

DOI: 10.4274/jarem.galenos.2019.2247

J Acad Res Med 2020; 10(1): 41-7

# TNBS ile Oluşturulmuş Deneysel Rat Kolit Modelinde Tedavide Karışım Probiyotikler Etkin midir?

## Is the Probiotic Mixture Effective in the Treatment of TNBS-induced Experimental Colitis?

Özlem Gül Utku<sup>1</sup>, Eylem Karatay<sup>2</sup>, Bilal Ergül<sup>1</sup>, Canan Yılmaz<sup>3</sup>, Özgür Ekinci<sup>4</sup>, Mehmet Arhan<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenteroloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>5</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Cite this article as:** Utku ÖG, Karatay E, Ergül B, Yılmaz C, Ekinci Ö, Arhan M. Is the Probiotic Mixture Effective in the Treatment of TNBS-induced Experimental Colitis? JAREM 2020;10(1): 41-7

### ÖZ

**Amaç:** Enflamatuvar barsak hastalıkları (EBH) kronik idiyopatik hastalıklardır. EBH patogenezinin en kabul edilen hipotezi, genetik, çevresel faktörler ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık etkileşimlerin, anormal immün yanıtlara ve kronik intestinal enflamasyona yol açmasıdır. Disbiyozis barsak mikrobiyota bileşiminde ve işlevinde değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Klinik ve deneysel çalışmalar disbiyozisin EBH etiopatogenezinde önemli rol oynadığını desteklemektedir.

Bu çalışmada, deneysel kolit modelinde *Enterococcus Faecium*, *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus Rhamnosus*, *Bifidobacterium Bifidum*, *Bifidobacterium Longum* bakterilerinin anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkinlikleri ve steroide göre probiyotiklerin tedavi başarısının değerlendirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Bu çalışmada toplam 24 adet 200-250 gram ağırlığında Wistar-Albino dişi rat grubu kullanıldı. Her grupta 6 rat olacak şekilde 4 farklı grup oluşturuldu. Sağlıklı kontrol (sham: grup A), trinitrobenzenesülfonik asit (TNBS) koliti (grup B), (TNBS + metilprednizolon: grup C) ve probiyotik (TNBS + P: grup D). Sıçanlar 8. günde sakrifiye edildi. Makroskopik ve mikroskopik skorları değerlendirildi, doku miyeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA) ve süperoksitdismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Makroskopik ve mikroskopik skor düzeyleri değerlendirildiğinde A grubunun makroskopik skoru B, C ve D gruplarından düşüktü ve istatistiksel anlamlı farklılık mevcuttu. C grubunun makroskopik ve mikroskopik skoru B grubuna göre düşüktü ve istatistiksel anlamlı farklılık bulundu. Gruplar arasında ortalama MPO düzeyleri açısından anlamlı fark ( $p < 0,001$ ) tespit edilmedi. MDA ve SOD değerleri değerlendirildiğinde medyan MDA düzeyleri arasında anlamlı farklılık tespit edildi ( $p < 0,001$ ).

**Sonuç:** Çalışmamız probiyotiklerin anti-oksidan ve oksidan sistemler arasındaki dengeyi düzenlediğini göstermektedir. Eğer klinik çalışmalar ile desteklenirse probiyotikler EBH'de destek tedavisi olarak kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** EBH, MDA, MPO, SOD, probiyotikler

### ABSTRACT

**Objective:** Inflammatory bowel disease (IBD) is an idiopathic disease associated with changes in the immune system and in the intestinal microbiota. The most accepted hypothesis of IBD pathogenesis is thought to be the abnormal immunological response and chronic intestinal inflammation, which is caused by the complex interactions between genetic, environmental factors and the host immune system. Microbial flora is important in the maturation of the immune system. Dysbiosis is defined as changes in intestinal microbiota composition and function. Clinical and experimental studies support that dysbiosis plays a significant role in the etiopathogenesis of IBD. Probiotics are useful live microorganisms that provide the intestinal balance in the host. In this study, we aimed to evaluate the anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* bacteria in the experimental colitis model.

**Methods:** Twenty-four female Wistar-Albino rats and 30 mg 0.5 mL trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) dissolved in 50% ethanol which induced colitis by intrarectal installation. Rats were divided into four groups; healthy control (sham: group A), TNBS colitis (group B), (TNBS + methylprednisolone: group C) and probiotic (TNBS + P: group D). The rats were sacrificed on the 8<sup>th</sup> day. Macroscopic and microscopic scores, tissue myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels were measured.

**ORCID IDs of the authors:** Ö.G.U. 0000-0003-1043-2627; E.K. 0000-0003-3738-3554; B.E. 0000-0001-9286-7119; C.Y. 0000-0003-2769-3073, Ö.E. 0000-0003-0364-1316, M.A. 0000-0003-2769-3073.



**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Özlem Gül Utku,  
E-posta: ozlemgulx@yahoo.com

**Geliş Tarihi/Received Date:** 22.09.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 07.03.2019

©Telif Hakkı 2020 Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Makale metnine www.jarem.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by University of Health Sciences Turkey Gaziosmanpaşa Training and Research Hospital. Available on-line at www.jarem.org

**Results:** Macroscopic and microscopic scores levels in group A were significantly lower than in group B, C and D. Macroscopic and microscopic scores levels in group C were significantly lower than in group B. Macroscopic scores were statistically similar between group C and D. There was a statistically significant difference between the groups in terms of median MDA levels and median SOD levels ( $p<0.001$ ). There was no statistically significant difference between the groups in terms of median MPO levels ( $p=0.114$ ). Median MPO levels were 0.27 (0.15-0.30) in group A, 0.44 (0.22-0.61) in group B, 0.28 (0.25-0.50) in group C, and 0.30 (0.25-0.37) in group D ( $p=0.114$ ). Median MDA levels were 1.1 (1.0-2.8) in group A, 4.3 (3.1-5.5) in group B, 3.8 (3.2-4.2) in group C, and 3.9 (3.1-4.2) in group D ( $p<0.001$ ). Median SOD levels were 160.7 (150.1-161.7) in group A, 141.6 (137.9-147.3) in group B, 157.6 (155.2-167.7) in group C, and 164.7 (160.3-168.3) in group D ( $p<0.001$ ). MDA levels were statistically significantly different between each group. These levels were significantly higher in group B, C and D than in group A; statistically similar in group C and D; and statistically higher in group B than in group C and D ( $p<0.001$  &  $p=0.047$ ). SOD levels were statistically significantly different between each group. They were significantly lower in group B, C and D than in group A; statistically significantly different in group A, C and D; and statistically higher in group D than in group A and C.

**Conclusion:** Our study showed that probiotics regulate the balance between anti-oxidant and oxidant systems. Therefore, probiotics can be used as a supportive treatment in inflammatory bowel diseases if promoted by clinical trials.

**Keywords:** IBD, MDA, MPO, SOD, probiotics

## GİRİŞ

Probiyotikler buldukları konaktaintestinal dengeyi sağlayan, yararlı canlı mikroorganizmalardır. Gastrointestinal sistem yararlı veya zararlı milyonlarca bakterinin kolonizasyon yeridir. Asidik karakterde sıvı ve koruyucu sekresyonlarından dolayı mide çok az miktarda bakteri içerir fakat bakterilerin belirli türleri gastrointestinal sistem boyunca göç ederek, barsaklara özellikle kolana yerleşirler (1). Feçesin %20'sini çoğu kolondan gelen bakteriler oluşturur. Normal insanların kolonlarında floranın büyük bir kısmı ve feçesin kuru ağırlığının %60'dan fazlasını bakteriler oluşturur. Kolondaki ana bakteri türleri *Lactobasillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Coliforms*, *Clostridium* ve *Saccharomyces* türleridir. Sağlıklı bir birey barsaklarında yaklaşık 100 trilyon bakteri taşır. Dünyada yaygın olarak yoğurt ve fermente gıdalarla tüketilmekle birlikte, çeşitli diyet takviyeleri ve fonksiyonel gıdalar gibi değişik formlarda bulunur ve kullanılır (2). Mikrobiyal flora immün sistemin matürasyonuna, besinler ve dışardan alınan patojenik mikroorganizmaları tanıma ve yok etme yeteneğinin oluşmasına katkı sağlar. Kolonik morfolojinin oluşmasında ve sürekli enflamatuvar cevabın kontrolünde önemli role sahiptir. Kolonik mukozaya bariyer oluşturarak mikroorganizma ve allerjenlerin vücuda girişini engeller (3,4).

Enflamatuvar barsak hastalıkları (EBH) kronik enflamatuvar hastalıklardır. Ülseratifkolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki majör tipi vardır. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 3,5 milyon insan etkilenmektedir. Her iki hastalığın insidansı tüm dünyada artmasına rağmen, etiyolojileri belirsizliğini korumaktadır ve henüz kür sağlayan bir tedavi yöntemi bulunamamıştır (5). EBH patogenezinin en kabul edilen hipotezi, genetik, çevresel faktörler ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık etkileşimlerin, anormal immün yanıtlara ve kronik intestinal enflamasyona yol açmasıdır. Disbiyozis barsak mikrobiyota bileşiminde ve işlevinde değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Klinik ve deneysel çalışmalar disbiyozisin EBH etiyopatogenezinde önemli rol oynadığını desteklemektedir (6). Son zamanlarda barsak mikrobiyota bileşiminin probiyotikler veya fekaltransplantasyon ile değiştirilmesi destek ve tedavi edici yöntemler arasında ilgi odağı olmuştur.

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulmuş kolit modelinde *Enterococcus Faecium*, *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus Rhamnosus*, *Bifidobacterium Bifidum*, *Bifidobacterium Longum*

bakterilerinin anti-enflamatuvar ve antioksidan etkinlikleri ve steroide göre probiyotiklerin tedavi başarısının değerlendirilmesi amaçlandı.

## YÖNTEMLER

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Patolojik incelemeler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada toplam 24 adet 200-250 gram ağırlığında Wistar-Albino dişi rat grubu kullanıldı. Deneysel öncesi tüm hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Her grupta 6 rat olacak şekilde 4 farklı grup oluşturuldu. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (22-24 °C) bulunduruldu ve standart rat yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi. Her bir ratın yediği yem ve içtiği sıvı miktarının belirlenmesi için ratlar tekli kafeslere konuldu. Ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma boyunca her gün ratların ağırlıkları kaydedildi.

Ratlara anestezi, intramüsküler ketamin hidroklorür (Ketalar, Parke Davis ve Eczacıbaşı, İstanbul) 50 mg/kg dozunda + ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer HealthCare) 5 mg/kg enjekte edilerek sağlandı. Deneysel kolit oluşturmak için 30 mg (80 mg/kg) trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) (92823, pikirilsülfonik asit çözeltisi + %50 etanol karışımı) kullanıldı. TNBS Sigma'dan (Sigma, La Verpaille-re, Fransa) satın alınmıştır.

**Grup A (n=6):** Sham grubu; İntarektal 7 gün 2 mL serum fizyolojik alan grup,

**Grup B (n=6):** TNBS ile kolit oluşturulan ve herhangi bir tedavi almayan grup,

**Grup C (n=6):** TNBS ile kolit oluşturulduktan 24 saat sonra prednol 2 mg/gün oral verilen grup,

**Grup D (n=6):** TNBS ile kolit oluşturulduktan 24 saat sonra günde 1 saşe oral probiyotik (*E. Faecium*, *L. Acidophilus*, *L. Rhamnosus*, *B. Bifidum*, *B. Longum*) günde 3 doz şeklinde gavajla 7 gün boyunca verildi.

**Semptomların gözlemlenmesi:** Hayvan modelinin kurulmasından sonra, sıçan dışkıları günlük olarak toplandı. Dışkı, kan, aktivite, kürk, gıda alımı ve kilo dahil olmak üzere sıçanların genel durumu gözlemlendi.

**Cerrahi yöntem:** İntramüsküler olarak 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin uygulanması ile sağlanan anestezi sonrası, kolit modellerinde ve kontrol grubunda ksifo-pubik medyan kesi ile laparotomi yapıldı, eksplorasyon gerçekleştirildi. Takiben transvers kolonun ortasından rektum distalde mümkün olan en aşağı seviyeden transekte edildi ve yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti çıkarıldı. Çıkarılan kolon dokusu longitudinal olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Kolon örneğinin bir parçası %10 formaldehit içinde tespit edildi. Diğer yarısı işlem gününe kadar -80 °C derin dondurucuda (Sanyo MDF-U70V) saklandı. Derin anestezi altında (ketamin 45 mg/kg + ksilazin 5 mg/kg IM intrakardiyak) 5 cc'lik kan alınarak ratlarsakrifiye edildi.

### Histopatolojik İnceleme Yöntemleri

**Makroskopik değerlendirme:** Çıkarılan barsak bölümlerinin longitudinal biçimde açılmasını takiben, hızla serum fizyolojik ile yıkanarak, gruplara ve tedaviye kör bir patoloji uzmanı tarafından Millar ve ark.'nın (7) tariflediği şekilde makroskopik skorlamaları her bir denek için ayrı ayrı yapıldı ve grup ortalamaları hesaplandı.

0 = normal mukoza,

1 = sadece mukozal erozyon,

2 = hafif mukozal ödem, az miktarda kanama ya da küçük erozyonlar,

3 = orta derecede ödem, kanayan ülser yada erozyon,

4 = ciddi ülser, erozyon, ödem ve doku nekrozunun varlığı.

**Mikroskopik değerlendirme:** %10 formalin içinde tespit edilmiş kolon segmentleri, parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5µ kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eosin boyasıyla boyandı. Hazırlanan preparatlar gruplar için gruplara kör bir patoloji uzmanı tarafından ışık mikroskopu altında incelenerek mikroskopik skorlama yapıldı. Skorlama için Ackerman ve ark.'nın (8) kullandığı skorlama sistemi modifiye edilerek her hayvan için ayrı ayrı hesaplandı ve her grubun ortalama skoru elde edildi.

A: Nekrozun derinliği: yok = 0; mukozal = 1; mukozal ve submüközal = 2; mukozal, submüközal ve muskularis propria = 3; tüm kolon duvarında = 4,

B: Nekrozun genişliği: yok = 0; küçük bir alan = 1; orta derecede bir alan = 2; büyük bir alan = 3; yaygın = 4,

C: Enflamasyonun derecesi: yok = 0; minimal = 1; ılımlı = 2; orta derecede = 3; ciddi = 4,

D: Enflamasyonun genişliği: yok = 0; mukozal = 1; mukozal ve submüközal = 2; mukozal, submüközal ve muskularis propria'da = 3; tüm kolon duvarında = 4.

### Doku Miyeloperoksidaz Aktivitesi için Dokuların Hazırlanması ve Miyeloperoksidaz Ölçümü

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin homogenat tarafından oksitlenerek O-dianisid'inin redüklenmesi ve redükte O-dianisid'inin 410 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. 130 mg barsak mukozası 1,3 mL soğuk 20 mM'lik EDTA ile homojenize edildi. Homojenattan 1'er mL alınıp ependorf tüplerine konuldu ve 20,000 g'de 15 dk + 4 derecede santrifüj

edildi. Süpernatant atılıp PELLET, 1,3 mL 50 mM'lik tampon (pH 6) ile 60 snsonike edildi, sonra 20,000 g'de 15 dk + 4 derecede tekrar santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorflara aktarıldı. Bu süpernatandan miyeloperoksidaz (MPO) düzeyi çalışıldı. 410 nm'de optik dansite köre karşı okundu. 1 Ünite= 37 oC'de dk oluşan optik dansite değişimi olarak kabul edildi. Spesifik aktivite= U/g doku olarak değerlendirildi.

### Malondialdehit Düzeyi, Süperoksitdismutaz Aktivitesi için Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Doku örnekleri 1/10 oranında fosfat buffersalin (pH: 7,4) ile buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantlardan doku malondialdehit (MDA) düzeyi ve doku süperoksitdismutaz (SOD) aktivitesi tayini yapıldı.

### Barsak Dokusu Malondialdehit Analizi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa'nın tarif ettiği yöntemle göre tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA'nın ortam pH'sı 3,5 olduğu koşullarda tiobarbitürik asit ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne göre yapıldı.

### Kolon Mukozası Dokusunda Süperoksitdismutaz Analizi

SOD aktivitesi, Yi-Sun'un tanımladığı, ksantinoksantinoksitaz ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'yi ortadan kaldıracığı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS v.17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki makroskopik skorlar, mikroskopik skorlar ve biyokimyasal parametrelerin analizi için Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U-testi post-hoc test olarak kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Gruplardaki değişkenlerin ortalamaları Boxplot seçilerek çizildi. Sonuçlar arasındaki p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Grup A'da ratlarda kilo kaybı, tüylerde renk değişimi ve dışkı değişimi olmadı deney süresince gıda alımları normaldi. Hayvan modelinin gelişmesinden sonra grup B, C, D'de iştah azalması, dışkı sıklığında artma, kanlı dışkı, kaba tüylü görünüm oluştu.

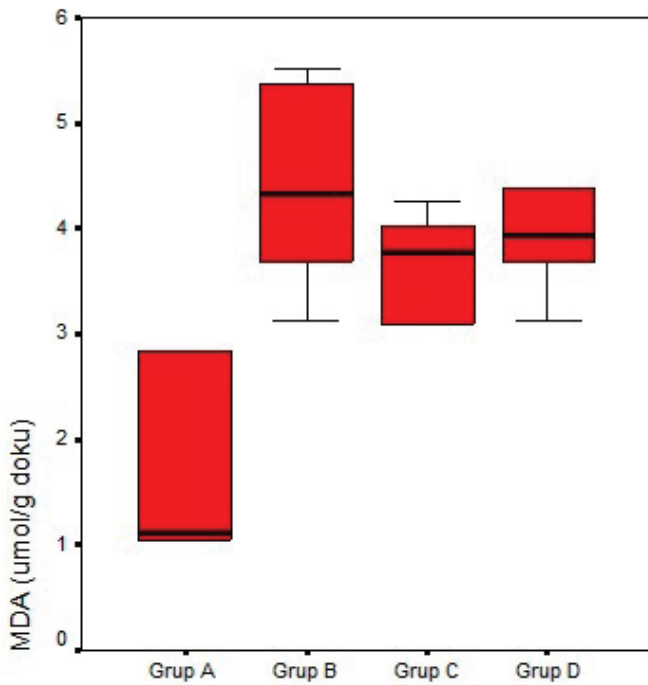
Gruplar arasında medyan MPO düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p=0,114).

Gruplar arasında medyan MDA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup (p=0,002) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde grup A'ya göre sırasıyla; grup B, C ve D'nin medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha

yüksekti ( $p<0,001$ ). Aynı zamanda grup B'ye göre grup C ve D'nin medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,001$  ve  $p=0,047$ ). Grup C'ye göre D'nin de medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p=0,047$ ) (Şekil 1, 2).

Gruplar arasında medyan SOD düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde grup A'ya göre grup B'nin medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşük, grup D'nin medyan SOD düzeyi ise istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Aynı zamanda grup B'ye göre grup C ve D'nin medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Grup C'ye göre D'nin de medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Grup A ile grup C arasında ise medyan SOD düzeyleri istatistiksel olarak benzerdi ( $p=0,106$ ) (Tablo 1).

Grup A içerisinde 1. güne göre 8. gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüdü. Grup B içerisinde 1. güne göre



Şekil 1. Gruplara göre malondialdehit düzeyleri  
MDA: Malondialdehit

Tablo 1. Gruplara göre enflamasyon markerlerine ait ölçümleri

Gruplar	MPO (U/g doku)	MDA (umol/g doku)	SOD (U/g doku)
Grup A (kontrol)	0,27 (0,15-0,30)	1,1 (1,0-2,8) <sup>a,b,c</sup>	160,7 (150,1-161,7) <sup>a,c</sup>
Grup B (TNBS)	0,44 (0,22-0,61)	4,3 (3,1-5,5) <sup>a,d,e</sup>	141,6 (137,9-147,3) <sup>a,d,e</sup>
Grup C (TNBS + MP)	0,28 (0,25-0,50)	3,8 (3,2-4,2) <sup>b,d,f</sup>	157,6 (155,2-167,7) <sup>d,f</sup>
Grup D (TNBS + P)	0,30 (0,25-0,37)	3,9 (3,1-4,2) <sup>c,e,f</sup>	164,7 (160,3-168,3) <sup>c,e,f</sup>
p	0,114 <sup>†</sup>	<b>0,002<sup>†</sup></b>	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>

†Kruskal Wallis testi, <sup>a</sup>: grup A ile B arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ), <sup>b</sup>: grup A ile C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ), <sup>c</sup>: grup A ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ), <sup>d</sup>: grup B ile C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ), <sup>e</sup>: grup B ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ), <sup>f</sup>: grup C ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ).

MPO: Miyeloperoksidaz, MDA: malondialdehit, SOD: süperoksitdismutaz, MP: metilprednizolon P: probiyotik, TNBS: trinitrobenzen sülfonik asit

8. gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p<0,001$ ). Grup C içerisinde 1. güne göre 8. gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p<0,001$ ). Grup D içerisinde 1. güne göre 8. gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p<0,001$ ).

Gruplar arasında kilo kaybı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde grup A'ya göre sırasıyla; grup B, C ve D'de ortalama kilo kaybı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Grup B ile grup C arasında, grup B ile grup D arasında, grup C ile grup D arasında kilo kaybı ortalamaları istatistiksel olarak benzer bulundu ( $p=0,550$ ;  $p=0,077$  ve  $p=0,608$ ) (Tablo 2).

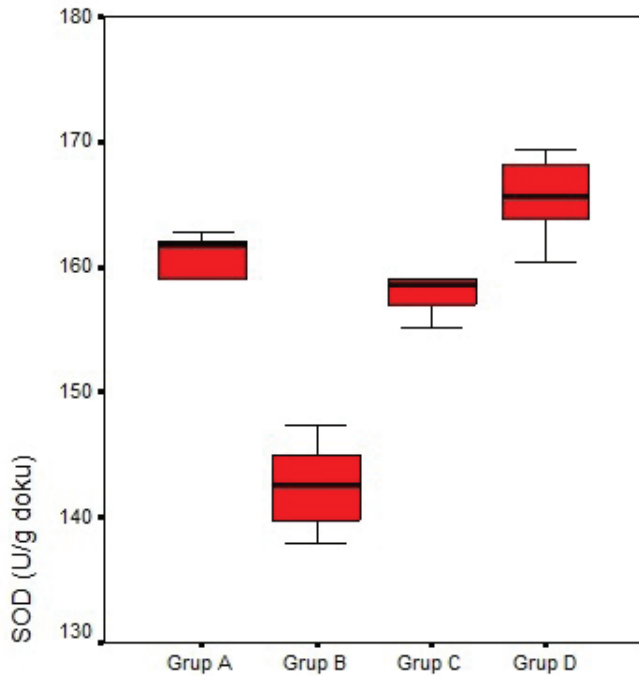
Gruplar arasında medyan makroskopi skorları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde grup A'ya göre sırasıyla; grup B, C ve D'nin medyan makroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,001$ ). Aynı zamanda grup C ve grup D'ye göre grup B'nin medyan makroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p=0,002$  ve  $p<0,001$ ). Grup C ve grup D arasında ise medyan makroskopi skorları istatistiksel olarak benzer bulundu ( $p=0,093$ ) (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Probiyotiklerin barsak mukozasında düzenleyici etkileri vardır. Bu etkiler reseptör antagonizmi, reseptör ekspresyonu, adaptör proteinlerin bağlanması ve ekspresyonu, negatif regülatör sinyal moleküllerinin ekspresyonu, mikroRNA'ların indüklenmesi, endotoksin toleransı ve bağışıklık sistemini modüle etmek için immünomodülatör proteinlerin, lipidlerin ve metabolitlerin salgılanmasının uyarılmasından oluşmaktadır. Probiyotiklerin immün sistem üzerine sadece aktive edici etkileri yoktur aynı zamanda baskılayıcı etkide oluştururlar. İmmün sistem üzerine direkt veya indirekt etki ile hemostaz, enflamasyon ve immünopatoloji yollarını etkileyebilir (1). Probiyotiklerin testinal epiteli geçerek payer plaklarındaki immünomodülatör olan M hücrelerine ulaşırlar. M hücreleri probiyotik bakterileri ve onların çözünür proteinlerini mukozallenfoid dokuya iletir ve immünoregülasyonu başlatır. Antimikrobiyal aktivite artar ve sonuç olarak mukozal immüoglobulin A artar. Mukozada yerleşik goblet hücrelerini aktive ederek mukus salgısını uyarır, epitele patojenlerin tutunmasına ve dokuya yerleşmesine engel olur. Epitel hücreleri arası bağlantıları

güçlendirerek mukozal bütünlüğü artırır. Lipopolisakkaritlerin CD14 reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek nükleer faktör- $\kappa$ B aktivasyonunu ve proenflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltır. Laminapropriada yerleşik B ve T lenfosit fonksiyonları üzerine düzenleyici etkileri vardır. Probiyotiklerin testinal enflamasyonun oluşmasında merkezi rol oynayan tümör nekroz faktörü-alfa ve interferon gama sekresyonunu azaltırlar. Regülatuvar T-hücrelerini interlökin-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta aracılığı ile uyarırlar. Böylece enflamasyon üzerine düzenleyici etki gösterirler. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri oldukça yaygın probiyotik türleridir ve gastrointestinal sistemde doğal olarak da bulunurlar. Bu bakteriler sindirim sürecine yardımcı olan faydalı bakterilerdir (9).

EBH remisyon ve aktivasyonlarla seyreden kronik enflamatuvar hastalıklardır. EBH'nin etiyoğrafisi hala tam olarak bilinmemektedir. Genetik, çevresel faktörler, luminalmikroflora ve immün sistem arasındaki karşılıklı etkileşim sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Antibiyotikler ve immünomodülatör ilaçlar



**Şekil 2.** Gruplara göre süperoksitdismutaz düzeyleri  
SOD: Süperoksitdismutaz

bu hastalıkların tedavisinde önemli yere sahip olmakla beraber, EBH için ideal tedavi yöntemi hala tartışılmaktadır. Son yıllarda, barsak mikrobiyotası değişimlerinin birçok gastrointestinal hastalığa yakınlığı tetiklediğine dair şüpheler artmıştır. Bunun sonucunda da dikkatler probiyotiklerin tedavide kullanılmasına yoğunlaşmıştır. TNBS ile oluşturulan kolit modellerinde ve EBH'li hastalarda yapılan çok sayıda çalışma daprobiyotiklerin anti-enflamatuvar etkinlikleri doğrulanmıştır (4,9,10). Probiyotiklerin EBH semptomlarını nasıl azalttığı ile ilgili mekanizmalar bilinmemesine rağmen, gastrointestinal sistemdeki bakterilerin kompozisyonun değişiminde rol oynadıkları, patojen mikroorganizmalar ile epitele tutunmada yarışa girerek onların enfeksiyon oluşumunu engelledikleri, mukozal immün hücrelerin fonksiyonunu düzenledikleri, bakteriosin, hidrojen peroksit, asetik asit, laktik asit gibi antimikrobiyal faktörlerin oluşumunu uyararak patojen mikropların çoğalmasını inhibe ettikleri, epitel arası bağlantıları artırıp mukozal bütünlüğü sağlayarak mukozanın bariyer fonksiyonlarını artırıcı etki gösterdikleri ve T-hücre apoptozisini indükledikleri bilinmektedir (11).

Bu çalışmada kronik enflamasyon oluşturması, spontanremisyon gelişmemesi, EBH patogenezi benzer enflamasyon oluşması nedeni ile TNBS ile oluşturulmuş kolit modelini tercih ettik. Takiben, sıçanlardan alınan kolon örneklerini mikroskopik ve makroskopik olarak inceledik. Herhangi bir nedenle nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin, mast hücrelerinin aktivasyonu ve dokuda oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitleri oluşumu mukozal bozulmaya ve ülserasyona yol açması barsak enflamasyonunun patogenezi oluşturur. Bu nedenle biz bu çalışmada enflamasyon, oksidatif stres ve fibrotik belirteçler

**Tablo 3.** Gruplara göre makroskopi skorları

Gruplar	Makroskopi skoru
Grup A	0 (0-0) <sup>a,b,c</sup>
Grup B	3,5 (2-4) <sup>a,d,e</sup>
Grup C	2 (1-3) <sup>b,d</sup>
Grup D	2 (2-3) <sup>c,e</sup>
p	<0,001†

†Kruskal-Wallis testi, <sup>a</sup>: grup A ile B arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), <sup>b</sup>: grup A ile C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), <sup>c</sup>: grup A ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), <sup>d</sup>: grup B ile C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p=0,002), <sup>e</sup>: grup B ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001)

**Tablo 2.** Gruplara göre 1. ve 8. gün vücut ağırlıkları

	1. gün	8. gün	p†	Değişim	p‡
<b>Vücut ağırlığı</b>	-	-	-	-	<0,001
Grup A	227,3±6,8	224,0±6,6	0,118	-3,3±1,2 <sup>a,b,c</sup>	-
Grup B	233,7±9,2	176,7±14,0	<0,001	-57,0±14,0 <sup>a</sup>	-
Grup C	226,1±9,4	178,3±10,2	<0,001	-47,8±18,1 <sup>b</sup>	-
Grup D	230,0±8,9	190,7±13,0	<0,001	-39,3±6,0 <sup>c</sup>	-

†Bağımlı t-testi, gruplar içerisinde 1. gün ve 8. gün vücut ağırlıkları arasında yapılan karşılaştırmalar, ‡One-way ANOVA, gruplar arasında 1. güne göre 8. günde vücut ağırlığında meydana gelen değişimler yönünden yapılan karşılaştırmalar, <sup>a</sup>: grup A ile B arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), <sup>b</sup>: grup A ile C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), <sup>c</sup>: grup A ile D arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001)



olan, SOD, MPO, MDA doku düzeylerini belirledik ve grupları bu moleküllerin doku düzeyleri açısından birbirleri ile karşılaştırdık. Bu şekilde enflamasyonun çok erken döneminde mukozada var olması beklenen enflamatuvar ve antioksidan belirteçler üzerinde probiyotiklerin etkilerini araştırdık.

Sham grubu (grup A), kontrol grubu (grup B), steroid tedavisi alan grup (grup C), probiyotik alan grup (grup D) 1. ve 8. gün kilo farkı yönünden karşılaştırıldığında grupların kendi içerisinde 1. ve 8. gün kilo ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu. Gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında sham grubu ile kolit oluşturulan gruplar arasında kilo kaybı açısından anlamlı farklılık mevcut iken, kontrol grubu, standart grup ve test grubu arasında kilo kaybı istatistiki olarak benzer bulundu. Bu da deneklerin homojen seçildiğini desteklemekteydi. Bu durum kolit indüksiyonunun 24 saat öncesinden itibaren sıçanlara yem verilmemesi, ayrıca İR-TNBS verilmesi dolayısıyla anestezi alan sıçanların oral alımlarının azalmasına bağlı olabilir.

Kolit oluşturulmuş gruplar, sham grubu ile karşılaştırıldığında, kolonun makroskopik görünümü belirgin farklılık göstermekteydi. Kolit oluşturulmuş gruplarda kolon nekroze, ödemli, rijit görünümde idi ve duvar kalınlıkları artmıştı. Kolit oluşturulmuş gruplarda uterus kolon yapılaşmış, dalak boyutları küçük ve pankreas hiperemik görünümdeydi. Sham grubunda kolon makroskopik ve mikroskopik olarak tamamen normal görünümdeydi, uterus, dalak ve pankreasta kolit oluşturulan gruplarda izlenen patolojik özellikler izlenmedi. Kolit gruplarında mikroskopik olarak belirgin kolonik enflamasyon, erezyon, ülserasyon, nekroz mevcutken, sham grubuna ait preparatlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Bu farklılık bize TNBS'nin kronik kolit modeli oluşturmakta etkin bir kimyasal ajan olduğunu doğrulamıştır.

EBH'lerinde ve deneysel kolitte enflamatuvar süreç; nötrofil, monosit ve lenfosit gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile oluşur. Lökositler serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Reaktif oksijen radikalleri, lipid membranların peroksidasyonu, protein denaturasyonu ve DNA hasarı yaparak hücre ve doku düzeyinde hasara yol açarlar. MPO nötrofillerde bulunan, azurofilik granüllerden en sık salınan enzimdir (12). Enflamasyonlu dokuda nötrofilin filtrasyonu, MPO enzimi aracılığıyla, güçlü sitotoksik oksidanların ortaya çıkmasını kolaylaştırır (13). Yapılan çalışmalarda MPO aktivitesinin, TNBS kolitindeki doku hasarının ciddiyeti ile korele olduğu ve kolit gruplarında kontrol gruplarına göre daha fazla yükseldiği ayrıca nötrofilin filtrasyonunun bir belirteci olduğu gösterilmiştir (13,14). Domek ve ark. (15) kolit modeli oluşturdukları sıçanlarda kolit gruplarına göre tedavi gruplarında MPO aktivitelerini araştırmışlar ve nötrofilin filtrasyon ve aktivasyonunun önemli rol oynadığını bunun da dokudaki MPO düzeyi ile belirlendiğini öne sürmüşlerdir. Karmeli ve ark. (16) sıçanlardaki kolit modelinde COX-2 inhibitörlerinin etkileri karşılaştırılmış ve tedaviyle MPO aktivitelerinin kolit modelindeki deneklere göre %61 azaldığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda steroid alan grup, probiyotik alan grubun MPO düzeyi sham grubuna çok yakın değerlerdeydi. Probiyotik alan grubun MPO düzeyi steroid alan gruptan yüksek bulundu. Deneysel kolit

modelinde MPO düzeyi diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen istatistiki anlamlı farklılık bulunmadı. Gruplar arasında MPO değerlerinde anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen, MPO değerlerinin sham ve tedavi grubunda kolit modeline göre düşük değerlerdeydi.

Malondialdehit artışı dokularda lipit peroksidasyonun klinik ve deneysel çalışmalarda en önemli laboratuvar göstergesidir (17). Akut enflamasyonda aktive nötrofiller dolaşımdan ayrılarak barsağın mukoza ve submukozasına girer ve enflamatuvar hasara katkıda bulunan lipit medyatörlerin, laktoferrin, proteazlar, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin aşırı üretimine neden olur (18). Aytac ve ark. (19) asetik asit ile oluşturdukları kolit modelinde ilioprostun doku MDA düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğünü gösterdiler. Bizim çalışmamızda sham grubuna göre kolit grubunda ve kolit oluşturulup tedavi alan gruplarda MDA düzeyi anlamlı olarak yüksekti ve probiyotik alan grupta MDA düzeyi steroid alan gruba göre daha düşüktü ve bu durum istatistiki olarak anlamlıydı. MPO ve MDA düzeyleri değerlendirildiğinde steroid kadar olmasada kontrol grubuna göre değerlerin düşük olması probiyotiklerin anti-enflamatuvar etkinliğinin olabileceğini destekler nitelikteydi.

SOD, süperoksit anyonlara karşı majör savunma sistemidir. SOD süperoksidin hidrojen peroksida dönüşümünü katalizler. Oksidan moleküllere karşı primer koruyucudur. Üç tür SOD tespit edilmiştir. Mitokondride-SOD bulunan, sitozolde bulunan [(Cu), Zn-SOD], ekstraselüler matrikste bulunan [(EC)-SOD]. EC-SOD endotel ve stromal hücrelerden salınır EBH hastalarında düşme eğilimindedir. Cu, Zn-SOD dominant olarak epitelten salınır ve enflamasyonda düşer. EBH hastalarında plazma ve doku seviyesi düşüktür. Normal barsak mukozasında SOD aktivitesi karaciğer ve akciğere oranla düşük oranlarda bulunmaktadır. Bu seviye enflamatuvar durumlarda daha da düşer (20). Kuralay ve ark. (21), deneysel kolit modelinde SOD seviyelerinin oksidatif strese cevap olarak azaldığını göstermişlerdir. Grisham ve ark. (22) TNBS ile oluşturdukları kolit modelinde SOD aktivitesini düşük bulmuşlardır. Patel ve ark. (23) yaptığı deneysel çalışmada PAR-2 agonistripsin TNBS ile uyarılan kolit modelinde İR olarak 500 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg olarak 3 gruba verilmiş sham grubu ve yalnızca TNBS verilen gruplar karşılaştırılarak MPO, MDA, SOD düzeylerine bakılmış 5 mg/kg uygulanan grupta oksidatif enzimler, makroskopik skor ve mikroskopik skor yüksek bulunurken, antioksidan enzim düzeyleri düşük bulunmuş. Çalışmamızda gruplar arasında SOD düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Sham grubuna göre, kolit oluşturulan tedavi almayan grubun medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşük, probiyotik alan grubunun medyan SOD düzeyi ise istatistiksel anlamlı olarak diğer gruplara göre daha yüksekti. Ayrıca dikkat çekici olarak SOD düzeyi probiyotik alan grupta sham grubuna oranla bile daha yüksekti. Bu durum probiyotiklerin antioksidan etkinliğini destekler nitelikteydi. Çalışmamız probiyotiklerin antioksidan ve oksidan sistemler arasındaki dengeyi düzenlediğini desteklemektedir.

## SONUÇ

Probiyotikler özellikle antioksidan etkileri ile klasik tedaviyi destekleyici tedavi olarak kullanılabilir. Ancak probiyotiklerin

mikrobiyotadaki değişiklikler ile mukozal savunma sistemlerini düzenlediğini ve tedavide etkin olabileceğini gösterecek klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

**Hasta Onamı:** Hayvanlar üzerinde yapıldığı için hasta onayı alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

**Yazarlık Katkıları:** Cerrahi ve Medikal Uygulamalar - Ö.G.U., E.K., Ö.E., M.A.; Fikir - Ö.G.U., E.K., M.A.; Tasarım - Ö.G.U., E.K., B.E., M.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ö.G.U., E.K., C.Y., Ö.E., M.A.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.G.U., E.K., B.E., C.Y., Ö.E., M.A.; Literatür Taraması - Ö.G.U., E.K., B.E., M.A.; Yazıyı Yazan - Ö.G.U., E.K.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** This study was carried out in Gazi University Faculty of Medicine Experimental Animals Laboratory.

**Informed Consent:** Patient approval has not been obtained as it is performed on animals.

**Peer-review:** Internally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Surgical and Medical Practices - Ö.G.U., E.K., Ö.E., M.A.; Concept - Ö.G.U., E.K., M.A.; Design - Ö.G.U., E.K., B.E., M.A.; Data Collection and/or Processing - Ö.G.U., E.K., C.Y., Ö.E., M.A.; Analysis and/or Interpretation - Ö.G.U., E.K., B.E., C.Y., Ö.E., M.A.; Literature Search - Ö.G.U., E.K., B.E., M.A.; Writing Manuscript - Ö.G.U., E.K.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Salek Farrokhi A, Darabi N. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *J Cell Physiol* 2018.
2. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 306-14.
3. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 2005; 54: 896-8.
4. Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 453-67.
5. Verstockt B, Ferrante M, Vermeire S, Van Assche G. New treatment options for inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2018.
6. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018; 11: 1-10.
7. Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-15.
8. Ackerman Z, Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Experimental colitis in rats with portal hypertension and liver disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 18-24.
9. Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 150-2.
10. Wan YM, Zhu YQ, Xia B, Luo J. Treating TNBS-induced colitis in rats with probiotics. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 486-93.
11. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1256-64.
12. Khairy H, Saleh H, Badr AM, Marie MS. Therapeutic efficacy of osthole against dinitrobenzene sulphonate induced-colitis in rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 100: 42-51.
13. Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Dincer C, Batur Y, et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59: 641-52.
14. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 737-46.
15. Domek MJ, Iwata F, Blackman EI, Kao J, Baker M, Vidrich A, Leung FW. Anti-neutrophil serum attenuates dextran sulfate sodium-induced colonic damage in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 1089-94.
16. Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 223-31.
17. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
18. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-65.
19. Aytac E, Teksoz S, Saygili S, Tortum OB, Yavuz N, Sozer V, Goksel S, et al. Iloprost reduces colitis induced oxidative stress: An experimental study in rats. *Turk J Gastroenterol* 2013; 24: 224-9.
20. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003; 201: 7-16.
21. Kuralay F, Yildiz C, Ozutemiz O, Islekel H, Caliskan S, Bingol B, Ozkal S. Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66: 169-79.
22. Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991; 101: 540-7.
23. Patel M, Patel M, Shah G. Investigation of Possible Role of the PAR-2 Receptor in Intestinal Inflammation. *J Young Pharm* 2010; 2: 54-8.