < 0.05$ ).

A13 strain was observed to further increase TGF- $\beta$  levels after a splenectomy, while further decreasing IL-4 levels. Also, A13 strain application in the splenectomized groups reduced TNF- $\alpha$  levels. TNF- $\alpha$  levels decreased in B3 strain treated groups; TGF- $\beta$  elevation was found to be higher, and this strain reduced IL-12, IL-4 and IL-10. B3 strain was found to have a more depressing effect on IL-12 and TNF- $\alpha$ , than A13, in splenectomized groups.

**Conclusions:** It has been determined that splenectomy leads to immunosuppression; that probiotics –especially the high EPS producing– have an indirect anti-inflammatory effect with cytokine regulation; and that with the cytokine profiles they exhibit, they systematically support mucosal immunity.

**Key Words:** Splenectomy, Probiotics, Lactobacillus delbrueckii, Immunity, Immunity, Mucosal

\*Sorumlu Yazar: Mutlu Şahin, Pınarbaşı Mah. Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Keçiören, Ankara, 06280

E-mail: drmutlu@gmail.com Tel: +90 (312) 356 90 00 – 1160 Fax: +90 (312) 356 90 02

ORCID ID: Mutlu Şahin: 0000-0003-0371-4095, Erkan Ozturk: 0000-0002-5626-6989, Mehmet Fatih Can: 0000-0002-3866-2419, İsmail Hakki Ozerhan: 0000-0001-7142-9793, Gokhan Yagci: 0000-0002-4510-6090, Belma Aslim: 0000-0002-0595-7237

Geliş Tarihi: 23.10.2019, Kabul Tarihi: 18.06.2020

## Giriş

İntestinal lümenin yoğun bakteriyel florası, mukozal immün bariyer sağlam olduğu sürece konakçı ile kommensal bir ilişki içinde bulunur. Canlı bakterilerin barsak lümeninden ekstraintestinal organlara geçişi, bakteriyel translokasyon (BT) olarak tanımlanmıştır (1). BT oluşumunda ana sebepler; intestinal bariyerin yıkılması, konağın immün defansındaki bozulma ve kolonizasyona dayanıklılığın kaybı ile birlikte intestinal sistemdeki aşırı bakteriyel artıştır. Canlı mikrobiyal besin materyalleri olarak tanımlanan probiyotikler, konağa intestinal mikrobiyal dengesini düzenleyerek faydalı olurlar (2). Laktobasillerin barsak mikroflorası ve bariyer fonksiyonuna etkilerini araştırmak için, abdominal enfeksiyon oluşturulan ratlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada; probiyotiklerin barsak mikroflora dağılımını iyileştirdiği, okludin ekspresyonunu artırdığı, barsak epitel tıght-junction bölgelerinin devamlılığını sağladığı ve bakteriyel translokasyon oranlarını azalttığı savunulmuştur (3). BT durumunda, immün supresyon oluşumunda çeşitli sitokinlerin ve hücresel elemanların (T ve B lenfositler, mast hücreleri, dendritik hücreler ve makrofajlar) rol oynadıkları gösterilmiştir (1).

Dalak, retiküloendotelial ve immün sistemlerinin bir parçasıdır. Splenektomili hastalarda kan kökenli antijenlere karşı IgM üretimi hem gecikmiş, hem de azalmıştır (4). Diğer taraftan splenektomiye takiben IgE ve özgün antikorları da kapsayan özgün immün faktörler dolaşımında yükselir (4). Splenektominin intestinal hümmoral immün sistem üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, splenektomize ratlarda pnömokokal polisakkarid aşısı ile immünizasyon sonrası peyer plakları ve mezenterik lenf nodlarında IgA içeren hücrelerde artış olduğu tespit edilmiştir (4). Esasen normal flora bakterilerinin oluşturduğu probiyotikler içinde en iyi bilinen ve kullanılanları *laktobasiller* ve *bifidobakteriler*dir (5).

Bazı laktik asit bakterileri ekzoselüler veya ekzopolisakkarit (EPS) adı verilen bir polisakkarit polimeri salgırlar (6). EPS hücre yüzeyinde bir kapsül oluşturmak üzere veya ekstraselüler ortama serbest polisakkarit olarak salınır. EPS tekrarlayan şeker deriveleri ve dallarını içeren uzun zincirli bir polisakkarittir. EPS intestinal epitel yüzeyine yapışmadan sorumludur. EPS'ler bakteri yüzeyine geçici olarak bağlanırlar (6) ve bakteriyi koruyucu bir fonksiyonu vardır. Ruas-Madiedo ve ark. (7) yaptıkları çalışmada probiyotik kültürlerin hücre yüzey karakterlerinin epitel yüzeye tutunmada farklılıklara neden olabileceğini, epitel yüzeylere tutunmada bu polimerlerin gerekli olduklarını ve tutunmada EPS tipi ve dozunun etkili olduğunu bildirmişlerdir.

İntestinal floranın yukarıda sayılan nedenlerle patojen özellik kazanması, doğal olarak intestinal immün sistemde belirgin reaksiyona neden olmaktadır. Ancak bunun tersine, lümen dışı bir nedenle intestinal immünitede farklı bir davranış biçiminin oluşması halinde, bunun sistemin bütünü üzerinde ne gibi etkileri olacağı halen ayrıntılandırılmaya muhtaçtır. Bununla birlikte, lümen dışı olası çeşitli etkenlerin intestinal immün sistemde ne gibi değişiklikler yaptığı da her yönüyle aydınlatılmış değildir. Biz özellikle mukozal immünite düzeyinde bu etkileri incelemeyi ve literatürde mevcut olmayan EPS üreten probiyotiklerin alımı ile oluşacak ikinci faz değişiklikleri saptamayı amaçladık.

## Gereç ve Yöntem

Hayvan deneyleri ile ilgili ilkelere uygun olarak hazırlanan proje ile ilgili olarak, çalışmanın ratlarda yapılması için Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na başvuru yapılmıştır. Kurulun 22 Aralık 2006 tarih ve 06/130 sayılı kararı ile çalışmanın hayvan etiği açısından uygun olduğu onaylanmıştır.

**Probiyotik Suşları ile İlgili Bilgiler:** Bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* suşları (B<sub>3</sub> ve A<sub>13</sub>) geleneksel yöntemle mayalanmış köy yoğurtlarından izole edilmiş ve toplam 45 izolat içerisinde probiyotik açıdan önemli özellikleri (ekzopolisakkarit [EPS] üretimi, antibakteriyel aktivite, epitel yüzeye tutunma kapasitesi gibi) dikkate alınarak seçilmiştir. B<sub>3</sub> suşu bu 45 izolat içerisindeki en yüksek EPS üreten (211 mg/l) ve A<sub>13</sub> suşu ise en düşük EPS üreten (27 mg/l) suştur. Suşlar API 50 CHL(Bio-Merieux, France) ve 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanmıştır.

**Probiyotiklerin Hazırlanması:** Proje süresince kullanılan probiyotik suşları günlük olarak hazırlandı. MRS Broth'da (DeMan, Rogosa, Sharpe, Oxoid) 18 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen aktif kültürler, santrifüj yapılarak besi ortamından ayrıldıktan sonra, fosfat tamponunda (PBS) 2 kez yıkandı. Ortalama 1 ml'lik dozlarda bakteri süspansiyonları (~10<sup>10</sup> cfu/ml) hazırlandı ve eppendorf tüplerine kondu.

**Deney Hayvanları ve Deney Grupları:** Çalışmada 180-220 gr ağırlığında toplam 56 adet Sprague-Dawley dişi rat kullanılmıştır. Ratlar basit rasgele örnekleme yöntemiyle tüm gruplarda 7 rat olacak şekilde toplam 8 gruba ayrıldı. Çalışmaya dahil olan tüm rat gruplarının, çalışma süresince laboratuvar yemi ve suya ulaşmaları sağlandı. Buna ilave olarak, probiyotik uygulaması planlanan gruplara, planlanan periyotta, 1 ml'lik dozlarda probiyotik orogastrik gavaj yoluyla verildi (Resim 1).



**Resim 1.** Orogastrik gavaj yöntemiyle probiyotik süspansiyonunun denek rata uygulanması

**1. Grup: Sham Grubu (SH):** Bu gruptaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı.

**2. Grup: Splenektomi Grubu (SP):** 8. günde splenektomi uygulandı.

**3. Grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP) Grubu:** Preoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* A<sub>13</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı. 8. günde splenektomi gerçekleştirildi.

**4. Grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>) Grubu:** Preoperatif ve postoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* A<sub>13</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı. 8. günde splenektomi gerçekleştirildi.

**5. Grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> (SP + POST PB-A<sub>13</sub>) Grubu:** 8. günde splenektomi gerçekleştirildi. Postoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* A<sub>13</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı.

**6. Grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP) Grubu:** Preoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı. 8. günde splenektomi gerçekleştirildi.

**7. Grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>) Grubu:** Preoperatif ve postoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı. 8. günde splenektomi gerçekleştirildi.

**8. Grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> (SP + POST PB-B<sub>3</sub>) Grubu:** 8. günde splenektomi gerçekleştirildi. Postoperatif dönemde, günlük 1 ml *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşu probiyotik uygulaması yapıldı.

**Cerrahi Yöntem (Splenektomi):** Splenektomi uygulanacak ratlara, 40 mg/kg Ketamin (Ketalar® Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 4 mg/kg Xylazin'in (Rompun®; Bayer AG, Leverkusen, Germany) intramüsküler enjeksiyonu ile genel anestezi uygulandı. 3 cm'lik orta hat insizyonu ile batına girildi. Batına girildikten sonra dalak pedikülü bulunarak splenik arter ve ven birlikte 4/0 ipekle iki yerden bağlandı, kesildi ve dalak batın dışına alındı. Periton, sfak ve cilt 2/0 keskin uçlu iğne yardımı ile sürekli şekilde sütüre edilerek kapatıldı.

**Relaparotomi ve Sakrifikasyon:** Denekler yukarıda gruplarında belirtilen beslenme modelleri ile takip edildiler. Bazı gruplara çalışmanın sekizinci gününde splenektomi uygulandı. Çalışma sırasında dört rat çeşitli nedenlerle kaybedildi. Bunlar;

- 2. gruptaki bir rat postoperatif 1. gün kanama nedeniyle

- 3. gruptaki bir rat postoperatif 1. gün kanama nedeniyle

-4. gruptaki bir rat postoperatif 4. gün insizyonel herni ve barsak evisserasyonu nedeniyle

- 7.gruptaki bir rat postoperatif 6.gün pnömoni nedeniyle.

Çalışmanın 16. gününde tüm gruplara intramüsküler olarak genel anestezi uygulandı. Laparotomi/relaparotomiye takiben diyafragma kruşları açılarak kalbe ulaşıldı ve sitokin düzeyi ölçümü için yaklaşık 5 ml kan alındı. İntestinal mukozal immünite incelemesi için terminal ileumdan 5-10 cm'lik parsiyel rezeksiyon yapıldı. Gerekli örneklerin alınmasını takiben ratlar yüksek doz fenobarbital enjeksiyonu ile sakrifiye edildi.

**Sitokin Düzeyi Ölçümü:** Ratlardan alınan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar çalışma gününe kadar -70 °C'de muhafaza edildi. Serumlar ELISA çalışmasının yapılacağı gün oda ısısında çözdürüldü ve çalışma tamamlandı. ELISA plakları EL800x mikropate okuyucusunda değerlendirildi. Biosource (Biosource International, Inc. Camarillo, California 93012 USA) firmasının "Rat ELISA " kitleri kullanılarak çalışıldı.

- **Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF-α):** (Catalog no:KRC3011)

- **Transforming Growth Faktörü-Beta (TGF-β1):** (Catalog no:KAC1688)

- **İnterlökin-4 (IL-4):** (Catalog no:KRC0041)

- **İnterlökin-6 (IL-6):** (Catalog no:KRC0061)

- **İnterlökin-10 (IL-10):** (Catalog no:KRC0101)

- **İnterlökin-12 (IL-12+p40):** (Catalog no:KRC0121)

**İntestinal Mukozal İmmünite İncelemesi:**

**Tablo 1.** Çalışma gruplarında ölçülen sitokin değerlerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları

	X2	p
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	21.060	0.004
TGF- $\beta$ (pg/ml)	19.274	0.007
IL-4 (pg/ml)	16.752	0.019
IL-6 (pg/ml)	3.594	0.825
IL-10 (pg/ml)	12.886	0.075
IL-12 (pg/ml)	17.816	0.013
IL-12 / 4	15.406	0.031

**Kısaltmalar-** TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör- $\alpha$  ; TGF- $\beta$ : Tümör growth faktör- $\beta$  ; IL-4: İnterlökin-4 ; IL-6 : İnterlökin-6; IL-10: İnterlökin-10 ; IL-12: İnterlökin-12 ; IL-12B4: İnterlökin-12 bölü İnterlökin-4.

**Açıklama:** Çoklu grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır

İntestinal mukozal immünite incelemesi için terminal ileumdan 5-10 cm'lik parsiyel rezeksiyon yapıldı. Alınan materyal örneğinin içi serum fizyolojik ile yıkandı ve örnekler formol içine konarak histopatolojik incelemeye alındı.

**İstatistiksel Analizler:** Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı ile yapıldı. Önce "Kruskal wallis" testi ile analiz yapıldıktan sonra, anlamlı sonuç veren grupların ikiyeşerli olarak karşılaştırılmalarında denek sayısına uygun olarak nonparametrik bir yöntem olan "Mann Whitney-U" testi kullanıldı. p değeri 0.05'ten küçük ( $p < 0.05$ ) bulunduğu sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

İntestinal mukozal immünite incelemesi açısından, gruplar arasında histopatolojik olarak anlamlı bir farka rastlanmadı. SH ve SP grupları dışındaki gruplarda, ince barsak villus yapısında olumlu yönde minimal bir farklılık görülmesine rağmen, bu farklılığın anlamlı olmadığı görüldü.

Sistemik immünite değerlendirmesi için TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 ve IL-12 seviyeleri ölçüldü. Çalışma gruplarında ölçülen sitokin değerlerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Kruskal Wallis yöntemi ile yapılan çoklu grupların istatistiksel karşılaştırmalarında, gruplar arasında TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-12 ve IL-12/IL-4 arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ( $p < 0.05$ ). İkili analizler ise Mann-Whitney U testi yardımı ile yapıldı ve özellikle SH grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulundu ( $p < 0.05$ ).

Çalışma gruplarında tespit edilen TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-12 ve IL-12/IL-4 düzeylerinin karşılaştırması sonrasında elde edilen sonuçlar sırasıyla şekil 1, 2, 3, 4 ve 5'te görülmektedir. Bu çalışmada splenektomi uygulanan grupta (SP) bazal duruma göre (SH) sitokin

profilinde meydana gelen değişim TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 ve IL-12/IL-4 düzeylerinde gözlenmiştir (Şekil 2, Şekil 4 ve Şekil 5). Çalışma sonuçlarına göre TGF- $\beta$  düzeyleri SP grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Diğer taraftan SP grubunda IL-12 ve IL-10 düzeyleri SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur.

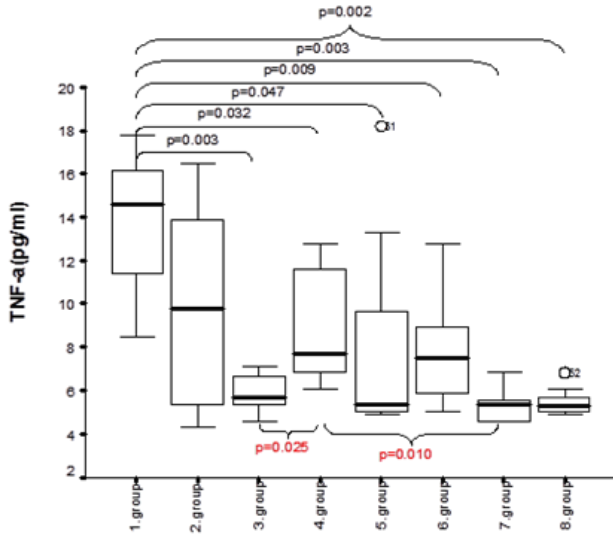
Probiyotik uygulanan tüm gruplarda TNF- $\alpha$  düzeyleri SP grubundan farksız; SH grubundan anlamlı düşük tespit edilmiştir (Şekil 1). TGF- $\beta$  düzeylerine bakıldığında 3, 4, 5, 6 ve 8. gruplarda ölçülen düzeyler SH grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuş; 3. grupta tespit edilen düzeyler SP grubundan da anlamlı yüksek bulunmuştur.

IL-4 düzeyleri bakımından 3, 5, 6, 7 ve 8 gruplarda ölçülen değerler SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuş; 3, 6 ve 7. gruplarda tespit edilen değerler SP grubundan da anlamlı düşük bulunmuştur (Şekil 3). IL-12 düzeyleri B<sub>3</sub> suşu uygulanan 6 ve 8. gruplarda SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuş; SP grubundan farksız tespit edilmiştir (Şekil 4). SP grubunda IL-12 / IL-4 oranı SH grubundan düşük bulunmuştur (Şekil 5).

## Tartışma

Probiyotikler üzerinde yapılan son çalışmalarda yüksek dozda ve sıklıkla farklı *Laktobasil* ve *Bifidobakterileri* içeren probiyotik kombinasyonları daha etkilidir. Tedavi amacıyla kullanılan probiyotik bakterilerin dozu ve uygulama zamanı, probiyotik formülü, canlı/ölü bakteri içeriği ve en önemlisi suş özelliği çok önemlidir.

Probiyotiklerin GALT(barsak mukozası lenfoid dokusu) ile ilişki kurarak lokal mukozal ve sistemik immün fonksiyonları etkilediği belirtilmiştir (8). *Streptococcus thermophilus* ve *L. delbrueckii spp. bulgaricus* gibi EPS üreten starterlar, yoğurt üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Demirev ve ark.(9) radyasyona bağlı intestinal hasar olan ratlarda yaptıkları deneysel

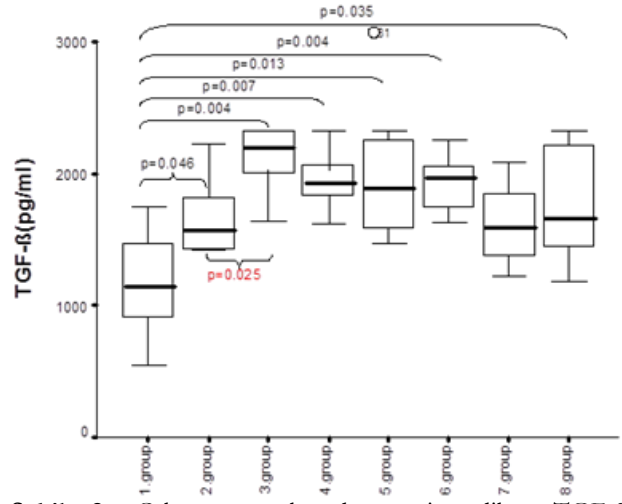


**Şekil 1.** Çalışma gruplarında tespit edilen TNF- $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırması

**Açıklamalar:** İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kutucuk içindeki horizontal çizgi median değeri göstermektedir.

- 1.grup: Sham grubu (SH)
- 2.grup: Splenektomi grubu (SP)
- 3.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP)
- 4.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 5.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 6.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP)
- 7.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>)
- 8.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)

çalışmada, yüksek EPS üreten *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşu probiyotiğın, yara iyileşmesini hızlandırıcı, BT ve diyareyi önleyici yararlı etkileri olduğu sonucuna varmışlardır. Bunun *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşu probiyotiğın neden olduğu antiinflatuar mekanizmalara bağlı olabileceği öngörülmüştür. Şengül ve ark(6) ratlar üzerinde yaptıkları deneysel bir çalışmada, EPS üreten probiyotiklerin deneysel koliti anlamlı olarak iyileştirdiği ve bunun da doza bağımlı olarak EPS'ler tarafından yapılabileceği savunulmuştur. Biz de bu çalışmamızda, daha önceki literatürlerde çok az rastlanan şekilde güçlü ve zayıf EPS üretimi yapan iki benzer lactobasil suşunu kullanarak probiyotiklerin etkileri yanında EPS üretiminin de etkilerini araştırdık;



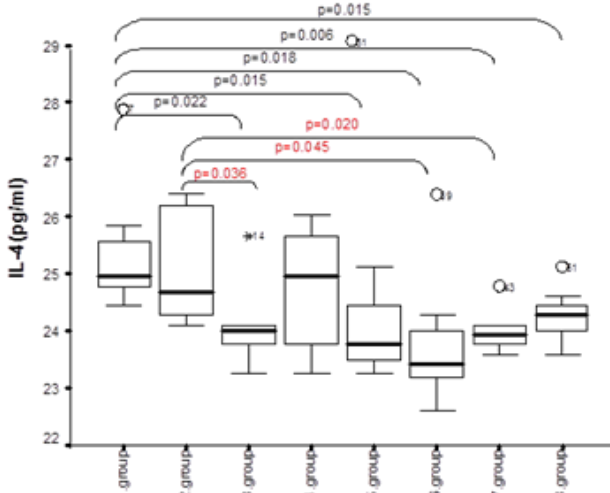
**Şekil 2.** Çalışma gruplarında tespit edilen TGF- $\beta$  düzeylerinin karşılaştırması

**Açıklamalar:** İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kutucuk içindeki horizontal çizgi median değeri göstermektedir.

- 1.grup: Sham grubu (SH)
- 2.grup: Splenektomi grubu (SP)
- 3.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP)
- 4.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 5.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 6.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP)
- 7.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>)
- 8.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)

ve yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel olarak, güçlü EPS üretimi olan *L. delbrueckii spp. bulgaricus* B<sub>3</sub> suşunun, daha güçlü bir antiinflatuar etkiye sahip olduğu sonucuna vardık.

Probiyotik kullanımı ile sistemik immün cevabın değişik seviyelerde arttığını bildiren birçok çalışma mevcuttur(10). Trebichavsky ve Splichal (11) probiyotiklerin, konak doğal immün cevabının - özellikle de sitokin yollarında ve antimikrobiyal ajanların üretiminde- düzenlenmesinde rol aldıklarını ve bu düzenleme ile hem patolojik inflamatuvar reaksiyonların, hem de atopik durumların kontrol altına alındığını belirtmişlerdir. Gill (12), laktik asit bakterilerinin immüniteyi iyileştirici etkilerini, konağın hem nonspesifik, hem de spesifik (antikor üretimi, sitokin üretimi, lenfosit proliferasyonu, gecikmiş tip



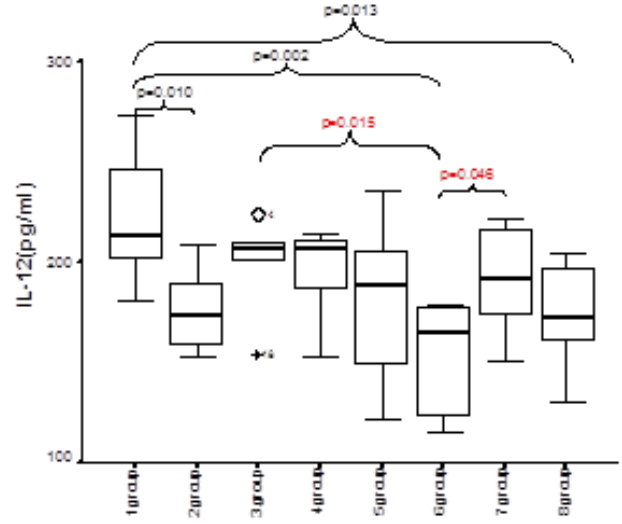
**Şekil 3.** Çalışma gruplarında tespit edilen IL-4 düzeylerinin karşılaştırması

**Açıklamalar:** İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kutucuk içindeki horizontal çizgi median değeri göstermektedir.

- 1.grup: Sham grubu (SH)
- 2.grup: Splenektomi grubu (SP)
- 3.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP)
- 4.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 5.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 6.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP)
- 7.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>)
- 8.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)

hipersensitivite) immün cevaplarını augmente ederek yaptığını belirtmiştir.

Petska ve ark.nın (13) probiyotik eklenmiş veya alışılmış yoğurt ile 14 gün besleme yaptıkları fare deneylerinde dalak ve Peyer plaklarının (PP) incelenmesinde; sistemik veya mukozal immün bölgelerdeki lenfosit dağılımında çok az bir değişiklik olduğu görülmüştür. Biz de çalışmamızda ratlara 7 veya 14 gün süre ile probiyotik uyguladık ve sistemik immün sistemde görülen değişimlere rağmen, mukozal immün sistemde anlamlı bir değişiklik saptamadık. Bunun intestinal sisteme müdahale etmeyip sadece splenektomi yapmış olmamızla ilgisi olabileceğini düşünüyoruz.

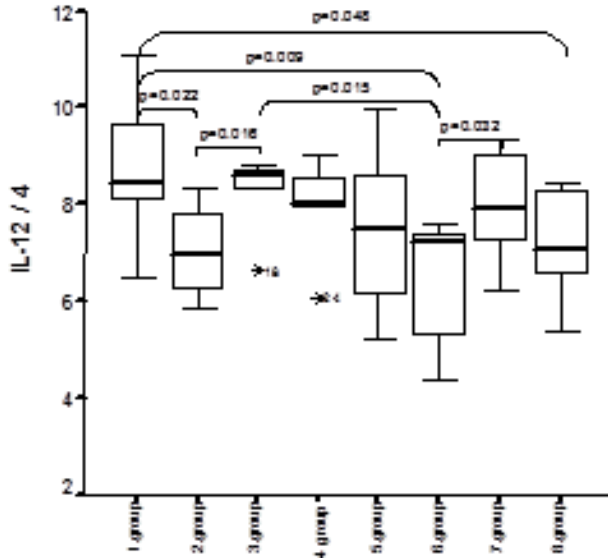


**Şekil 4.** Çalışma gruplarında tespit edilen IL-12 düzeylerinin karşılaştırması

**Açıklamalar:** İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kutucuk içindeki horizontal çizgi median değeri göstermektedir.

- 1.grup: Sham grubu (SH)
- 2.grup: Splenektomi grubu (SP)
- 3.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP)
- 4.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 5.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 6.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP)
- 7.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>)
- 8.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)

Artmış IL-10 üretimi intestinal mukozal inflamasyonu, ya direkt inflamatuvar etki ile ya da düzenleyici T hücrelerinin aktivitesini veya üretimini artırarak sınırlar (14). IL-10 antiinflamatuvar bir sitokindir ve TNF- $\alpha$  üretimini azaltır. TNF- $\alpha$ 'nın aşırı üretimi patolojik inflamatuvar cevaba neden olur. Bizim çalışmamızda splenektomi uygulanan grupta (SP) bazal duruma göre (SH) sitokin profilinde meydana gelen değişim TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 ve IL-12/IL-4 seviyelerinde gözlenmiştir (Şekil 2, Şekil 4 ve Şekil 5). Çalışma sonuçlarına göre TGF- $\beta$  düzeyleri SP grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek; IL-12 ve IL-10 düzeyleri ise düşük bulunmuştur. Bu durum SP grubunda immünosupressif durum lehine bir değişiklik olduğunu desteklemektedir. TGF- $\beta$  başlıca



**Şekil 5.** Çalışma gruplarında tespit edilen IL-12 düzeylerinin IL-4 düzeylerine oranının karşılaştırması

**Açıklamalar:** İki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kutucuk içindeki horizontal çizgi median değeri göstermektedir.

- 1.grup: Sham grubu (SH)
- 2.grup: Splenektomi grubu (SP)
- 3.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP)
- 4.grup: Preoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (PRE PB-A<sub>13</sub> + SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 5.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-A<sub>13</sub> grubu (SP + POST PB-A<sub>13</sub>)
- 6.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP)
- 7.grup: Preoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> + Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (PRE PB-B<sub>3</sub> + SP + POST PB-B<sub>3</sub>)
- 8.grup: Splenektomi + Postoperatif Probiyotik-B<sub>3</sub> grubu (SP + POST PB-B<sub>3</sub>)

CD4<sup>+</sup> ve CD25<sup>+</sup> regülatuar T hücrelerinden salgılanan bir sitokin olup tüm immün sistemi baskılayan ve antiinflamatuvar bir özellik taşımaktadır. TGF-β'nın diğer bir özelliği de mukozal immünitede önemli rol oynayan IgA üretimini uyarmasıdır(11,15). Bu nedenle, çalışmada SP grubunda tespit ettiğimiz TGF-β yüksekliği, organizmanın mukozal immüniteyi destekleyerek splenektomi sonucunda meydana gelen enfeksiyonlara yatkınlık durumunu giderme çabası şeklinde yorumlandı.

SP grubunda IL-12 ve IL-10 düzeyleri SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. IL-12 hakimiyeti Th 1 polarizasyonunda, IL-10 hakimiyeti ise Th 2 polarizasyonunda tespit edilmektedir (15). Her iki

sitokin de splenektomili ratlarda azalması immüno-supresif bir sitokin olan TGF-β'nın yüksekliğine bağlanabilir. Ancak yapılan çalışmalarda TGF-β'nın Th 2 polarizasyonunu indüklediği gösterilmiştir (16). Bununla uyumlu olarak çalışmamızda SP grubunda IL-12 / IL-4 oranı SH grubundan düşük bulunmuştur. SP ve SH grupları arasında IL-4 düzeyi bakımından farklılık olmadığı halde IL-12 / IL-4 oranında tespit edilen düşüklük, SP grubunda Th 2 hakimiyeti olduğunu desteklemektedir.

IL-4, IgE üretiminde rol oynayan sitokinlerden biri olup splenektomi sonrası arttığı bildirilmiştir (17,18). Bu bulgu da splenektomi sonrası Th 2 hakimiyeti geliştiğini göstermektedir. IL-4 düzeyleri bakımından 3, 5, 6, 7 ve 8 gruplarda ölçülen değerler SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuş; 3, 6 ve 7. gruplarda tespit edilen değerler SP grubundan da anlamlı düşük bulunmuştur (Şekil 3). Makino ve arkadaşlarının (19) yaptığı bir çalışmada da oral yoldan *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* OLL1073R-1 suşu verilen farelerde IL-4 üretiminin azaldığı gösterilmiştir.

IL-12 antijen sunucu hücreler tarafından salınan ve olgunlaşmamış CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin Th 1 hücrelerine dönüşmesini sağlayan bir sitokindir. IL-12, NK ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin sitotoksik maturasyon faktörü ve NK hücre stimülatör faktörü olarak bilinir (20). NK ve Th 1 hücreleri ise IFN-γ üretirler. Makrofaj deaktivatörü sitokinler olan TGF-β ve IL-10'un ise makrofajlardan IL-12 üretimini inhibe ettiği bilinmektedir (21). Th 1 polarizasyonunu sağlayan IL-12 düzeyleri B<sub>3</sub> suşu uygulanan 6 ve 8. gruplarda SH grubuna göre anlamlı düşük bulunmuş; SP grubundan farksız tespit edilmiştir (Şekil 4). Bu bulgu da TGF-β'nın IL-12'yi baskılayıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır (22). Diğer taraftan 3 ve 6. gruplar arasında 6. grup lehine tespit edilen IL-12 düşüklüğü B<sub>3</sub> suşunun Th2 polarizasyonunu desteklediğini göstermektedir.

Çalışmamızda immüno-supresif bir sitokin olan IL-10 düzeyleri 3, 4, 5, 6 ve 7. gruplarda SH grubuna göre düşük bulunmuştur. SP grubu ile probiyotik grupları arasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Probiyotiklerin antiinflamatuvar sitokinleri hangi yönde etkilediği konusu açık olmamakla birlikte genellikle laktobasil nesillerinin inflamatuvar bir sitokin olan IFN-γ için potent indüktör oldukları ileri sürülmektedir(23). Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz bulgu, A<sub>13</sub> ve B<sub>3</sub> suşlarının IL-10 üretimini azalttığı yönündedir.

Probiyotik uygulanan tüm gruplarda TNF-α düzeyleri SP grubundan farksız; SH grubundan anlamlı düşük tespit edilmiştir (Şekil 1). TGF-β düzeylerine bakıldığında 3, 4, 5, 6 ve 8. gruplarda ölçülen düzeyler

SH grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuş; 3. grupta tespit edilen düzeyler SP grubundan da anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu bulgu TGF- $\beta$ 'nin TNF- $\alpha$ 'yı baskılayıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır(21).

Probiyotik suşlarının (A<sub>13</sub>, B<sub>3</sub>) splenektomi öncesi ve/veya sonrası uygulanmasının sitokin profili üzerine olan etkisine bakıldığında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak B<sub>3</sub> suşu uygulanan 6. grupta ölçülen IL-12 düzeyleri, A<sub>13</sub> suşu uygulanan 3. gruba göre anlamlı düşük tespit edilmiştir. Yine B<sub>3</sub> suşu uygulanan 7. grupta ölçülen TNF- $\alpha$  düzeyleri A<sub>13</sub> suşu uygulanan 4. gruba göre anlamlı düşük tespit edilmiştir. Bu bulgular B<sub>3</sub> suşunun antiinflatuvar etkisini desteklemektedir ve bunda yüksek EPS üretiminin etkisi olabilir(9).

Sonuç olarak, çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde splenektominin immünosupressif bir etki meydana getirdiği gözlenmiştir. Güçlü bir sitokin olan TGF- $\beta$ 'nin TNF- $\alpha$  yanında Th 1 ve Th 2 sitokinlerini baskıladığı gösterilmiş, fakat oran olarak Th 2 hakimiyeti saptanmıştır. Splenektomi sonrası TGF- $\beta$  düzeylerindeki artış bir yandan mukozal immüniteyi desteklerken, diğer yandan yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Probiyotiklerin sitokin profili üzerine etkileri incelendiğinde A<sub>13</sub> suşunun splenektomi sonrası gelişen TGF- $\beta$  yüksekliğini daha da artırdığı; IL-4'ü ise daha da düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca splenektomi uygulanan gruplarda A<sub>13</sub> suşu uygulamanın TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. B<sub>3</sub> suşu uygulanan gruplarda da benzer şekilde TNF- $\alpha$  düzeylerinin düştüğü; TGF- $\beta$  yüksekliğinin daha arttığı tespit edilmiş, bu suşun Th 1 ve Th 2 sitokinleri olan IL-12, IL-4 ve IL-10'u azalttığı saptanmıştır. EPS üretimi yüksek olan B<sub>3</sub> suşunun splenektomi uygulanan gruplarda IL-12'yi ve TNF- $\alpha$ 'yı düşürücü etkisi EPS üretimi düşük olan A<sub>13</sub>'e göre fazla bulunmuştur.

Sonuç olarak splenektomi ile immünosupressif bir tablo ortaya çıktığı; probiyotiklerin sitokin regülasyonu ile dolaylı olarak antiinflatuvar bir etki oluşturdukları ve meydana getirdikleri sitokin profili ile sistemik olarak mukozal immüniteyi destekledikleri, EPS üretimi kapasitesinin sitokin profili ve dolayısıyla mukozal immünite üzerinde etkisi olduğu söylenebilir. Ancak bu konuda daha kesin kanıt elde etmek için meydana gelen sitokin değişikliğinin kan tablosuna nasıl yansığının gösterilmesi ve intestinal dokulardan moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir. Böylelikle sistemik tablonun intestinal immün sistem üzerine olan lokal etkileri aydınlatılmış olacaktır.

## Kaynaklar

1. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23(2): 403-11.
2. Djouzi Z, Andrieux C, Degivry MC, Bouley C, Szyliet O, The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *J Nutr* 1997; 127(11): 2260-2266.
3. Qin HL, Shen TY, Gao ZG, Fan XB, Hang XM, Jiang YQ et al. Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection. *World J. Gastroenterol* 2005; 11(17): 2591-2596.
4. Van den Dobbelsteen GP, Brunekreef K, Kroes H, van Rooijen N, van Rees EP. Enhanced triggering of mucosal immune responses by reducing splenic phagocytic functions. *Eur J Immunol* 1993; 23(7): 1488-1493.
5. Soares MB, Martinez RCR, Pereira EPR, Balthazar CF, Cruz AG, Ranadheera CS et al. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Res Int* 2019; 125: 108542.
6. Sengul N, Aslim B, Ucar G, Yucel, N, Isık S, Bozkurt H. et al. Effects of Exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum* 2005; 49(2): 250-258.
7. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, Reyes-Gavilan CG, Salminen S. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal mucus. *J Food Protect* 2006; 69(8): 2011-2015.
8. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. Modulation of specific humoral immune responses and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 10(1): 55-63.
9. Demirer S, Aydıntug A, Aslim B, Kepenekci I, Sengul N, Evirgen O et al. Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition* 2006; 22(2): 179-186.
10. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995; 78(3): 491-497.



11. Trebichavsky I, Splichal I. Probiotics manipulate host cytokine response and induce antimicrobial peptides. *Folia Microbiol* 2006; 51(5): 507-510.
12. Gill HS, Rutherford KJ. Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *Br J Nutr* 2001; 86(2): 285-289.
13. Pestka JJ, Ha CL, Warner RW, Lee JH, Ustunol Z. Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *J Food Prot* 2001; 64(3): 392-395.
14. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53(11): 1602-1609.
15. Kokuludağ A. Sitokinler. *Klinik Romatoloji. Deniz Matbaası*. 1999; 40-45.
16. Schiött A, Sjögren HO, Lindvall M. Association of decreased phosphorylation of ERK-2 with costimulation of rat T cell activation by MEK-1 inhibitors and TGF- $\beta$ 1. *Immunol Lett* 2000; 72(3): 183-190.
17. Chelazzi G, Pinotti G, Nicora C, Rossi D, Senaldi G. Increased total serum IgE concentration in patients who have undergone splenectomy after trauma. *J Clin Pathol* 1985; 38(11): 1309-1310.
18. Balsalobre B, Enguidanos MJ, Hernández-Godoy J, Planelles D, Mir A. Changes in total serum IgE concentrations after splenectomy. *J Investig Allergol Clin Immunol* Sep-Oct 1993; 3(5): 268-270.
19. Makino S, Ikegami S, Kano H, Sashihara T, Sugano H, Horiuchi H et al. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J Dairy Sci* 2006; 89(8): 2873-2881.
20. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF). A cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170(3): 827-845.
21. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 83-243.
22. Chen CC, Louie S, Shi HN, Walker WA. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res* 2005; 58(6): 1185-1191.
23. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(12): 1634-1640.