

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI (VETERİNER)**  
**DOKTORA PROGRAMI**

**KÖPEKLERDE GASTROENTERİTİSE NEDEN OLAN BAZI  
ENFEKSİYÖZ VE NON-ENFEKSİYÖZ HASTALIKLARDA  
SERUM VE FEKAL ZONULİN SEVİYELERİNİN TESPİTİ**

**Veteriner Hekim Deniz ŞARDAĞ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Kerem URAL**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
VTF-21031 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Deniz ŞARDAĞ tarafından hazırlanan “Köpeklerde Gastroenteritise Neden Olan Bazı Enfeksiyöz ve Non-Enfeksiyöz Hastalıklarda Serum ve Fekal Zonulin Seviyelerinin Tespiti” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 09.08.2022

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Kerem URAL Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serdar PAŞA Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serkal GAZYAĞCI Kırıkkale Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Hasan ERDOĞAN Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Canberk HARRAN Üniversitesi  
BALIKÇI

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen, tüm dünyayı vuran pandemi esnasında bile her daim bir telefon kadar uzağımda olan, her soruma her derdime sıkılmadan yetişen pek sevgili danışmanım Prof Dr Kerem URAL'a en içten teşekkürleri bir borç bilirim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve doktora dönemi boyunca gerek mental olarak gerekse de mevcut tez için gerekli örneklendirmelerde sonsuz desteği bulunan sevgili Veteriner Hekim Nurcan ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Hepsinin ötesinde düştüğüm her an beni kaldıran, ellerimden tutan ve yol devam ediyor diyerek ışığı gösteren o öpülesi dört elin sahibi çok sevgili annem Nadire ŞARDAĞ ve babam Mustafa ŞARDAĞ için teşekkürler yetersiz, kelimeler kifayetsizdir. Onlara hitaben yazılan bu tezde isimleri geçerken söylenebilecek tek bir cümle var: "Siz olmasanız, olmazdı".

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	i
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	ii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>ÖZET</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Hayvan Sağlığında Gastrointestinal Fonksiyonun Biyobelirteçleri .....	3
2.1.1. Diyet .....	4
2.1.2. Etkili Sindirim ve Absorpsiyon Kapasitesi .....	4
2.1.3. Gastrointestinal Mikrobiyota .....	5
2.1.4. Etkili Bağışıklık Durumu .....	5
2.1.5. Bağırsak Mukozası .....	6
2.1.6. Bağırsağın Nöroendokrin Fonksiyonu .....	7
2.2. Bağırsak Bariyeri .....	8
2.2.1. Bağırsak Fizyolojisi ve Sıkı Bağlantılar .....	8
2.2.2. Bağırsak Bariyeri ve Düzenlenmesi .....	10
2.2.3. Artan Bağırsak Geçirgenliği ve Hastalıklarla İlişkisi .....	12
2.3. Zonulin .....	14
2.3.1. Zonulin Sistemi .....	14
2.3.2. Zonulin Sisteminin Fizyolojisi .....	16

2.3.3. Zonulin Salınımı .....	17
2.4. Zonulin Sisteminin Patolojisi ve Spesifik Hastalıklarda Rolü .....	18
2.4.1. İnflamatuar Bağırsak Hastalığında Zonulinin Rolü.....	23
2.4.2. Çölyak Hastalığında Zonulinin Rolü .....	24
2.4.3. Çölyak Olmayan Glüten Duyarlılığı Hastalığında Zonulinin Rolü.....	29
2.4.4. İrritabl Bağırsak Sendromu Hastalığında Zonulinin Rolü.....	29
2.4.5. Çevresel Enteropatide Zonulinin Rolü .....	29
2.4.6. Nekrotizan Enterokolit Hastalığında Zonulinin Rolü.....	29
2.4.7. Tip 1 Diyabet Hastalığında Zonulinin Rolü .....	30
2.4.8. Obezitede Zonulinin Rolü.....	33
2.4.9. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Zonulinin Rolü.....	34
2.4.10. Multipl Skleroz Hastalığında Zonulinin Rolü .....	35
2.4.12. Akut Akciğer Hasarında Zonulinin Rolü.....	37
2.4.13. Astım Hastalığında Zonulinin Rolü.....	37
2.4.14. Koroner Arter Hastalığında Zonulinin Rolü.....	38
2.4.15. Nörolojik bozukluklarda Zonulinin Rolü .....	38
2.4.16. HIV Hastalığında Zonulinin Rolü .....	39
2.4.17. Ankilozan Spondilitte Zonulinin Rolü.....	39
2.4.18. Sepsiste Zonulinin Rolü.....	41
2.5. Zonulin Sisteminin Terapötik Kullanımı.....	43
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>45</b>
3.1. Gereç.....	45
3.1.1. Cihazlar.....	45
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	45
3.1.3. Hayvan Materyali .....	46
3.2. Yöntem .....	46
3.2.1. Serum Zonulin Analizi .....	48

3.2.2. Fekal Zonulin Analizi .....	48
3.3. Test Metodolojisi .....	48
3.3.1. Test hazırlığı .....	48
3.3.2. Kit kompozisyonu .....	49
3.3.3. Testin yapılışı .....	49
3.3.4. Sonuç Belirleme .....	50
4. BULGULAR .....	52
4.2. İstatiksel Analizler .....	74
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>75</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>80</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>81</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>106</b>
<b>BİLİMSEL ETİK BEYANI .....</b>	<b>108</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ .....</b>	<b>109</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJ	: Ara (adherens) kavşak
ALI	: Acute <i>lung</i> injury (Akut Akciğer Hasarı)
AS	: Ankylosing spondylitis (Ankilozan spondilit)
ASD	: <i>Autism spectrum disorder</i> (Otizm Spektrum bozuklukları)
AT1001	: <i>Larazotide acetate</i> (Larazotid asetat)
AT1002	: <i>Six-mer synthetic peptide</i> (6-mer sentetik peptid)
AQP4	: <i>Akuaporin 4</i>
$\beta$	: <i>Beta hücre</i>
BBB	: <i>Blood–brain barrier</i> (Kan-beyin bariyeri)
BBDP	: <i>BioBreeding diabetic-prone</i> (Diyabetik eğilimli biyolojik ıslah)
CAD	: <i>Coronary artery disease</i> (Koroner Arter Hastalığı)
Caco-2	: <i>Human Colon Carcinoma Cell Line</i> (İnsan kolon kanser hücre dizisi)
CCR5	: <i>Chemokine receptor type 5</i> (Kemokin reseptörü tip 5)
CD	: <i>Celiac disease</i> (Çölyak Hastalığı)
CD45RO	: Memory T Cells (T bellek hücreleri)
CID	: <i>Chronic Inflammatory Diseases</i> (Kronik İnflamatuar Hastalıklar)
CNS	: Merkezi sinir sistemi
CrD	: Crohn's Disease (Crohn hastalığı)
CXCR3	: G proteini bağlı reseptör 9
D	: Desmozom

DC	: Dendritic cell (Dendritik hücre)
EAE	: Experimental autoimmune encephalomyelitis (Deneysel otoimmün ensefalomyelit)
EE	: Environmental <i>enteropathy</i> (Çevresel enteropati)
ECC	: Enterochromaffin <i>cells</i> (Enterokromafin hücresi)
ENS	: Enterik sinir sistemi
<i>EPEC</i>	: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> ( <i>Enteropatojenik Escherichia coli</i> )
FITC d	: Floresan izotiyosiyanat dekstran
GALT	: Gut-associated lymphoid tissue (Sindirim sistemiyle ilişkili lenfoid doku)
<i>GFAP</i>	: <i>Glial fibriler asidik protein</i>
<i>GFD</i>	: <i>Gluten-free diet</i> (Glütensiz diyet)
<i>GI</i>	: <i>Gastrointestinal sistem</i>
<i>GVB</i>	: <i>Gut vascular barrier</i> (Bağırsak vasküler bariyer)
<i>HCS</i>	: <i>Healthy controls</i> (Sağlıklı kontroller)
<i>HIV</i>	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ( <i>İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü</i> )
<i>IEC</i>	: <i>Bağırsak epitel hücresi</i>
<i>IESC</i>	: <i>Intestinal epithelial stem cell</i> (Bağırsak epitelyal kök hücre)
<i>IBD</i>	: <i>Inflammatory bowel disease</i> ( <i>İnflamatuar Bağırsak Hastalığı</i> )
<i>IBS</i>	: <i>Irritable bowel syndrome</i> (Huzursuz bağırsak sendromu)
<i>IBS-D</i>	: <i>İshal ilişkili huzursuz bağırsak sendromu</i>
<i>ICU</i>	: <i>Intensive care unit</i> (Yoğun bakım ünitesi)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	: <i>Interferon gamma</i> ( <i>İnterferon gama</i> )
<i>IgA</i>	: <i>İmmunoglobulin A</i>



<i>IL-6</i>	: <i>Interleukin 6 (İnterlökün 6)</i>
<i>IL-8</i>	: <i>Interleukin 8 (İnterlökün 8)</i>
<i>IL-10</i>	: <i>Interleukin 10 (İnterlökün 10)</i>
<i>IS</i>	: <i>Bağışıklık sistemi</i>
<i>ISC</i>	: <i>Bağırsak kök hücresi</i>
<i>IU</i>	: <i>İnternational unit (Uluslararası ünite)</i>
<i>iFABP</i>	: <i>İntestinal fatty acid binding protein (Bağırsak yağ asidi bağlayıcı protein)</i>
<i>JAM</i>	: <i>Junctional adhesion molecule (Birleşme adezyon molekülü)</i>
<i>kg</i>	: <i>kilogram</i>
<i>L</i>	: <i>Laktuloz</i>
<i>lab</i>	: <i>Laboratuvar</i>
<i>LA/MA</i>	: <i>Laktuloz/Mannitol</i>
<i>LPS</i>	: <i>Lipopolisakkarit</i>
<i>LPS-BP</i>	: <i>LPS-binding protein (Lipopolisakkarit bağlayıcı protein)</i>
<i>M</i>	: <i>Mannitol</i>
<i>mg</i>	: <i>Miligram</i>
$\mu$ g	: <i>Mikrogram</i>
<i>mL</i>	: <i>Mililitre</i>
<i>MLCK</i>	: <i>Miyozin hafif zincir kinaz</i>
<i>MS</i>	: <i>Multiple sclerosis (Multiple Skleroz)</i>
<i>Mv</i>	: <i>Mikrovillus</i>
<i>n</i>	: <i>Subject number (denek sayısı)</i>

ng	: Nanogram
NAFLD	: Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Non-alkolik Steatohepatit
NCGS	: Non-celiac gluten sensitivity (Çölyak olmayan gluten duyarlılığı)
NEC	: Necrotizing enterocolitis (Nekrotizan enterokolit)
<i>ng</i>	: <i>nanogram</i>
<i>(PAR)<sub>2</sub></i>	: <i>Protease activated receptor 2 (proteaz aktive edici reseptör)</i>
PC	: Plasma cell (Plazma hücresi)
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i> (Polimeraz zincir reaksiyonu)
<i>pre-HP2</i>	: <i>pre-haptoglobin2</i>
<i>PT</i>	: <i>Pepsin-tripsin</i>
<i>PT-gliadin</i>	: <i>Enzimatik olarak parçalanmış gliadin</i>
<i>PT-kazein</i>	: <i>Enzimatik olarak parçalanmış kazein</i>
<i>PKC</i>	: <i>Protein Kinaz C</i>
R	: L-ramnoz
RA	: Rheumatoid arthritis ( <i>Romatoid artrit</i> )
<i>RRMS</i>	: <i>Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (Nükseden-Hafifleyen Multiple Skleroz)</i>
<i>RT-PCR</i>	: <i>Quantitative real-time PCR (Kantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu)</i>
<i>SIBO</i>	: <i>Small Intestinal Bacterial Overgrowth (İnce bağırsaklarda aşırı bakteri çoğalması)</i>

<i>SIRS</i>	: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu)</i>
sIgA	: Salgılayıcı IgA (İmmunoglobulin A)
SPMS	: Secondary-Progressive Multiple Sclerosis (Sekonder İlerleyici Multiple Skleroz)
<i>T1D</i>	: <i>Type 1 diabetes (Tip 1 diyabet)</i>
<i>T2D</i>	: <i>Type 2 diabetes (Tip 2 diyabet)</i>
<i>TGF<math>\beta</math></i>	: <i>Transforming growth factor beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)</i>
TJ	: Tight Junction (Hücreler arası sıkı bağlantılar)
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	: <i>Tumor necrosis factor-alpha (Tümör nekroz faktör alfa)</i>
UC	: Ulcerative colitis (Ülseratif kolit)
ZO	: Zonula occludens (Zonula okludens)
ZO-1	: Zonula occludens-1 (Zonula okludens-1)
<i>Zot</i>	: <i>Zonula occludens toxin (Zonula okludens toksin)</i>
~	: Yaklaşık
%	: Yüzde

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnce bağırsak mukozal mimarisi .....	9
Şekil 2. Apikal kavşak kompleksi .....	9
Şekil 3. Bağırsak bariyeri anatomisi ve bileşenleri. ....	10
Şekil 4. Hücreler arası bağlantı noktalarının bir temsili.....	11
Şekil 5. CID'lere yol açan mikrobiyom kompozisyonundaki değişikliklere neden olan çevresel uyaranların öne sürülen etkisi.....	13
Şekil 6. Bağırsak epitel hücrelerinden polarize zonulin salınımına neden olan uyaranlar.....	18
Şekil 7. CID'nin gelişmesine yol açan bariyer fonksiyonunun kaybına neden olan zonulinin öne sürülen mekanizması .....	21
Şekil 8. Zonulin ve kromozom 16 ile ilişkili hastalıklar .....	23
Şekil 9. Glüten yapısı .....	25
Şekil 10. Gliadin motifleri.....	25
Şekil 11. Çölyak hastalarında ve çölyak olmayan kontrollerde CXCR3. ....	26
Şekil 12. Çölyak hastalığı olan hastalarda ve kontrollerde (C), serum zonulin seviyeleri.....	28
Şekil 13. Tip 1 diyabetik denekler.....	32
Şekil 14. Tip 1 diyabetik hastalar .....	32
Şekil 15. Obez denekler ve sağlıklı kontrol grubu serum zonulin ölçüm oranları .....	34
Şekil 16. Obez çocuklar için zonulin seviyeleri .....	35
Şekil 17. Farklı MS türlerinden etkilenen kişilerde serum zonulin seviyeleri .....	36
Şekil 18. (A-D) Ankilozan spondilit (AS) hastaları .....	40
Şekil 19. Ankilozan spondiliti (AS) olan hastalarda okludin, klaudin 4 ve zonulin 1 doku ekspresyonu değişmiştir ve bağırsak bakterileri tarafından modüle edilir. ....	41
Şekil 20. Sağlıklı gönüllülerde, septik olmayan hastalarda ve septik hastalarda plazma zonulin konsantrasyonları, septik hastalarda plazma zonulin konsantrasyonlarının zaman akışı. Çalışma süresi boyunca önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir .....	42
Şekil 21. Zonulin Konsantrasyonu .....	50
Şekil 22. Fekal ve zerum zonulin seviyelerine ait ortanca, minimum ve maksimum değerler.....	53

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Çölyak hastalığında zonulin immunohistokimyası fotomikrografları .....	28
<b>Resim 2.</b> Olgu 1 görselleri.....	54
<b>Resim 3.</b> Olgu 2 görselleri.....	54
<b>Resim 4.</b> Olgu 3 görselleri.....	55
<b>Resim 5.</b> Olgu 4 görselleri.....	55
<b>Resim 6.</b> Olgu 5 görselleri.....	56
<b>Resim 7.</b> Olgu 6 görselleri.....	56
<b>Resim 8.</b> Olgu 7 görselleri.....	57
<b>Resim 9.</b> Olgu 8 görselleri.....	57
<b>Resim 10.</b> Olgu 9 görselleri.....	58
<b>Resim 11.</b> Olgu 10 görselleri.....	58
<b>Resim 12.</b> Olgu 11 görselleri.....	59
<b>Resim 13.</b> Olgu 12 görselleri.....	59
<b>Resim 14.</b> Olgu 13 görselleri.....	60
<b>Resim 15.</b> Olgu 14 görselleri.....	60
<b>Resim 16.</b> Olgu 15 görselleri.....	61
<b>Resim 17.</b> Olgu 16 görselleri.....	61
<b>Resim 18.</b> Olgu 17 görselleri.....	62
<b>Resim 19.</b> Olgu 18 görselleri.....	62
<b>Resim 20.</b> Olgu 19 görselleri.....	63
<b>Resim 21.</b> Olgu 20 görselleri.....	63
<b>Resim 22.</b> Olgu 21 görselleri.....	64
<b>Resim 23.</b> Olgu 22 görselleri.....	64
<b>Resim 24.</b> Olgu 23 görselleri.....	65
<b>Resim 25.</b> Olgu 24 görselleri.....	65
<b>Resim 26.</b> Olgu 25 görselleri.....	66
<b>Resim 27.</b> Olgu 26 görselleri.....	66
<b>Resim 28.</b> Olgu 27 görselleri.....	67
<b>Resim 29.</b> Olgu 28 görselleri.....	67
<b>Resim 30.</b> Olgu 29 görselleri.....	68

<b>Resim 31.</b> Olgu 30 görselleri.....	68
<b>Resim 32.</b> Olgu 31 görselleri.....	69
<b>Resim 33.</b> Olgu 32 görselleri.....	69
<b>Resim 34.</b> Olgu 33 görselleri.....	70
<b>Resim 35.</b> Olgu 34 görselleri.....	70
<b>Resim 36.</b> Olgu 35 görselleri.....	71
<b>Resim 37.</b> Olgu 36 görselleri.....	71
<b>Resim 38.</b> Olgu 37 görselleri.....	72
<b>Resim 39.</b> Olgu 38 görselleri.....	72
<b>Resim 40.</b> Olgu 39 görselleri.....	73
<b>Resim 41.</b> Olgu 40 görselleri.....	73

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Serum zonulin seviyeleri ve çeşitli tight junction (sıkı bağlantı) protein antikorları arasındaki doğrudan veya dolaylı korelasyon tabloda gösterilmektedir. ....	21
<b>Tablo 2.</b> Zonulin' in dahil olduğu CID'lerin listesi .....	22
<b>Tablo 3.</b> Çalışma kapsamına alınan köpekler ve hastalık tanıları.....	47
<b>Tablo 4.</b> Çalışma kapsamına alınan köpeklere yapılan analizler .....	47
<b>Tablo 5.</b> Sonuçların Okunması.....	48
<b>Tablo 6.</b> Kit Kompozisyonu.....	49
<b>Tablo 7.</b> İşletim Prosedürlerinin Özeti .....	51
<b>Tablo 8.</b> Fekal analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. ....	52
<b>Tablo 9.</b> Fekal ve serum analizlerine ait korelasyon analizleri.....	53
<b>Tablo 10.</b> Olgu 1 bilgileri ve hastalık tanısı.....	54
<b>Tablo 11.</b> Olgu 2 bilgileri ve hastalık tanısı.....	54
<b>Tablo 12.</b> Olgu 3 bilgileri ve hastalık tanısı.....	55
<b>Tablo 13.</b> Olgu 4 bilgileri ve hastalık tanısı.....	55
<b>Tablo 14.</b> Olgu 5 bilgileri ve hastalık tanısı.....	56
<b>Tablo 15.</b> Olgu 6 bilgileri ve hastalık tanısı.....	56
<b>Tablo 16.</b> Olgu 7 bilgileri ve hastalık tanısı.....	57
<b>Tablo 17.</b> Olgu 8 bilgileri ve hastalık tanısı.....	57
<b>Tablo 18.</b> Olgu 9 bilgileri ve hastalık tanısı.....	58
<b>Tablo 19.</b> Olgu 10 bilgileri ve hastalık tanısı.....	58
<b>Tablo 20.</b> Olgu 11 bilgileri ve hastalık tanısı.....	59
<b>Tablo 21.</b> Olgu 12 bilgileri ve hastalık tanısı.....	59
<b>Tablo 22.</b> Olgu 13 bilgileri ve hastalık tanısı.....	60
<b>Tablo 23.</b> Olgu 14 bilgileri ve hastalık tanısı.....	60
<b>Tablo 24.</b> Olgu 15 bilgileri ve hastalık tanısı.....	61
<b>Tablo 25.</b> Olgu 16 bilgileri ve hastalık tanısı.....	61
<b>Tablo 26.</b> Olgu 17 bilgileri ve hastalık tanısı.....	62
<b>Tablo 27.</b> Olgu 18 bilgileri ve hastalık tanısı.....	62
<b>Tablo 28.</b> Olgu 19 bilgileri ve hastalık tanısı.....	63

<b>Tablo 29.</b> Olgu 20 bilgileri ve hastalık tanısı.....	63
<b>Tablo 30.</b> Olgu 21 bilgileri ve hastalık tanısı.....	64
<b>Tablo 31.</b> Olgu 22 bilgileri ve hastalık tanısı.....	64
<b>Tablo 32.</b> Olgu 23 bilgileri ve hastalık tanısı.....	65
<b>Tablo 33.</b> Olgu 24 bilgileri ve hastalık tanısı.....	65
<b>Tablo 34.</b> Olgu 25 bilgileri ve hastalık tanısı.....	66
<b>Tablo 35.</b> Olgu 26 bilgileri ve hastalık tanısı.....	66
<b>Tablo 36.</b> Olgu 27 bilgileri ve hastalık tanısı.....	67
<b>Tablo 37.</b> Olgu 28 bilgileri ve hastalık tanısı.....	67
<b>Tablo 38.</b> Olgu 29 bilgileri ve hastalık tanısı.....	68
<b>Tablo 39.</b> Olgu 30 bilgileri ve hastalık tanısı.....	68
<b>Tablo 40.</b> Olgu 31 bilgileri ve hastalık tanısı.....	69
<b>Tablo 41.</b> Olgu 32 bilgileri ve hastalık tanısı.....	69
<b>Tablo 42.</b> Olgu 33 bilgileri ve hastalık tanısı.....	70
<b>Tablo 43.</b> Olgu 34 bilgileri ve hastalık tanısı.....	70
<b>Tablo 44.</b> Olgu 35 bilgileri ve hastalık tanısı.....	71
<b>Tablo 45.</b> Olgu 36 bilgileri ve hastalık tanısı.....	71
<b>Tablo 46.</b> Olgu 37 bilgileri ve hastalık tanısı.....	72
<b>Tablo 47.</b> Olgu 38 bilgileri ve hastalık tanısı.....	72
<b>Tablo 48.</b> Olgu 39 bilgileri ve hastalık tanısı.....	73
<b>Tablo 49.</b> Olgu 40 bilgileri ve hastalık tanısı.....	73



## ÖZET

### KÖPEKLERDE GASTROENTERİTİSE NEDEN OLAN BAZI ENFEKSİYÖZ VE NON-ENFEKSİYÖZ HASTALIKLARDA SERUM VE FEKAL ZONULİN SEVİYELERİNİN TESPİTİ

**Şardağ D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Günümüzde güncel olarak önemi anlaşılan ve muhtemel bu proje ile kısmen ispatlanır nitelikte çok fazla hastalığın etiopatogenezinde rol oynayan sızıntılı bağırsak durumunun güvenilir ve ispatlanabilir sınırlı sayıda biyobelirteci bulunmakta, bu biyobelirteçler kanda ya da dışkıda tespit edilmediği sürece sızıntılı bağırsağın ve ilişkili hastalığın ilerlemesinin engellenmesi mümkün olmamaktadır. Zonulin, sızıntılı bağırsak tanısında güçlü bir belirteçtir. Bağırsak mikrobiyatasında gerçekleşen değişiklikler ya da epitel hücre hasarının varlığında salınımı önemli ölçüde artmaktadır. Sızıntılı bağırsağın erken tanısı için zonulin en sık üstünde çalışılan ve en çok umut vadeden biyobelirteçtir. Bu bağlamda bu çalışmada köpeklerde farklı etiyolojik nedenlerle oluşan infeksiyöz veya noninfeksiyöz ishallere bağlı gelişebilen sızıntılı bağırsağın saptanmasında ve şiddetinin derecelendirilmesinde eş zamanlı gerçek biyobelirteç olarak, gerek dışkı gerekse kanda zonulin düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma kapsamında hemorajik ya da non-hemorajik gastorenteritis saptanan köpekler değerlendirilmiştir. En az 1 gündür süregelen ishal anamnezi ile kliniğe getirilen farklı yaş, ırk ve her iki cinsiyetten en az 50 olgu, klinik laboratuvar analizleri doğrultusunda etiyolojik sınıflandırmaya tabi tutulacak (tablo 1) gruplandırma ile beraber her olgudan *vena cephalica antebrachii*' den anikoagülantsız tüplere 2' şer ml kan alınmış, ardından santrifüje edilerek ELISA ile serum zonulin testi uygulanmıştır. Test için örnekler -80 derecede saklanmış, sonuçlara yönelik olarak tüm analizler akredite laboratuvarlardan birinde yapılmıştır. Aynı şekilde olgulardan steril svaplar aracılığıyla fekal örnekler alınmış ve örnekler %70 'lik etanol içerisine konularak ELISA yöntemiyle fekal zonulin testi uygulanmaya kadar +4 derece sabit sıcaklıkta saklanmıştır. Zonulin bozulmuş bağırsak

geçirgenliğinin gösterilmesinde önemli bir biyobelirteç olduğundan, olgular üzerinde en az bir ay öncesine kadar antibiyotik kullanılmamış olmasına dikkat edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışma kapsamına 1-5 yaşlı her iki cinsiyetten (25 adet erkek-22 adet dişi) ve farklı ırklardan (1 adet alman kurdu, 1 adet cane corso, 2 adet doberman, 3 adet french bulldog, 1 adet golden retriever, 5 adet kangal, 2 adet labrador retriever, 2 adet maltipoo, 19 adet melez, 3 adet pitbull, 2 adet pug, 4 adet rottweiler, 2 adet terrier) 47 adet köpek dahil edildi. Fekal analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Ayrıca Corona virüs grubu ile Giardia ve Coronavirus ile Parvovirus grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Serum analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Ayrıca Corona grubu ile Giardia, Distemper ve Parvovirus grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Fekal ve serum karşılaştırmalarında ise aynı grup içinde giardia hariç tüm gruplar birbirinden farklıdır. İshalli köpeklere ait fekal ve serum örneklerinden elde edilen zonulin verilerinin ortalama ve standart hata değerleri tablollaştırıldı. Verilerin homojenite testleri Shapiro-Wilk analizine göre gerçekleştirildiğinde normal dağılım göstermediği ve logaritmik transformasyon işlemlerine rağmen normal dağılım göstermeyen verilerin bulunduğu tespit edildi. Bu bağlamda non-parametrik test tekniklerinden yararlanılarak gruplar arasındaki karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Fekal ve serum örneklerinin arasındaki farkların gruplar arası değerlendirmelerinde Kruskal-Wallis ANOVA, aynı grubun fekal ve serum zonulin seviyelerinin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testinden yararlanıldı. Fekal ve serum örneklerinin her bir grup içerisinde ayrı ayrı korelasyon analizlerinde de Spearman korelasyon yönteminden yararlanıldı. Tüm analizler SPSS 26.0 (IBM, Amerika) programında gerçekleştirilmiş olup analizlerde p değerinin 0,05' in altında olduğu durumlar istatistiksel anlamlı kabul edildi.

**Sonuç:** Serum analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar fekal ve serum zonulin seviyeleri arasında anlamlı farklar bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** zonulin, fekal zonulin, serum zonulin, giardia, parvovirus, coronavirus, non-enfeksiyöz ishal,

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF SERUM AND FECAL ZONULIN LEVELS IN GASTROENTERITIS OF DOGS CAUSED BY SOME INFECTIOUS AND NON- INFECTIOUS DISEASES

**Şardağ D. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Department Of Internal Disease (Veterinary), Doctorate Thesis, Aydın, 2022.**

**Objective:** Today, there are a limited number of reliable and demonstrable biomarkers of leaky gut, which plays a role in the etiopathogenesis of many diseases, the importance of which is currently understood and partially proven with this project. Unless these biomarkers are detected in the blood or stool, it is not possible to prevent the progression of leaky gut and the associated disease. Zonulin is a strong marker in the diagnosis of leaky gut. Its secretion increases significantly in the presence of changes in the intestinal microbiota or epithelial cell damage. Zonulin is the most studied and most promising biomarker for the early diagnosis of leaky gut. In this context, in this study, it was aimed to determine zonulin levels in both stool and blood as a real biomarker simultaneously in the detection and grading of the severity of leaky gut that may develop due to infectious or noninfectious diarrhea caused by different etiological reasons in dogs.

**Material and Methods:** In this study, dogs with hemorrhagic or non-hemorrhagic gastroenteritis were evaluated. At least 50 cases of different ages, races and both genders brought to the clinic with a history of diarrhea lasting for at least 1 day, 2 ml of blood were collected from vena cephalica antebrachii in tubes without anticoagulant from each case, together with the grouping to be subjected to etiological classification (table 1) in accordance with clinical laboratory analysis, then it was centrifuged and serum zonulin test was applied by ELISA. Samples for testing were stored at -80 degrees, and all analyzes for the results were performed in one of the accredited laboratories. In the same way, fecal samples were taken from the subjects by means of sterile swabs, and the samples were placed in 70% ethanol and stored at a constant temperature of +4 degrees until the fecal zonulin test by ELISA method was applied. Since zonulin is an important biomarker in

demonstrating impaired intestinal permeability, it was noted that antibiotics were not used on the cases until at least one month ago.

**Results:** The scope of the study included both genders aged 1-5 years (25 males-22 females) and different breeds (1 German Shepherd, 1 Cane Corso, 2 Dobermans, 3 French Bulldogs, 1 Golden Retriever, 5 Kangal, 2 labrador retrievers, 2 maltipoos, 19 crossbreeds, 3 pitbulls, 2 pugs, 4 rottweilers, 2 terriers) 47 dogs were included. Significant differences were found between the healthy group and all groups in patients who underwent fecal analysis. In addition, significant differences were observed between the Coronavirus group and Giardia, and between the Coronavirus and Parvovirus groups. Significant differences were found between the healthy group and all groups in patients who underwent serum analysis. In addition, significant differences were observed between the Corona group and the Giardia, Distemper and Parvovirus groups. In fecal and serum comparisons, all groups are different from each other except giardia within the same group. Mean and standard error values of zonulin data obtained from fecal and serum samples of dogs with diarrhea were tabulated. When the homogeneity tests of the data were performed according to the Shapiro-Wilk analysis, it was found that they did not show normal distribution and there were data that did not show normal distribution despite the logarithmic transformation processes. In this context, comparisons between groups were made using non-parametric test techniques. Kruskal-Wallis ANOVA was used to evaluate the differences between fecal and serum samples between groups, and Wilcoxon test was used to compare fecal and serum zonulin levels of the same group. Spearman correlation method was also used in the correlation analyzes of fecal and serum samples separately within each group. All analyzes were performed in the SPSS 26.0 (IBM, USA) program, and cases where the p value was below 0.05 were considered statistically significant.

**Conclusion:** Significant differences were found between the fecal and serum zonulin levels of the healthy group and all groups in patients who underwent serum and fecal analysis.

**Keywords:** zonulin, fecal zonulin, serum zonulin, giardia, parvovirus, coronavirus, non-enfeksiyöz ishal

# 1. GİRİŞ

Günümüzde güncel olarak önemi anlaşılan ve mevzu bahis bu tez ile kısmen ispatlanır nitelikte, çok fazla hastalığın etiyopatogenezisinde rol oynayan sızıntılı bağırsak durumunun güvenilir ve ispatlanabilir sınırlı sayıda biyobelirteci bulunmakta, bu biyobelirteçler kanda ya da dışkıda tespit edilmediği sürece sızıntılı bağırsağın ve ilişkili hastalığın ilerlemesinin engellenmesi mümkün olmamaktadır. Zonulin, sızıntılı bağırsak tanısında güçlü bir belirteçtir. Bağırsak mikrobiyatasında gerçekleşen değişiklikler ya da epitel hücre hasarının varlığında salınımı önemli ölçüde artmaktadır. Sızıntılı bağırsağın erken tanısı için zonulin en sık üstünde çalışılan ve en çok umut vadeden biyobelirteçtir. Bu bağlamda bu çalışmada köpeklerde farklı etiyolojik nedenlerle oluşan infeksiyöz veya noninfeksiyöz ishallere bağlı gelişebilen sızıntılı bağırsağın saptanmasında ve şiddetinin derecelendirilmesinde eş zamanlı gerçek biyobelirteç olarak, gerek dışkı gerekse kanda zonulin düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Zonulin, bağırsak bariyer bütünlüğünü gösteren bir biyobelirteçtir. Bu proje ile araştırma sorusu, farklı gastroenteritis modellerinde (doğal hastalık aktivitesine bağlı) değişip değişmeyeceği belirsiz zonulin seviyelerinin ne olduğu olabilir.

Bağırsak bariyerinde herhangi bir bozukluk oluştuğunda ve bağırsak geçirgenliği arttığında kanda zonulin seviyesi artmaktadır. Farklı çalışmalar insan ve rat modelinde bu değişimleri göstermiş ve köpeklerde bizim yaptığımız literatür taramalarında bilgiye ulaşılamamış olması, araştırma sorusunun zenginliğini arttırmaktadır.

Bu çalışmada ilgili araştırma sorusuna yönelik hipotez:

1) Parvoviral gastroenteritis, corona virüs, distemper hastalığı veya giardiasise bağlı olarak bilinen ishal ya da diğer klinik bulguların yanı sıra bilinmeyen ve aydınlatılması gereken sızıntılı bağırsak modeli araştırılmış,

2) Elde edilen bulguların anılan hastalıklarda zonulin seviyeleri değişir hipotezimizi desteklemesi durumunda tanı ve muhtemel sağaltım protokollerinde değişim sağlayıp sağlamayacağı da açıklığa kavuşturulmuştur.

Bağırsak hasarının erken saptanması, kuvvetle muhtemel sendromun tanımlamasından daha önemlidir. Bu konuda sızıntılı bağırsak için umut vadeden yeni biyobelirteçlerden olan zonulinin non-invaziv olması ve kolayca elde edilen kan veya dışkı örneklerinde bulunabilmesi, hasta başında veya standart klinik laboratuvarlarda analizlerinin

gerçekleştirilebilmesi, yüksek duyarlılıkla erken teşhisi kolaylaştırabilir olması beklenmektedir. Klinik kullanımda tanıyı erkenden koyabilecek, komplikasyonları ve olumsuz prognozu ön görebilecek, sağaltımı yönlendirebilecek şekilde olguları risk kategorilerine ayıran belirteçlere her zaman ihtiyaç vardır. Bu konuda zonulinin tanısal bir biyobelirteç olarak kısa zamanda rutin kullanımda yerini alması, veteriner klinik yararlanım konusunda ve yeni sağaltım protokollerinin geliştirilmesinde büyük yarar sağlayacağından, ilgili analizlerin gerçekleştirilmesi çalışmamızın ana hedefidir. Elde edilecek sonuçlar önemli hastalıklar olan enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz bağırsak hastalıklarında bakış açısını değiştirebilecektir. Sızıntılı bağırsak rahatsızlığının belirlenmesinde zonulinin önemi bu hastalıkta ilk kez ortaya konurken, erken teşhis ile ilave hasar oluşumunun önüne geçilebilmesinin sağlanması hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hayvan Sağlığında Gastrointestinal Fonksiyonun Biyobelirteçleri

Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, “bağırsak sağlığı” kavramı beslenme uzmanları, veteriner hekimler ve bilim insanları arasında büyük ilgi görmektedir (Kogut ve Arsenault, 2016). Etkili gastrointestinal fonksiyonellik, hayvan sağlığını, refahı ve performansı belirlemede çok önemlidir. Yakın bir zamanda gastrointestinal fonksiyonelliğin yeni bir tanımı sunulmuştur ve etkili gastrointestinal fonksiyonellik ve sağlığa katkıda bulunan temel bileşenleri tanımlamıştır. Bu bileşenler şunlardır: diyet, gastrointestinal bariyerin etkin yapısı ve işlevi, gastrointestinal mikrobiyota ile konak etkileşimi, yemin etkin sindirim ve emilimi, etkili bağışıklık durumu ve bağırsakların nöroendokrin fonksiyonu. Bu bileşenlerin her biri çeşitli karmaşık mekanizmalar ve yollar ile birbirine bağlanır, ancak gastrointestinal fonksiyonun bazı temel bileşenlerinin tanımlanması, gastrointestinal sistemin hayvanlardaki işlevselliğini ölçmemizi sağlayacak potansiyel biyolojik belirteçleri değerlendirme fırsatı sunar. Çok sayıda ve hızla gelişen metodolojiler, her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajları olan, gittikçe artan sayıda biyobelirteç ve tip üretmektedir (Celi ve diğerleri, 2019).

Gastrointestinal işlevselliğin net bir tanımı, hayvan sağlığını, refahını izlemek ve herhangi bir beslenme müdahalesinin hayvan performansı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için gereklidir. Bağırsak sağlığının tanımlanması zor olsa da, yakın zamanda gastrointestinal fonksiyonlarla ilgili altı ana alan önerilmiştir. Bu alanlar diyet, etkili sindirim ve emilim, normal ve stabil mikrobiyota, etkili bağışıklık durumu, bağırsak mukozası ve nöroendokrin ve bağırsağın motor fonksiyonunu içerir (Celi ve diğerleri, 2017). Önerilen gastrointestinal işlevsellik tanımı (mikrobiyomun ve bağırsak sisteminin simbiyotik dengede olduğu ve hayvanın refah ve performansının bağırsak fonksiyon bozukluğu ile kısıtlanmadığı sabit bir durum), gastrointestinal fonksiyonun temel bileşenlerini bütünleştirir; yani diyet, bağırsak geçirgenliği ve bağırsak mikrobiyotası, sindirimi ve yemin emilimi ve etkili bağışıklık durumu. Tüm bu alanlar gastrointestinal fizyoloji, hayvan sağlığı, refah ve performansta kritik bir rol oynamaktadır (Celi ve diğerleri, 2017).

Gastrointestinal fonksiyonun biyobelirteçlerinin gelişimi, bağırsak bariyerini, bunun fonksiyonelliğini ve gastrointestinal mikrobiyota ekolojisini etkileyen olayları anlamamızı geliştirmek için çok önemlidir (Celi ve diğerleri, 2017).

### **2.1.1. Diyet**

Diyet bileşimi (bileşenler, besinler ve katkı maddeleri), bağışıklık sistemi ve içinde bulunan mikrobiyota da dahil olmak üzere gastrointestinal sistemin gelişimini ve işlevselliğini modüle edebilir (Conway, 1994). Gerçekten diyet faktörleri, hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar mekanizmaları modüle ederek inflamatuvar süreci etkileyebilir (Broom ve Kogut, 2018). Bu faktörler, bağırsağın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü bozabilecek çeşitli antinutrientleri (belirli diyet lifi, tripsin inhibitörü, fitat, lektinler, sindirilmemiş protein, mikotoksinler ve diğerleri) içerir (Celi ve diğerleri, 2017).

Diyetin inflamatuvar yanıtı etkileme kabiliyeti laboratuardaki bir ekipmanla ölçülemediğinden, insan beslenmesindeki araştırmacılar diyet ve inflamasyon üzerine yayınlanan bulgulara dayanarak oluşturulan bir 'Diyet İnflamatuvar İndeksi' geliştirmişlerdir (Cavicchia ve diğerleri, 2009; Shivappa ve diğerleri, 2014). Diyet İnflamatuvar Endeksi, bireylerin diyetlerini, maksimum pro-inflamatuardan maksimum anti-inflamatuara kadar bir süreklilikteki inflamatuvar potansiyellerine göre sınıflandırır. Daha yüksek bir Diyet İnflamatuvar İndeksi skoru daha pro-inflamatuvar bir diyetle işaret ederken, daha düşük bir Diyet İnflamatuvar İndeksi skoru daha anti-inflamatuvar bir diyetle işaret etmektedir (Cavicchia ve diğerleri, 2009; Shivappa ve diğerleri, 2014). Hayvan beslenmesinde henüz benzer bir yaklaşım geliştirilmemiştir (Celi ve diğerleri, 2019).

### **2.1.2. Etkili Sindirim ve Absorpsiyon Kapasitesi**

Etkili gastrointestinal fonksiyonelliğe genellikle optimal sindirim ve emilim eşlik eder. Bununla birlikte, gastrointestinal sistemde inflamasyon meydana geldiğinde, sindirim verimliliğinde bir azalmaya ve hem makro hem de mikrobeseinler üzerinde emilimin azalmasına neden olabilir (Celi ve diğerleri, 2017). Demir, çinko ve yağ malabsorpsiyon ile en fazla etkilenen mikrobeseinler ve makrobeseinlerdir (Davin ve diğerleri, 2012, 2013; Koutsos ve diğerleri, 2003, 2006). Bu nedenle, sindirim ve emilim bozulduğunda, iki olası sonucu gözlemek mümkündür: maldigestion ve malabsorpsiyon. Maldigestion, besin maddelerinin eksik parçalanmasıdır ve genellikle bozulmuş veya yetersiz enzim veya gastrik asit sekresyonunun sonucudur. Bunun yerine malabsorpsiyon, sindirim sürecinden



kaynaklanan son ürünlerin emilimindeki bozulmadır. Etkisiz sindirim ve emilim, yetersiz besin emilimine ve mikrobiyotanın onları uygun olmayan bir şekilde fermente edebileceği gastrointestinal sistemin distal segmentlerine aşırı besinlerin (özellikle protein ve yağ) verilmesine neden olur. Sindirim ve emilimin farklı biyobelirteçleri toplam karotenoidler, protein fermantasyon ürünleri, fekal yağ ve yağda çözünen vitaminleri içerir (Celi ve diğerleri, 2019).

### **2.1.3. Gastrointestinal Mikrobiyota**

Gastrointestinal mikrobiyom “beşinci organ” olarak adlandırılmıştır ve gerçekten de literatür, mikrobiyomun çevreden gelen sinyalleri ve ipuçlarını işlemede ve bunları organizmaya dağıtmada önemli bir role sahip olduğunu ileri sürmektedir (Dietert ve Silbergeld, 2015). Gastrointestinal mikrobiyomun ana işlevlerinden birinin, konakçı bağışıklık sistemi ile mikrobiyomun kendisi arasında karşılıklı mutualistik bir ilişkiyi sürdürmeyi bağışıklık sistemine “öğretmek” olduğu ileri sürülmüştür (Dietert ve Silbergeld, 2015). Bu karmaşık ilişkinin sonuçları, gastrointestinal mikrobiyomun beyin ve bağışıklık sistemi gibi organ ve sistemlerin işlevselliğini modüle etmek için kullandığı ana yollardır.

Gastrointestinal mikrobiyom, sindirim ve emilim, enerji metabolizması, bağışıklık sistemi gelişimi, enfeksiyonların önlenmesi gibi çeşitli fizyolojik işlevleri ayarlar (Lee ve Hase, 2014; Marchesi ve diğerleri, 2015; Willing ve Van Kessel, 2010). Gastrointestinal mikrobiyotayı karakterize etmek için farklı biyobelirteçler kullanılır. Bunlar laktat, süksinat, fenol, p-kresol, indol, amonyak ve hidrojen sülfiddir (Celi ve diğerleri, 2019).

### **2.1.4. Etkili Bağışıklık Durumu**

Bağışıklık sistemi hücrelerinin %70' inden fazlasının gastrointestinal sistemde bulunduğu göz önüne alındığında, bağışıklık sisteminin en büyük organı olarak kabul edilmesi şaşırtıcı değildir (Vighi ve diğerleri, 2008). Bağışıklık sistemi ve gastrointestinal sistem arasındaki ilişkinin karakterizasyonu sadece gastrointestinal işlevsellikte değil, aynı zamanda sağlık, refah ve hastalıklarda da giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Celi ve diğerleri, 2017; Yegani ve Korver, 2008). Gastrointestinal sistemin önemli bir fizyolojik rolü, gastrointestinal konak ile çevre arasındaki en büyük arayüz olduğu için antijenlere ve patojenlere karşı bir bariyer görevi görmesidir. Gastrointestinal bariyerin önemi, bağırsak içeriğini konaktan ayırdığı dinamik ve fonksiyonel bir varlık olması ve aynı zamanda konakçı ile gastrointestinal içerik arasındaki yoğun örnekleme ve iletişim alanı olmasıyla

vurgulanmaktadır. Bu nedenle, gastrointestinal bariyerin değerlendirilmesi için çok çeşitli testler ve biyobelirteçler düşünülebilir. Gastrointestinal inflamasyon ve bağışıklık fonksiyonunun biyobelirteçleri, gastrointestinal sistemin çevre ile etkileşimleri ve gastrointestinal bariyer işlevselliğinin ne kadar iyi korunduğu hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Gastrointestinal bariyer, vasküler endotel, epitel hücre astarı ve mukus tabakasından oluşan yapısal bir bariyer ve esas olarak sindirim sekresyonları, bağışıklık molekülleri, hücre ürünleri, inflamatuvar mediatörler ve antimikrobiyal peptitler gibi hücrel ürünlerden oluşan fonksiyonel bir bariyerden oluşur. İnce bağırsağın kriptlerindeki Paneth hücreleri ve trefoil faktör ailesi proteinleri tarafından onarım sürecini aktif olarak tetikleyerek mukozal epitel üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir (Bischoff ve diğerleri, 2014; Kim ve diğerleri, 2009). Bağırsak inflamasyonunun bağırsak mukozasının yapısını ve işlevini bozarak gastrointestinal fonksiyonu olumsuz etkileyebileceği göz önüne alındığında, bağırsak inflamatuvar aktivitesinin varlığının belirlenmesi gastrointestinal bariyerin değerlendirilmesi için çok önemlidir. Gastrointestinal sistemdeki bağışıklık durumunu karakterize etmek için kullanılan farklı biyobelirteçler: Pankreatitle ilişkili proteinler veya rejenere adacık türevi III proteinleri, myeloperoksidaz, neopterin, alfa-1 antitripsin, eozinofilik katyonik protein ve eozinofil protein X, kalprotektin, S100 proteinleri, lipokalin 2, laktoferrin, lipopolisakkarit, akut faz proteinleri, aitokinler ve sekretuar IgA'yı içerir (Celi ve diğerleri, 2019).

### **2.1.5. Bağırsak Mukozası**

Etkili bağırsak bariyeri fonksiyonu, optimal gastrointestinal işlevsellik, hayvan sağlığı ve refahını sağlamak için gereklidir (Celi ve diğerleri, 2017). Bağırsak bariyerinin birinci tabakası, mikrobiyota ile ilişkili bir dış tabaka ve yüksek konsantrasyonlarda sIgA ve müsin içeren bir iç tabaka tarafından oluşturulan bir mukus tabakasından oluşur (Bischoff, 2011). Gastrointestinal sistemin doğal bağışıklık sistemi, her biri komensal bakterilere tolerans ile patojenlere yanıt arasındaki ince dengeye katkıda bulunan birden fazla elementten oluşur (Celi ve diğerleri, 2017). Gastrointestinal mukoza, sürekli olarak gastrointestinal mikrobiyotaya maruz kalsa da, temel besinlerin seçici geçişine izin verirken, sayısız toksinler, bakteriler ve onların hücre artıkları ve antinutrisyonel faktöre karşı bağırsak bariyerinin bütünlüğünü sürdürebilmektedir (Bischoff, 2011). Bağırsak geçirgenliğini ve bütünlüğünü değerlendirmek için çeşitli teknikler mevcuttur (Bischoff ve diğerleri, 2014). İn vitro veya in vivo kurulabilirler, farklı hayvan modellerinde onaylanmışlardır, çeşitli

biyolojik matrislerde (periferik kan, portal ven kanı, idrar) çok çeşitli molekülleri (iyonlar, farklı boyutlardaki karbonhidratlar, makromoleküller ve antijenler, bakteri ürünleri ve bakteriler) ölçebilirler. Bağırsak bariyeri fonksiyonunu karakterize etmek için kullanılan farklı biyobelirteçler rapor edilmiştir. Bunlar, laktuloz (L), L-ramnoz (R), mannitol (M), floresan izotiyosiyanat dekstran (FITC d), müsin 2, siyalik asit, trans-epitelyal elektrik direnci, diamin oksidaz, tight junction proteinleri, sitrülün, bağırsak alkalın fosfataz ve bağırsak yağ asidi bağlayıcı proteinlerden oluşur. Bunlardan tight junction proteinleri için test bölgesi bağırsaktır. Biyolojik numune doku biyopsisi, plazma, idrar ve dışkı olarak alınır. Yöntem PCR, western blot ve immüno-assay kullanımındır. Bu, invaziv bir tekniktir ve aynı hayvan üzerinde tekrar tekrar gerçekleştirilemez. Claudin-3 ve zonulin, idrarda ELISA ile ölçülebilir, ancak veriler sınırlıdır (Celi ve diğerleri, 2019).

### **2.1.6. Bağırsağın Nöroendokrin Fonksiyonu**

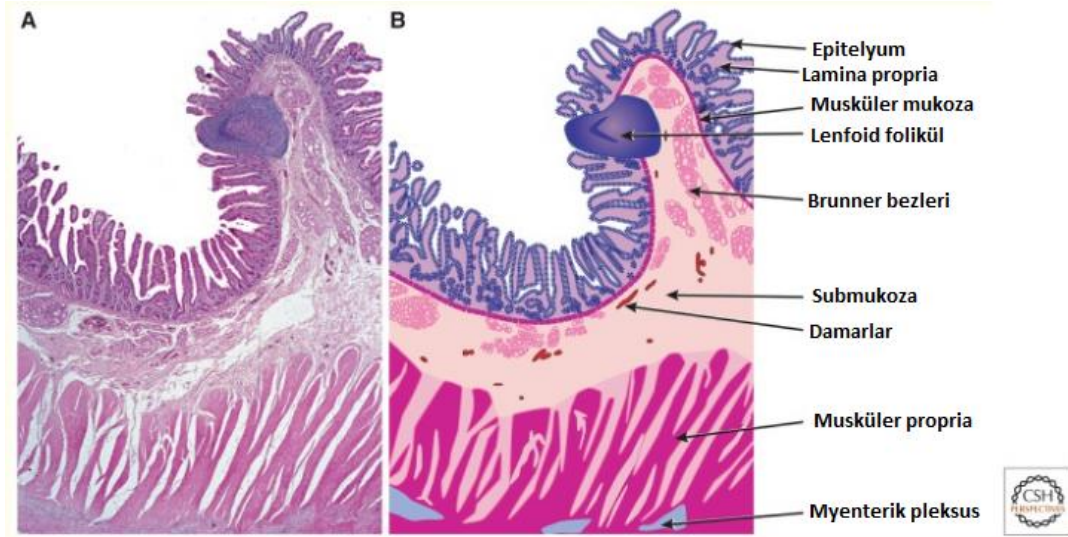
Tartışmalı olarak, gastrointestinal sistemin en önemli işlevi bilgi toplamadır, aslında bağırsak duyuşsal bir organ olarak düşünölmelidir (Furness ve diğerleri, 2013). Sindirim sırasında bağırsak içeriğı algılanır ve gastrointestinal sistemin sindirim ve emilim kapasitesini, yutulan gıda miktarı ve bileşimi ile hizalamak amacıyla nöroendokrin sinyalleri beyne iletilir (Furness ve Cottrell, 2017). Gastrointestinal sistemin nöroendokrin işlevi, hayvan refahı ve performansında yer alan “bağırsak-beyin eksenini” olarak adlandırılan önemli bir iletişim koludur (Celi ve diğerleri, 2017). Gastrointestinal peptit hormonları, besinler, nöral veya hormonal stimölasyon, gastrointestinal mikrobiyotanın metabolik ürünleri gibi çeşitli ipuçlarına yanıt olarak, bağırsak mukozası boyunca geniş ölçüde yayılan çok sayıda enteroendokrin hücre tarafından salgılanır (Steinert ve diğerleri, 2013). Gastrointestinal hormonlar, sadece sindirim ve emilim değil, aynı zamanda bağırsak bariyeri fonksiyonu, mukozal sağlık, yem alımı ve metabolizma dahil olmak üzere etkili gastrointestinal işlevselliğe katkıda bulunur. Mevcut literatürün çoğı kemirgenlerden ve insanlardan kaynaklanmasına rağmen, çiftlik hayvanlarında şimdiye kadar tarif edilen mekanizmaların çeşitli türler için uygun olduğunu gösteren birkaç çalışma vardır. Gastrointestinal hormonların karakterizasyonu, değerli biyobelirteçler olarak da kullanılabileceğı, bu yaklaşımla toplanan bilginin hayvan sağlığı, refahı ve sonuç olarak üretkenliğı artırmak için değerli bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir (Celi ve diğerleri, 2017).

## 2.2. Bağırsak Bariyeri

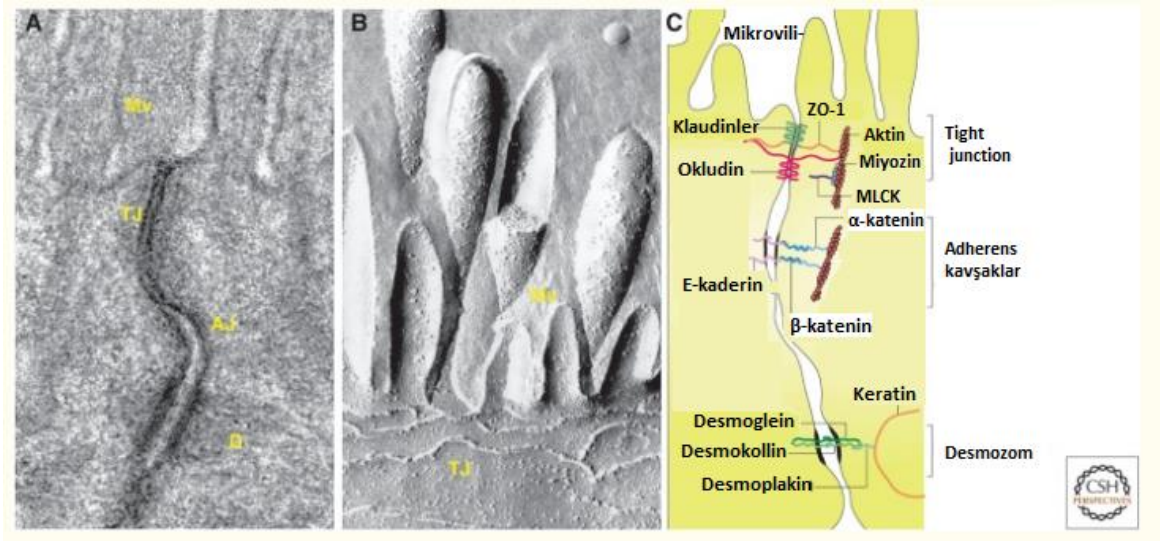
### 2.2.1. Bağırsak Fizyolojisi ve Sıkı Bağlantılar

Bağırsak, evre ve ev sahibi arasındaki en büyük ara yüzeyi temsil eden tek bir epitelyal hücreler tabakası ile sıralanmıştır. Bağırsak mukozasının yapısal düzenlemesi, bağırsak lümeninin içeriğinin koordineli gözetimi için epitelyal hücreler ve altındaki bağışıklık sistemi arasında sıkı bir çapraz konuşma olduğunu gösterir. Bağırsak mukozası, besinlerin ve iyonların emilmesi ile sıvıların salgılanması arasındaki dengeyi korumakla ve lümende bulunan mikroorganizmalardan, toksinlerden ve diyet antijenlerinden korunma göreviyle yükümlüdür. Epitel hücreleri sıkı bağlantılar, birleşme yerleri ve desmozomlar ile bir arada tutulur (Farquhar ve Palade, 1963). Tarihsel olarak, sıkı bağlantıların makromoleküllerin paraselüler geçişini bloke eden geçirgen olmayan bir bariyer olduğu düşünülmüştür. Artık sıkı bağlantıların, bağırsak epitelyal antijen değiş tokuşunun hem fizyolojik hem de patolojik düzenlemesinde yer alan dinamik yapılar olduğunu biliyoruz (Turner JR, 2009).

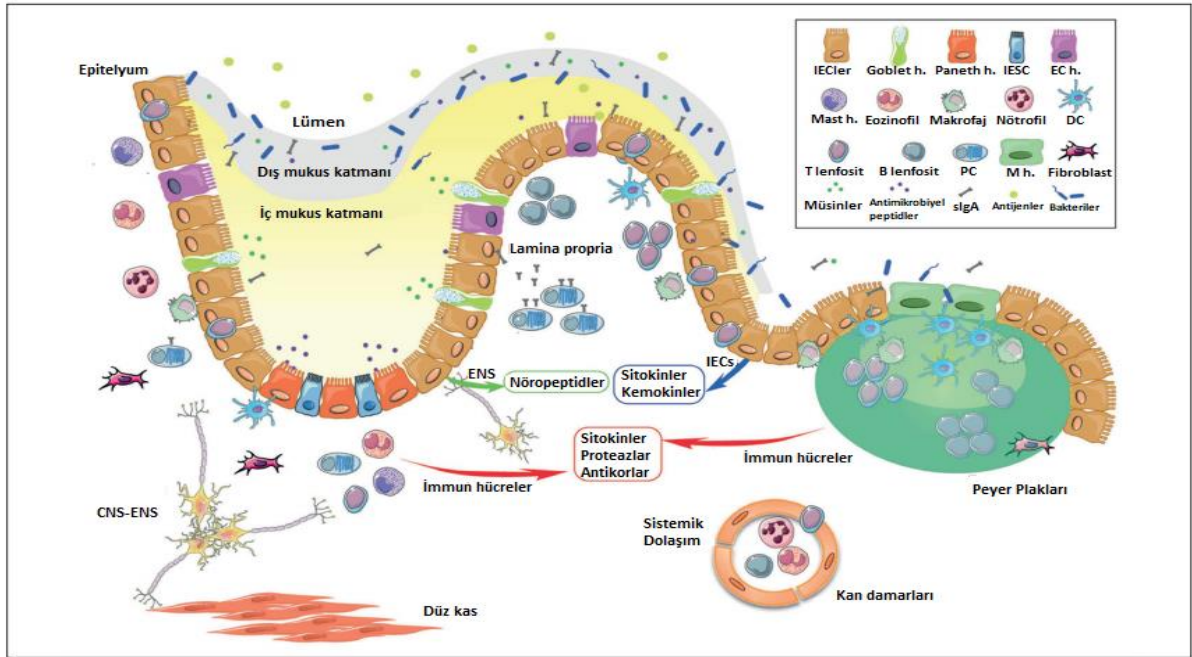
Tight Junctionlar, 1963 yılında Farquhar ve Paladeand tarafından tanımlanan, hem komşu epitelyal hem de endotelyal hücreleri bağlayan en apikal birleşme kompleksidir ve bunlar, okludin (Furuse ve diğerleri, 1993), klaudinler (Furuse ve diğerleri, 1998), birleşme adezyon molekülleri (JAM) (Martin-Padura ve diğerleri, 1998), trisellulin (Ikenouchi ve diğerleri, 2005) ve angulinleri (Higashi ve diğerleri, 2013) içeren transmembran proteinlerinden oluşur. Bu transmembran proteinleri kendi aralarında (hem homofilik hem de heterofilik etkileşimler) ve aktin hücre iskeletine bağlanan zonula okludensler (ZOs) dahil olmak üzere hücre içi iskelet proteinleri ile etkileşirler. Hücreler ve ZO'lar arasında okludinler, klaudinler, JAM' lar ve trisellulinlerin etkileşimi, sıkı bağlantının bütünlüğünü muhafaza eder ve moleküllerin paraselüler boşluktan geçişini kontrol eder (Sturgeon ve Fasano, 2016).



**Şekil 1.** İnce bağırsak mukozal mimarisi. (A) Normal insan duodenumunun hematoksilin ve eozin-boyalı bölümünün düşük büyütülmüş görüntüsü. Gastrointestinal sistem ve diğer mukozal yüzeylerde yaygın olan yapısal özelliklerin çoğu anlaşılabilir. (B) Bağırsak duvarını oluşturan spesifik yapıları gösteren çizgi diyagramı. Musküler propria lifleri arasındaki açık alanlar, doku işleme sırasında meydana gelen artefaktüel ayrımı temsil eder (Buckley ve Turner, 2018)



**Şekil 2.** Apikal kavşak kompleksi. (A) İki villöz enterosit arasındaki bağlantı komplekslerini gösteren transmisyon elektron mikroskopisi. Sıkı bağlantı noktası (TJ) mikrovillusun (Mv) hemen altındadır, bunu aderens kavşağı (AJ) izler. Desmozomlar (D) bazolateral olarak yerleşmiştir. (B) Kültüre edilmiş bağırsak epitel hücrelerinde apikal mikrovillus (Mv) ve sıkı bağlantı ipliklerini (TJ) gösteren Freeze-fracture elektron mikroskopisi. (C) Bir bağırsak epitel hücrelerinin apikal bağlantı kompleksinin çizgi çizimi. Sıkı bağlantı proteinleri arasında klaudinler, zonula okludens-1 (ZO-1) ve okludin bulunurken, E-kaderin,  $\alpha$ -katenin ve  $\beta$ -katenin, adherens kavşağını oluşturmak için etkileşime girer. Miyozin hafif zincir kinaz (MLCK), kavşak çevresinde aktomiyozin halkası ile ilişkilidir. Desmozomlar desmoglein, desmokolin, desmoplakin ve keratin filamentleri arasındaki etkileşimlerle oluşur (Turner, 2009'dan A ve C Bölümleri; Shen ve diğerleri, 2011'den B bölümü)



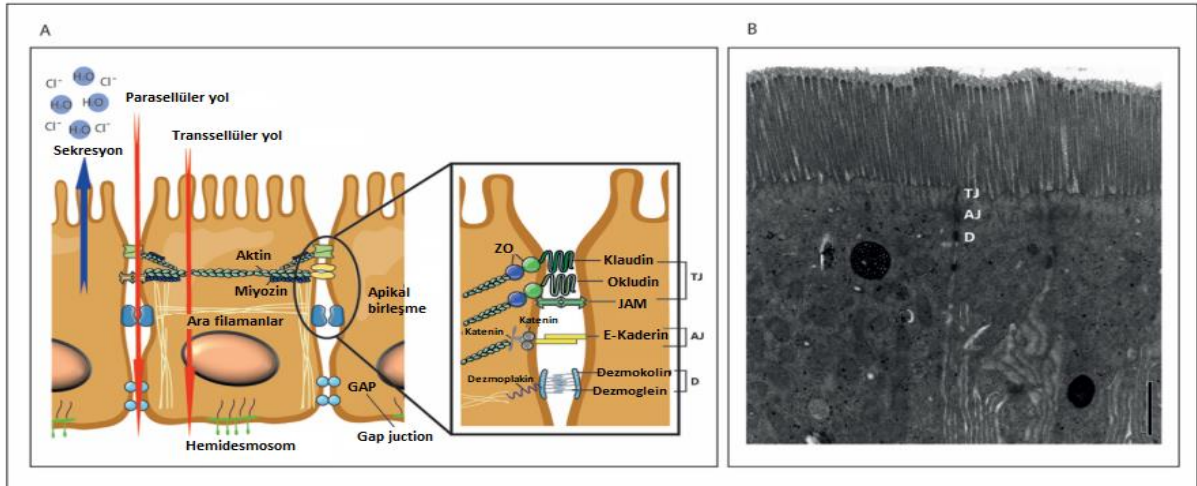
**Şekil 3.** Bağırsak bariyeri anatomisi ve bileşenleri. Bağırsak mukozası, bir polarize, sütunlu epitel hücre tabakası ve lamina propriayı içeren epitel altı bölge, enterik sinir sistemi, bağ dokusu ve kas tabakalarından oluşur. Epitelyum, enterositler, Goblet hücreleri (müsin sentezleyen ve salan), Paneth hücreleri (antimikrobiyal peptitleri sentezleyen), enterokromafin hücreleri (hormonlar ve diğer maddeleri üreten) ve bağırsak kök hücrelerini içerir. Epitelyal bariyerin üstünde, glikokaliks içeren akmayan mukus tabakası vardır; bu tabaka sırayla mikrobiyota, salgılayıcı IgA, müsin ve antimikrobiyal peptitleri içeren karıştırılmış mukus tabakasının temelini oluşturur. İntraepitelyal lenfositler, TJ denilen sıkı bağlantıların altında, bazal membranın üzerindedir. Lamina propria, makrofajlar, dendritik hücreler, plazma hücreleri, lamina propria lenfositleri ve zaman zaman nötrofillerden oluşan dağınık bir lenfoid doku ve M hücrelerini içeren Peyer plakları, dendritik hücreler ve lenfositleri içeren yapılandırılmış bir lenfoid doku içerir ( CNS: Merkezi sinir sistemi, ENS: Enterik sinir sistemi, IS: Bağışıklık sistemi, IEC: Bağırsak epitel hücresi, ISC: Bağırsak kök hücresi, ECC: Enterokromafin hücresi, sIgA: Salgılayıcı IgA) (Salvo-Romero ve diğerleri, 2015)

### 2.2.2. Bağırsak Bariyeri ve Düzenlenmesi

Parasellüler yol, intestinal epitelial bariyer boyunca, pasif çözünen akış için baskın yoldur ve işlevsel durumu, hücreler arası TJ'nin düzenlenmesine bağlıdır (Yu ve Yang, 2009). TJ, absorptif ve sekretör epitelin ayırt edici özelliklerinden biridir. Apikal ve bazolateral kompartmanlar arasındaki bir bariyer olarak, parasellüler yol aracılığıyla iyonların ve suda çözünen küçük maddelerin pasif difüzyonunu seçici olarak düzenler, böylece transsellüler yollar tarafından üretilen herhangi bir gradyanı telafi eder (Laukoetter ve diğerleri, 2006). Enterosit plazma membranının yüksek direncine bağlı olarak, transepitelyal iletkenlikteki değişiklikler parasellüler yoldaki değişikliklere atfedilmiştir (Madara, 1989). TJ, freeze-fracture elektron mikroskobu ile gözlemlendiği üzere, TJ içindeki transmembran protein ipliklerinin sayısına ve karmaşıklığına bağlı olarak epitelial dokuların elektriksel direnci ile birlikte bu parasellüler yoldaki ana bariyeri temsil eder

(Madara ve Dharmasathaphorn, 1985). Şimdiki kanıtlar, bir zamanlar statik yapılar olarak kabul edilen TJ'nin aslında dinamik olduğunu ve çeşitli gelişimsel (Fleming ve diğerleri, 2000; Magnuson ve diğerleri, 1978; Revel ve Brown, 1976) , fizyolojik (Furuse ve Tsukita, 2006; Madara ve Pappenheimer, 1987; Mazariegos ve diğerleri, 1984; Sardet ve diğerleri, 1979) ve patolojik (Clayburgh ve diğerleri, 2004; Fasano ve Nataro, 2004; Fasano ve Shea-Donohue, 2005; Madara ve Trier, 1980) durumlara kolayca adapte olduğunu göstermektedir.

Bağırsak epitel bariyerinin maruz kaldığı çeşitli fizyolojik zorlukların üstesinden gelmek için, TJ hızlı ve koordineli tepkiler verebilmelidir. Bu, TJ multiprotein ağının kurulmasını düzenleyen karmaşık bir düzenleyici sistemin varlığını gerektirir. Son 10 yılda TJ hakkında en üst düzey yapı ve hücre içi sinyal olayları ile ilgili bilgiler önemli ölçüde ilerlemesine rağmen, sadece son zamanlarda TJ'ler ve birçok patofizyolojik durum arasındaki bağlantıyı aydınlatmaya yönelik çabalar görülmüştür. (Fasano, 2001; Fasano, 2008; Turner, 2006; Turner, 2009)



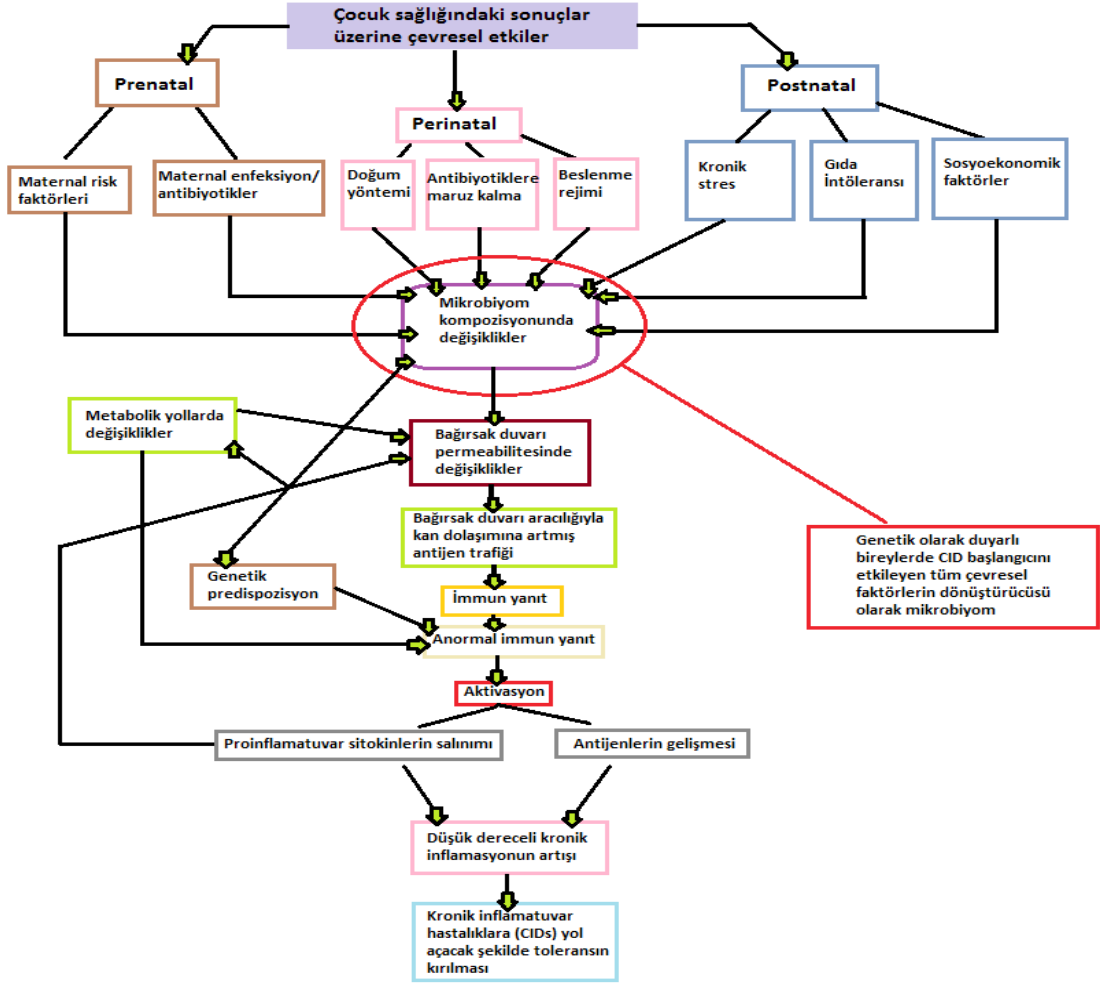
**Şekil 4.** Hücreler arası bağlantı noktalarının bir temsili. (A) Enterositler bağırsak epitelinde en bol bulunan hücrelerdir. Öncelikle besin emilimine ve bağırsak lümenine su ve klor salgılanmasına odaklanırlar. Bağırsak lümenindeki maddeler, transsellüler yol veya parasellüler yol yoluyla epitelyum boyunca hareket edebilir. Tight junction'lar (Sıkı bağlantı noktaları), adherens kavşakları, gap kavşakları ve desmozomlar dahil olmak üzere hücreler arası bağlantı kompleksleri, 50 Å 'nın üzerindeki makromoleküllerin geçişini kısıtlayan dinamik yapılardır. Epitel hücrelerinin bütünlüğü ve yapısı çoğunlukla aktin, miyozin ve ara filamanlar tarafından olmak üzere hücre iskeleti tarafından modüle edilir. Hücreler hemidesmozomlar yoluyla bazal membrana yapışır. Apikal bağlantı kompleksi açıklanmıştır: Tight junction'lar öncelikle, hücre iskeletine bağlı zonula okludensler ile ilişkili olan klaudinler, okludinler ve JAM proteinlerinden oluşur. Adherens kavşakları, hücre iskeletine bağlı kateninlere ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) bağlanan E-Kaderin gibi kaderinleri içerir. Desmozomlar esas olarak desmoplakin ile etkileşime giren desmokolin ve desmogleinden oluşur ve daha sonra ara filamanlara bağlanır. (B) İnsan enterositleri arasındaki apikal bağlantı kompleksini gösteren transmisyon elektron mikroskopisi görüntüsü (TJ: Tight junction'lar, AJ: Ara (adherens) bağlantı noktası, D: Desmozom) (Salvo-Romero ve diğerleri, 2015)

### 2.2.3. Artan Bağırsak Geçirgenliği ve Hastalıklarla İlişkisi

Artan bağırsak geçirgenliği, son zamanlarda, alerjik, otoimmün ve metabolik hastalıklar dahil olmak üzere, kronik inflamatuvar hastalıkların (CID) patogenezinde genetik yaradılış ve çevresel tetikleyiciler ile birlikte, bir bütünleyici eleman olarak önerilmiştir (Arrieta ve diğerleri, 2006; Fasano ve Shea-Donohue, 2005; Sapone ve diğerleri, 2006). Sanayileşmiş ülkelerde bu koşulların görülme oranı 1950'lerden beri düzenli olarak artmıştır ve bu da hijyen hipotezinin formülasyonuna yol açmıştır (Bach, 2002; Strachan, 1989). Bu salgınların oranı ve zaman çizelgesi, genetik faktörlerin hangi bireylerin bu hastalıkları geliştireceğini belirlemek için gerekli olduğu ancak yeterli olmadığı anlamına gelmektedir. Bu da genetik olarak yatkın bireylerde CID'ye yol açan itici güçler olarak çevresel faktörlerin kilit rolüne işaret etmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde artan hijyen CID'nin benzer salgınları ile paralel değildi ve hijyen hipotezinin geçerliliğini sorgularken doğumdan beri birlikte yaşadığımız mikrobiyal ekosistemin olası epigenetik rolüne odaklanan daha karmaşık bir ev sahibi-çevre etkileşimi dinamiğine işaret ediyordu (Sturgeon ve Fasano, 2016).

Mikrobiyom kompozisyonunun klinik sonuçları etkileyen pre-, peri- ve post-natal çevresel faktörlerin anahtar rolünde olan bir “transdüktör” olarak kabul edilmesi, mikrobiyota hipotezinin formülasyonuna yol açmıştır ki bu da doğum yöntemi, antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve en önemlisi, sanayileşmiş ülkelerdeki diyet farklılıklarının mikrobiyom bileşiminde değişikliklere neden olması ve sonuçta CID'nin başlangıcını tetiklemesi dahil olmak üzere temel yaşam tarzı değişikliklerini şart koşmaktadır (Noverr ve Huffnagle, 2005; Martin ve diğerleri, 2016). Artık mikrobiyom ile ev sahibi arasında simbiyotik bir ilişki olduğu açıktır. 2001'in başlarında, komensal bakterilerin bağırsak geçirgenliği üzerinde etkili olduğu tanımlanmıştır (Garcia-Lafuente ve diğerleri, 2001). Kanıtlar, engellenmiş bağırsak bariyer fonksiyonunun, çeşitli CID'nin sekonder etkisinden ziyade anahtar bir patojenik bileşen olduğunu göstermiştir (Arrieta ve diğerleri, 2009; Visser ve diğerleri, 2010; Watts ve diğerleri, 2005). Zonulin, CID'nin gelişmesinde, şimdiye kadar keşfedilen hücreler arası sıkı birleşme yerlerinin üzerindeki tek fizyolojik modülatördür (Sturgeon ve Fasano, 2016).





**Şekil 5.** CID'lere yol açan mikrobiyom kompozisyonundaki değişikliklere neden olan çevresel uyarıların öne sürülen etkisi (Sturgeon ve Fasano, 2016)

IBD (Mielants ve diğerleri, 1991), CD (Drago ve diğerleri, 2006; Fasano ve diğerleri, 2000; Fasano, 2011; Hollon ve diğerleri, 2015), IBS (Camilleri ve Gorman, 2007), multipl skleroz (MS) (Yacyshyn ve diğerleri, 1996), romatoid artrit (RA) (Mielants ve diğerleri, 1991), tip-1-diyabet (T1D) (Mooradian ve diğerleri, 1986), astım (Benard ve diğerleri, 1996; Hijazi ve diğerleri, 2004), nekrotizan enterokolit (Bergmann ve diğerleri, 2013; Clark ve diğerleri, 2006; Hogberg ve diğerleri 2013) ve otizm spektrum bozuklukları (ASD) (D'Eufemia ve diğerleri, 1996) dahil olmak üzere çok sayıda CID'nin bağırsak geçirgenliğinde değişikliklere sahip olduğu tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, uyumlu genetik yapısı olan deneklerin % 10' undan azı klinik hastalığa ilerler, bu da çevresel uyarıların hastalığa ilerleyenlerin belirlenmesinde anahtar rol oynadığını gösterir. İntestinal epitel, konak ve çevre arasında bir ara yüz sağlayan en büyük mukozal yüzey

olduğundan, bağırsak mukozasından uygunsuz antijen trafiği söz konusu olabilir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

### **2.3. Zonulin**

Son yıllarda, hücreler arası sıkı bağlantıların (TJ) yapısı, işlevi ve düzenlenmesi hakkında çok şey keşfedilmiştir. Bununla birlikte, çalıştıkları kesin mekanizma (lar) hala tam olarak anlaşılmamıştır (Fasano, 2011). *Vibrio cholerae* tarafından hazırlanan TJ yeterliliğini etkileyen bir enterotoksin olan *Zonula okludens* toksinin keşfi (Zot), bağırsak paraselüler yolunun modülasyonunda yer alan karmaşık mekanizmalara ışık tutar. Zot yapısal işlev analizi, toksinin COOH-terminal bölümünün ( $\Delta G$  olarak adlandırılan) spesifik proteaz aktive edici reseptör (PAR)<sub>2</sub> bağlanması ve hücre içi TJ'nin geri dönüşlü açılmasına neden olan hücre içi sinyalin aktivasyonunda rol aldığını göstermiştir (Di Pierro ve diğerleri, 2001; Fasano, 2008).

Afinite ile saflaştırılmış anti-Zot antikoları ve Ussing chamber deneyi kombinasyonu, zonulin adı verilen intestinal bir Zot homologunun tanımlanmasına izin vermiştir (Fasano ve diğerleri, 2000; Wang ve diğerleri, 2000). İnsan bağırsak kadavralarından izolasyon, zonülinin, insan dışı primat bağırsak epitelindeki bağırsak geçirgenliğini artıran 47-kDa bir protein olduğunu ortaya koymuştur (Wang ve diğerleri, 2000). Zonulin, yapısal olarak *Vibrio cholerae*'nin *zonula okludens* toksinine benzer bir ökaryotik proteindir. İnce bağırsak sıkı bağlantılarının (tight junction) açılmasında önemli bir rol oynar (Klaus ve diğerleri, 2013). Zonülinin intestinal doğal immünite ile ilgili olduğu (El Asmar ve diğerleri, 2002) ve TJ disfonksiyonunun primer defekt gibi görüldüğü crohn hastalığı (CD) ve tip 1 diyabet (T1D) dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalıkta yükseldiği gözlenmiştir (Clement ve diğerleri, 2003; Drago ve diğerleri, 2006; Fasano ve diğerleri, 2000; Sapone ve diğerleri, 2006).

#### **2.3.1. Zonulin Sistemi**

Son yıllarda, TJ'lerin yapısı, işlevi ve düzenlenmesi hakkında çok şey keşfedilmiştir. Bununla birlikte, çalıştırdıkları kesin mekanizma (lar) hala tam olarak anlaşılammıştır (Fasano, 2011). Birçok mikroorganizmanın, hücre iskeletiyle bağlantılı yapı ve TJ fonksiyonunu da içeren epitel hücreleri üzerinde geri dönüşümsüz bir şekilde sitopatik bir patolojik etki gösterdiği gösterilmiştir. Bu bakteriler ya direkt olarak (EPEC) ya da toksinlerin hazırlanması yoluyla (*Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*) bağırsak

geçirgenliğini değiştirir (Fasano, 1999). *Vibrio cholerae* tarafından hazırlanan Zot için TJ geçirgenliğinin düzenlenmesi adına daha fizyolojik bir mekanizma ileri sürülmüştür (Baudry ve diğerleri, 1991; Fasano ve diğerleri, 1991).

*Vibrio kolera* için bir aşı geliştirirken yapılan araştırmalar, araştırmacıları hücre içi sıkı bağlantıları geri dönüşümlü şekilde açılabilen bir enterotoksin olan zonula okludens toksin'in (Zot) keşfine götürdü (Fasano ve diğerleri, 1991). Daha sonraki araştırmalar, paraselüler yolun regülasyonunda yer alan Zot tarafından tetiklenen sinyalleme kademelerinin karmaşıklığının takdir edilmesine yol açmıştır (Fasano ve diğerleri, 1995). *Vibrio cholerae* tarafından üretilen TJ'yi geri dönüşümlü olarak açan bir enterotoksin olan Zot'un keşfi, bağırsak epitelyal paraselüler yolunu düzenleyen karmaşık mekanizmalara ilişkin anlayışımızı artırmıştır (Fasano ve diğerleri, 1991). Zot, bir protein kinaz C bağımlı mekanizma yoluyla sıkı bağlantı komplekslerinin parçalara ayrılmasına yol açan hedef hücrelerin aktin polimerizasyonuna neden olur (Fasano ve diğerleri, 1995). İmmünofloresan çalışmalar, Zot'un jejunum ve distal ileumda en yüksek bağlanma ile Gİ yolu boyunca epitelyal hücrelerle etkileşime girebildiğini ve ayrıca villustan kripte eksenine doğru azaldığını göstermiştir (Fasano ve diğerleri, 1997). Bu bağlanma çalışmaları, bağırsak boyunca Zot'un bölgesel etkisi hakkındaki verileri doğrulamaktadır. Bu bağlanma dağılımı, farklı bağırsak epitelyal bariyer duyarlılığı ve Zot'un intestinal geçirgenlik üzerindeki bölgesel etkisiyle birlikte villus eksenine boyunca meydana gelen aktin reorganizasyonu ile çakışmaktadır (Fasano ve diğerleri, 1995, 1997; Marcial ve diğerleri, 1984). Bu birleştirilmiş veriler Zot'un TJ'yi hızlı, geri dönüşümlü ve tekrarlanabilir bir şekilde düzenlediğini ve muhtemelen paraselüler yolun fizyolojik modülasyonu sırasında etkin olan hücre içi sinyalleri aktive ettiğini göstermiştir. Bu gözleme dayanarak, Zot'un, işlevsel ve immünolojik olarak ilişkili bir epitelyal TJ endojen modülatörünün etkisini taklit edebileceği varsayılmıştır (Fasano, 2011).

Zot tarafından aktive edilen ve TJ modülasyonuna yol açan hücre içi sinyallemenin karmaşıklığı göz önüne alındığında, toksinin epitelyal sıkı bağlantıları düzenleyebilen endojen bir proteini taklit edebileceği hipotezi öne sürülmüştür. Ussing chamber deneyleri ve anti-Zot antikoru, zonulin olarak adlandırılan, Zot'un bir ~47 kDa insan analogunun tanımlanmasına neden olmuştur (Fasano ve diğerleri, 2000). Hücre dışı çalışmalar, endojen insan zonulininin jejunum ve ileumdaki geçirgenliği artırabildiğini göstermektedir (Wang ve diğerleri, 2000).

### 2.3.2. Zonulin Sisteminin Fizyolojisi

Zonulin sisteminin fizyolojik rolü belirlenmeye devam etmektedir, ancak bu sistemin sıvı, makromoleküller ve kan dolaşımı ile bağırsak lümeni arasındaki lökositlerin normal ve tersine hareketinden sorumlu olan TJ düzenlemesi de dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde yer alması olasıdır. Bağırsak zonülünün bir başka olası fizyolojik rolü, mikroorganizma kolonizasyonuna karşı korumadır (El Asmar ve diğerleri, 2002). Enterik enfeksiyonların yokluğunda, memeli ince bağırsağı gerçekte sterilidir. Proksimal bağırsağın enterik mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu (belirgin mukoza hasarı veya spesifik toksinlerin varlığı olmadan bile) sızıntılı bir bağırsağa yol açabilir, ancak bu intestinal TJ permeabilitesinin bozulmuş fizyolojik regülasyonunun proksimal bakteriyel kontaminasyonuna bağlı sekonder olarak meydana geliş mekanizmaları belirsizliğini korur (Isolauri ve diğerleri, 1993). Yakın zamanda, hem normal enterik bakteriyel flora izolatlarının (bilinen herhangi bir patojenik özelliği barındırmaması için iyi bir şekilde karakterize edilmiş) hem de patojenik bakterilerin, epitel direnci ve artan inülin geçişindeki değişikliklerle öne sürüldüğü gibi TJ yeterliliğinde değişimi uyardığı kanıtlanmıştır (El Asmar ve diğerleri, 2002). Bu değişiklikler organ kültür sistemlerinde zonulin varlığı ile eşzamanlı olarak ifade edilmiş ve bakteri gentamisin tedavisi ile öldürüldüğünde bile ortaya çıkmıştır (El Asmar ve diğerleri, 2002). Bu sonuçlar, ince bağırsakta enterik mikroorganizmaların varlığının [ancak, zonulin sisteminin çalışmadığı kolonda değil (Fasano ve diğerleri, 1991, 1995, 1997) mevcudiyetinin, zonulin luminal sekresyonuna yol açan konakçıya bağlı bir mukoza tepkisi oluşturduğunu göstermektedir. Zonulinin bakteri tarafından indüklenmiş bağırsak bariyeri fonksiyonunda bozulmadaki rolü, organ kültür süpernatantlarında sadece bakterilere maruz kalındığında zonulinin tespit edilmesi ve bu bağırsak bariyer değişiklikleri üzerindeki zonulin inhibitörlerinin bloke edici etkisi gözlemleriyle desteklenir (El Asmar ve diğerleri, 2002). Bakterilerin bağırsak mukozası ile etkileşiminin, patojenik özelliklerine veya yaşayabilirliklerine bakılmaksızın zonulin salınımını indüklemesi gerçeği, mikroorganizmaların ince bağırsak yüzeyindeki anormal varlığına tepki gösteren, bakteriden bağımsız bir savunma mekanizması olarak yorumlanabilir. Zonulin kaynaklı TJ'lerin açılmasını takiben, hidrostatik basınç meyilini de takiben bağırsak lümenine su salgılanır ve bakteriler ince bağırsaktan “temizlenir” (Fasano ve diğerleri, 1997).

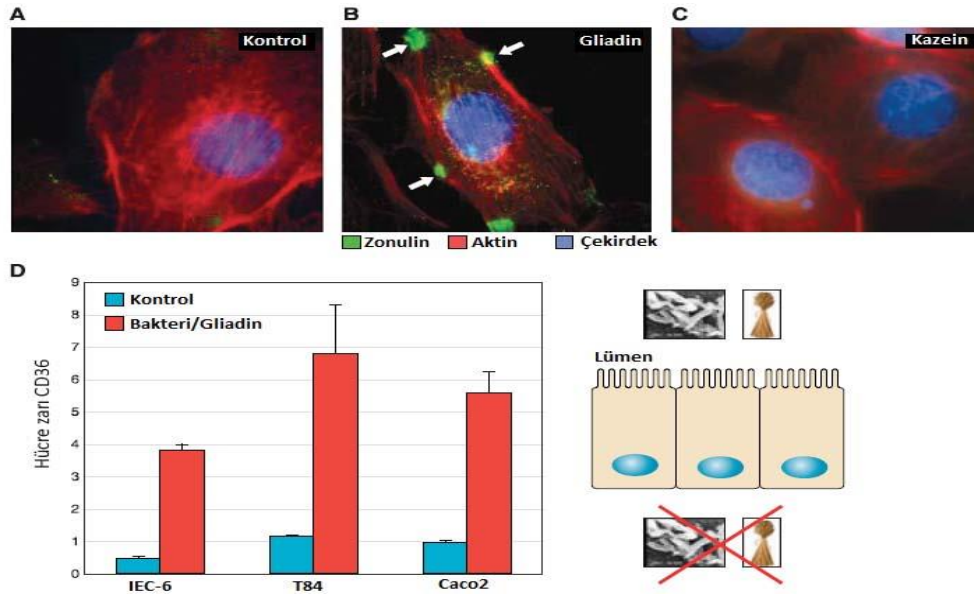
### 2.3.3. Zonulin Salınımı

Şimdiye kadar tanımlanan iki ana zonulin salınımı tetikleyicisi, bakteri ve gliadindir. Pek çok enterik patojenin, konakçının bağırsak sıkı bağlantısını etkileyen enterotoksinleri üretebildiği iyi tanımlanmıştır. Enterotoksinlere ek olarak, komensal *Escherichia coli*, lab *E. coli*, virüent *E. coli* ve *Salmonella typhi* dahil olmak üzere çeşitli enterik patojenlerin, apikal yüzeye uygulandığında bağırsaktan zonulin salınmasına neden olduğu gösterilmiştir (El Asmar ve diğerleri, 2002). Zonulin salınmasının ardından, bağırsak artan permeabilite göstermiş ve ZO-1, TJ kompleksinden ayrılmıştır (El Asmar ve diğerleri, 2002). Gliadin, zonulin salınımı için tanımlanan diğer tetikleyicidir (Clemente ve diğerleri, 2003; Thomas ve diğerleri, 2006). Gliadin, sadece apikal yüzeye uygulandığında, hem hücre kültürü modellerinde hem de intestinal doku ex vivo çalışmalarında, zonulin salınımına ve daha sonra geçirgenlikte artmaya neden olmuştur (Clemente ve diğerleri, 2004; Lammers ve diğerleri, 2008).

Zonulin salınımını tetikleyebilen çeşitli potansiyel bağırsak lümen uyarıcıları arasında, iki diğerlerine göre güçlü tetikleyici olarak ince bağırsağın bakterilere ve glutene maruziyetini tespit edilmiştir (Fasano, 2011). Enterik enfeksiyonlar, bağırsak bariyerinin bozulmasına neden olarak alerjik, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik durumun patogenezinde rol oynamaktadır. Enterik bakterilere maruz kalan ince bağırsakların zonulin salgıladığına dair kanıtlar üretilmiştir (El Asmar ve diğerleri, 2002). Bu salgı, ya ince bağırsakların izole edildiği hayvan türünden ya da test edilen mikroorganizmaların virülansından bağımsızdır, yalnızca bakteriye maruz kalan ince bağırsak mukozasının lümen cephesinde meydana gelir ve ardından, ZO-1 proteininin tight junction kompleksinden ayrılmasıyla tutarlı olarak bağırsak geçirgenliğinin artmasıyla takip edilir (El Asmar ve diğerleri, 2002). Paraselüler yolun bu zonüline bağlı açılması, mikroorganizmaları temizleyen ve konağın ince bağırsakta bakteriyel kolonizasyona karşı doğal immün tepkisine katkıda bulunan bir savunma mekanizmasını temsil edebilir (Fasano, 2011).

Bakteriyel maruz kalmaya ek olarak, gliadinin de ayrıca zonülini serbest bırakarak bağırsak bariyer fonksiyonunu etkilediği gösterilmiştir (Clemente ve diğerleri, 2003). Gliadinin bu etkisi polarizedir, yani gliadin, yalnızca bağırsak dokusunun luminal tarafına uygulandığında bağırsak geçirgenliğini artırır (Clemente ve diğerleri, 2003). Bu gözlem gliadin için hedef intestinal reseptör olarak kemokin reseptörü G proteini bağlı reseptör 9

(CXCR3)'u teşhis etmeye yönlendirmiştir (Lammers ve diğerleri, 2008). Veriler, intestinal epitelde, CXCR3'ün lümen düzeyinde eksprese edildiğini, CD hastalarında aşırı eksprese edildiğini ve gliadin ile birlikte tekrar lokalize edildiğini ve bu etkileşimin, MyD88 adaptörünün reseptöre bağlanmasıyla uyumlu olduğunu göstermektedir (Lammers ve diğerleri, 2008). Ayrıca, gliadinin CXCR3'e bağlanmasının, zonulin salınması ve takip eden bağırsak geçirgenliğinin artması için çok önemli olduğu gösterilmiştir, çünkü CXCR3 eksikliği olan fareler, zonulin salınımı ve TJ'nin parçalanması açısından gliadin sorununa cevap verememiştir (Lammers ve diğerleri, 2008). Bir alfa-gliadin sentetik peptid kütüphanesi kullanarak, CXCR3'e bağlanan ve zonülini serbest bırakan iki alfa-gliadin 20-mers tanımlanmıştır. (Lammers ve diğerleri, 2008).



**Şekil 6.** Bağırsak epitel hücrelerinden polarize zonulin salınımına neden olan uyaranlar. (A – C) İnsan bağırsak Caco2 hücrelerinin anti-zonulin immüno Floresans boyanması. (B) Gliadin / PT-gliadine maruz kalan hücreler, sonrasında hücre zarına kademeli olarak yaklaşacak şekilde, önceden oluşmuş zonülini veziküllerin içine (oklar) paketleyerek tepki verir, ve sonra gliadine maruz kaldıktan birkaç dakika sonra zonulin içeriğini hücre ortamında serbest bırakır. Uyarılmamış hücrelerde (kontrol, A) veya PT-kazein (C) ile inkübe edilmiş hücrelerde paketleme tespit edilmemiştir. Çekirdek mavi renkte, hücre iskeleti kırmızı renkte ve zonulin yeşil renktedir. Büyütme x 100. (D) Bakterilere veya PT-gliadine maruz bırakılan bağırsak hücrelerinin polarize zonulin salgısı. Patojenik olmayan bakterilere veya gliadine maruz bırakılan hem sıçan (IEC6) hem de insan (Caco2 ve T84) bağırsak epitel hücreleri, kontrol hücre ortamındaki hücrelerde ölçülen zonülin miktarına kıyasla, banyo ortamında büyük miktarlarda zonulin salgılar. Bu salgılama, sadece tetikleyiciler hücre mono tabakalarının lümen (apikal) yönüne eklendiğinde tespit edilmiştir (Fasano, 2011)

## 2.4. Zonulin Sisteminin Patolojisi ve Spesifik Hastalıklarda Rolü

Paraselüler yolun bir zamanlar sadece suyun, elektrolitlerin ve küçük moleküllerin pasif regüle olmayan geçişi için bir yol olduğu düşünülmüştür. Şimdi bu yolu yöneten

unsurların (yani TJ'ler) gelişimsel, fizyolojik ve patolojik durumlarda yer alan son derece dinamik yapılar olduğu ortaya çıkmaktadır. Şu anda patogenezi, intestinal intersellüler TJ'lerin primer disfonksiyonu ile ilişkili olan artan sayıda otoimmün hastalık tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, bu aynı yapılar, normal olarak bağırsaktan emilmeyen makromoleküllerin verilmesi için yenilikçi stratejiler geliştirmek için kullanılmaktadır (Fasano A, 2001).

Gastrointestinal sistem, sindirim ve absorbe edici fonksiyonları için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bununla birlikte, anatomo-fonksiyonel özelliklerinin daha dikkatli bir analizi, işlevlerinin besinlerin ve elektrolitlerin işlenmesinin ötesine geçtiğini açıkça göstermektedir. Hücre alt tiplerinin hassas bölgesel spesifik anatomik düzenlemeleri ve epitelyal, nöroendokrin ve bağışıklık hücreleri arasındaki ince düzenlenmiş çapraz konuşma, gastrointestinal sistemin daha az çalışılmış, ancak son derece önemli diğer işlevlerini vurgular. Özellikle ilgi çekici olan, antijen değiş tokuşunun zonulin yolu ile düzenlenmesi ve bunun bağırsak mukozası, mikrobiyota / glüten etkileşimleri ile aktivasyonudur. Bu işlevler toleranstan bağışıklığa geçişi belirler ve muhtemelen inflamatuvar ve neoplastik süreçlerin patogenezinde yer alan tamamlayıcı mekanizmalardır (Fasano, 2011).

Spesifik genetik yapıyı ve çevresel tetikleyicilere maruz kalmayı içeren klasik inflamatuvar patogenezi paradigmasına son zamanlarda üçüncü bir element olan bağırsak bariyeri fonksiyonunun kaybının eklenmesiyle meydan okunmuştur. Genetik yatkınlık, doğal ve adaptif bağışıklık arasındaki yanlış iletişim, çevresel tetikleyicilere maruz kalma ve gıda kaynaklı çevresel tetikleyiciler tarafından zonulin yolunun aktivasyonuna sekonder olarak bağırsak bariyeri işlevinin kaybı veya bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin hepsi inflamasyon, otoimmünite ve kanser patogenezinde yer alan temel bileşenler gibi görünmektedir. Bu yeni teori, patolojik süreç aktive edildiğinde, otomatik olarak devam etmediğini ima eder. Aksine, genler ve çevre arasındaki sürekli etkileşimin önlenmesi ile modüle edilebilir ve hatta tersine çevrilebilir. Zonulin bağımlı TJ disfonksiyonu bu tür etkileşimlere izin verdiğinden, zonulin yolunu aşağıya doğru düzenleyerek bağırsak bariyeri fonksiyonunu yeniden kurmayı amaçlayan yeni terapötik stratejiler, bu zayıflatıcı kronik hastalıkların yönetimi için yenilikçi ve henüz keşfedilmemiş yaklaşımlar sunmaktadır (Fasano, 2011).

Zonulin sisteminin keşfi, hücreler arası TJ'lerin karmaşık patofizyolojik düzenlenmesine ışık tutmuştur, ancak hala tamamen ele alınmaktan uzakta kalmaktadır. Zonulin'in ince bağırsağın hücreler arası TJ'lerinin fizyolojik düzenlenmesinde yer alması akla yatkındır. Bu kavramsal zonulin modelinin düzensizliği, otoimmün hastalığa (yani, CD

ve tip 1 diyabet) yol açan gelişimsel ve bağırsak kaynaklı bozukluklar, doku iltihabı, malign transformasyon ve metastaz dahil olmak üzere düzensiz intersellüler iletişimi içeren hastalık durumlarına katkıda bulunabilir. Aynı sistem, şu anda rekombinant DNA teknikleriyle tasarlanan veya insan genomu projesi yoluyla elde edilebilecek olan makromoleküllerin ve ilaçların hedeflenen dokuya özel olarak teslimi fırsatını sağlayabilir (Fasano, 2001).

Hem hücre sinyal olaylarının hem de zonulin sisteminde yer alan hücre içi yapıların karmaşıklığı göz önüne alındığında, TJ disfonksiyonunun primer bozukluk olarak görüldüğü çoğu otoimmün hastalıkta olduğu gibi, bağırsak epitelinin fizyolojik durumu dramatik olarak değiştiğinde bu yolun etkilenebileceği sürpriz değildir (Fasano, 2001).

Zonulin birçok CID'de rol oynamaktadır. Ele alınan CID'den bağımsız olarak, toleransın kırılmasına ve CID'nin daha sonraki gelişmesine yol açan adımlar benzer görünmektedir. Fizyolojik koşullar altında, spesifik immün hücrelerle uyum halinde olarak mukozal antijen trafiği (antijen örnekleme) üzerinde sıkı bir kontrol vardır ve kemokin ile sitokin mediyatörleri enerjiye ve dolayısıyla mukoza toleransına yol açar. Artan miktarda zonulinin uygun olmayan üretimi, takip eden uygunsuz ve kontrolsüz antijen trafiği ile birlikte, submukozal immün bölme tarafından doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisini kışkırtarak bariyer fonksiyonunun işlevsel kaybına neden olur (Sturgeon ve Fasano, 2016).

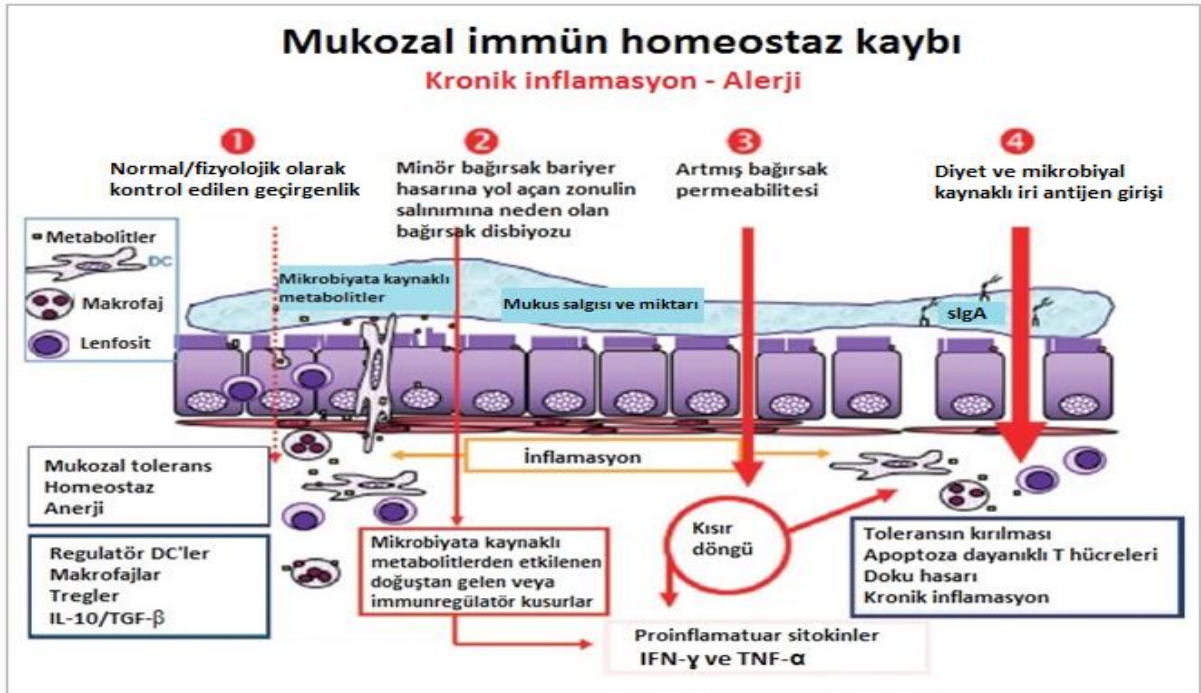
Eğer bu süreç devam ederse, İnterferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ve *Tümör nekroz faktör-alfa* (TNF- $\alpha$ ) dahil olmak üzere pro-inflamatuar sitokinlerin üretimine neden olacak şekilde, antijenlerin geçişi için parasellüler yolun daha fazla açılmasına neden olan durumla uyumlu bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkar ve bu da bir kısır döngü yaratır. Sonuç olarak, bu süreçler toleransın kırılmasına ve doğası, hangi organın veya dokunun inflamatuvar süreç tarafından hedefleneceğini belirleyen konakçıya özel genetik arka plandan etkilenen CID'nin başlamasına yol açar (Sturgeon ve Fasano, 2016).



**Tablo 1.** Serum zonulin seviyeleri ve çeşitli tight junction (sıkı bağlantı) protein antikorumları arasındaki doğrudan veya dolaylı korelasyon tabloda gösterilmektedir. Burada "r", serum zonulin seviyesi ile zonulin ve diğer sıkı bağlantı proteinlerine karşı antikorumlar arasındaki korelasyonun en iyi göstergesidir (Vojdani ve diğerleri, 2017)

### Serum zonulin seviyesi ile farklı tight junction (sıkı bağlantı) protein antikorumları arasındaki korelasyon

Tight junction (sıkı bağlantı) proteini	IgG		IgA	
	r	P değeri	r	P değeri
Zonulin	0.34	0.064	0.55	0.002
Okludin	0.60	<0.001	0.50	0.005
Vinkülin	0.40	0.032	0.52	0.003
Akuaporin 4	0.42	0.020	0.24	0.197
Glial fibriller asidik protein	0.55	0.002	0.60	<0.001



**Şekil 7.** CID'nin gelişmesine yol açan bariyer fonksiyonunun kaybına neden olan zonulinin öne sürülen mekanizması. (1) Bireysel olmayan antijenlerin (antijen örnekleme) spesifik bağırsak ilişkili lamina propria hücreleri ve sitokinler mikro çevresi ile birlikte normal bariyer geçişi, mukozal toleransa yol açar. (2) Çevresel uyarılar mikrobiyom dengesizliğine neden olur, zonulin salınımını tetikler, (3) bu da bağırsak lümeninden lamina propriaya artmış antijen girişine neden olur. (4) Lamina propriadaki antijenler, IFN-γ ve TNF-α salınımına neden olacak şekilde bağışıklık sistemini aktive eder, bu da artan bağırsak geçirgenliğini ve bağışıklık yanıtını daha da şiddetlendirir. Bu, toleransın kırılmasına ve sonuçta genetik olarak yatkın kişilerde CID'lerin başlangıcına neden olan bir kısır döngüye yol açar (Sturgeon ve Fasano, 2016).

**Tablo 2.** Zonulin' in dahil olduğu CID'lerin listesi (Sturgeon ve Fasano, 2016).

<b>Hastalık Kategorisi</b>	<b>Hastalık</b>	<b>Model</b>	<b>Hastalıkla İlişki</b>
Otoimmün hastalıklar	Çölyak Hastalığı Tip-1 Diyabet İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı / Kollitid Multiple Skleroz	İnsan İnsan, fare Fare İnsan, fare	Patogeneizde Spesifik Rol Patogeneizde Olası Rol Patogeneizde Olası Rol Patogeneizde Olası Rol
Metabolik Bozukluklar	Obezite/İnsülin Direnci Tip-2 Diyabet Polikistik Over Sendromu	İnsan İnsan İnsan	Reseptör Artışı Reseptör Artışı Reseptör Artışı
Akciğer Hastalıkları	Akut Akciğer Hasarı Astma	Fare İnsan	Patogeneizde Olası Rol Patogeneizde Olası Rol
Kalp Hastalıkları	Koroner Arter Hastalığı	İnsan	Reseptör Artışı
Nörolojik Hastalıklar	Gliom	İnsan, Hücre Kültürü	Reseptör Artışı
Sistemik Enfeksiyöz Hastalıklar	Septisemi HIV	İnsan İnsan	Reseptör Artışı Reseptör Azalması
Bağırsak Hastalıkları	Huzursuz Bağırsak Sendromu Çölyak Olmayan Gluten İntöleransı Çevresel Enteropati Nekrotizan Enterokolit	İnsan İnsan İnsan Fare, hücre kültürü	Reseptör Artışı Reseptör Artışı İlişkili Reseptör Artışı

### Zonulin (Pre-HP2) ile ilişkili başlıca hastalıklar

#### Otoimmün hastalıklar

Ankilozan spondilit  
Çölyak hastalığı  
inflamatuvar bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı)  
Romatoid artrit  
Sistemik lupus eritematoz  
Tip 1 diyabet

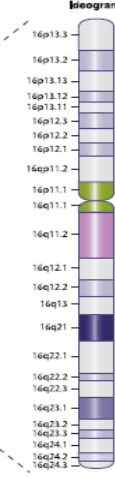
#### Kanserler

Beyin kanserleri (gliomalar)  
Meme kanseri  
Akciğer adenokarsinomu  
Yumurtalık kanseri  
Pankreas kanseri

#### Sinir sistemi hastalıkları

Kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati (CIDP)  
Multipl skleroz (Otoimmün hastalık?)  
Şizofreni (Otoimmün hastalık?)

### Kromozom 16



### Kromozom 16 ile ilişkili başlıca hastalıklar

#### Otoimmün hastalıklar

Yetişkin polikistik böbrek hastalığı  
İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (NOD2 lokusu)  
Sistemik lupus eritematoz  
Tip 1 diyabet  
Romatoid artrit

#### Kanserler

Akut nonlenfositik lösemi  
Meme kanseri  
Fanconi anemisi  
Lenfoma, diffüz büyük B hücreli  
Miyeloid lösemi, akut  
Prostat kanserleri

#### Sinir sistemi hastalıkları

Batten hastalığı (juvenil başlangıçlı nörodejeneratif bozukluk)  
Lou Gehrig hastalığı  
Lökodistrofi  
Multiple skleroz  
Otizm

**Şekil 8.** Zonulin ve kromozom 16 ile ilişkili hastalıklar. Kromozom 16 üzerinde geni bulunan zonulin ile ilgili bir biyobelirteç olarak kanıtlanmış, şüphelenilen veya bağıntılı hastalıklar arasında otoimmün hastalıklar, kanserler ve sinir sistemi hastalıkları bulunur. Aynı kategorilerdeki hastalıklar kromozom 16 üzerinde bulunan diğer genlerle ilgili olmuştur (Fasano, 2011)

### 2.4.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Zonulinin Rolü

İnflamatuvar bağırsak hastalığının patogenezi bilinmemesine rağmen son yıllarda otoimmün sürecin başlatılmasında genetik, immünolojik ve çevresel faktörleri ima etmek için ikna edici kanıtlar vardır. Bununla birlikte, birkaç kanıt dizisi, bağırsak geçirgenliğinin artmasının IBD patogenezinde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Fasano, 2001, 2008; Turner, 2009; Weber ve Turner, 2007; Xavier ve Podolsky, 2007). CD gibi, IBD de doğuştan gelen bir bağışıklık yetersizliği ile ilişkili olabilir, bu da bireye ait olmayan antijenlerin bağırsakla ilişkili lenfoid dokuya uygunsuz erişimine yol açar. Klinik olarak asemptomatik Crohn hastalarında, artmış bağırsak epitelyal geçirgenliği klinik alevlenmeden 1 yıl kadar önce gelir, bu da geçirgenlik kusurunun hastalık alevlenmesinde erken bir olay olduğunu düşündürür (Turner, 2006; Weber ve Turner, 2007). Anormal bağırsak bariyeri fonksiyonunun IBD patogenezinde yer alan genetik bir özellik olduğu hipotezi, Crohn hastalığı hastalarının klinik olarak asemptomatik birinci derece akrabalarının bağırsak geçirgenliğinin artmış olabileceği gözlemiyle de desteklenmektedir (Weber ve Turner, 2007; Xavier ve Podolsky, 2007). Kısa bir süre önce, zonulin yükselmesinin IBD'nin akut fazında tespit edilebilir olduğunu ve inflamatuvar süreç spesifik tedaviyi takiben azaldığında serum seviyelerinin de azaldığını (ancak yine de normalden daha yüksek) öne süren kanıtlar üretilmiştir (Fasano, 2011). Bağırsak bariyer fonksiyonunun birincil kusuru (muhtemelen zonulin yolunun aktivasyonuna ikincil olarak) IBD

patogenezinin erken aşamalarında yer alırken, inflamatuvar sürece sekonder olarak IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  dahil olmak üzere sitokinlerin üretimi, TJ proteinleri ZO-1, kavşak adhezyon molekülü 1, okludin, claudin-1 ve claudin-4'ü yeniden düzenleyerek bağırsak geçirgenliğinin artmasını sürdürür (Al-Sadi ve Ma, 2007; Wang ve ark, 2005; Wang ve ark, 2006). Bu şekilde, bariyer disfonksiyonunun luminal içeriklerin daha fazla sızmasına izin verdiği, böylece daha fazla sızıntıyı destekleyen bir bağışıklık tepkisini tetiklediği bir kısır döngü yaratılır (Fasano, 2011).

Artmış bağırsak geçirgenliğinin hem CrD hem de UC'nin patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Buhner ve diğerleri, 2006; Buning ve diğerleri, 2012; Peeters ve diğerleri, 1997; Teahon ve diğerleri, 1992; Wyatt ve diğerleri, 1993). Arrieta ve diğerleri, ince bağırsak geçirgenliğinde artış ve kolit gelişimi arasında doğrudan ilişkiyi göstermek için IL-10 yıkıcı (IL-10 - / -) kolit modelini kullanmışlardır (Arrieta ve diğerleri, 2009). IL-10 - / - farelerinin, kolit gelişimini başlatan, ince bağırsakta artmış geçirgenliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Zonulin inhibitörü AT-1001 ile tedavi, kolit şiddetinde önemli bir azalmaya neden olmuştur (Arrieta ve diğerleri, 2009). Birlikte, bu deneyler, anormal antijen trafiğine ve takip eden bağırsak immun hücrelerinin aktivasyonuna sonuç olarak da daha şiddetli kolitise sebep oldukları kalın bağırsağa göçlerine neden olan artmış ince bağırsak permeabilitesinin bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, normal bir ince bağırsak bariyeri fonksiyonunun restorasyonu, kolit için etkili bir tedavi seçeneği olabilir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

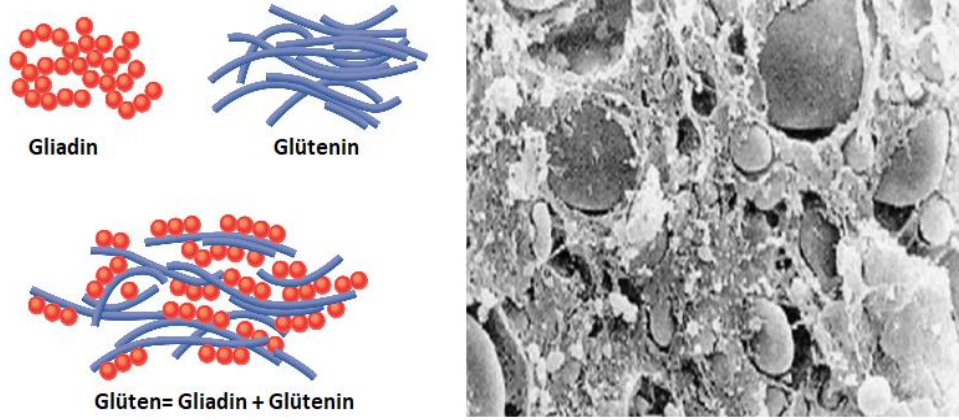
#### **2.4.2. Çölyak Hastalığında Zonulinin Rolü**

CD, genetik olarak duyarlı bireylerde gluten içeren tahılların yutulmasıyla tetiklenen bir otoimmün enteropatidir. CD, birçok gen birliğinin tanımlandığı karmaşık bir genetik bozukluktur. CD hastalarında glutenin yutulması, sadece kısmen saptanmış bir mekanizma yoluyla bağırsak villusunun tahribatına neden olur. Tanı, doku transglütaminaz enzimine oto-antikorların varlığını gösteren serolojik taramaya ve bunu takiben duodenal biyopsi ile birlikte yapılan bir üst endoskopide intraepitelyal lenfositlerin, kript hiperplazisinin ve villöz körelmenin varlığı ile karakterize olan tipik çölyak otoimmün enteropatisinin gösterilmesi temeline dayanır (Sturgeon ve Fasano, 2016).

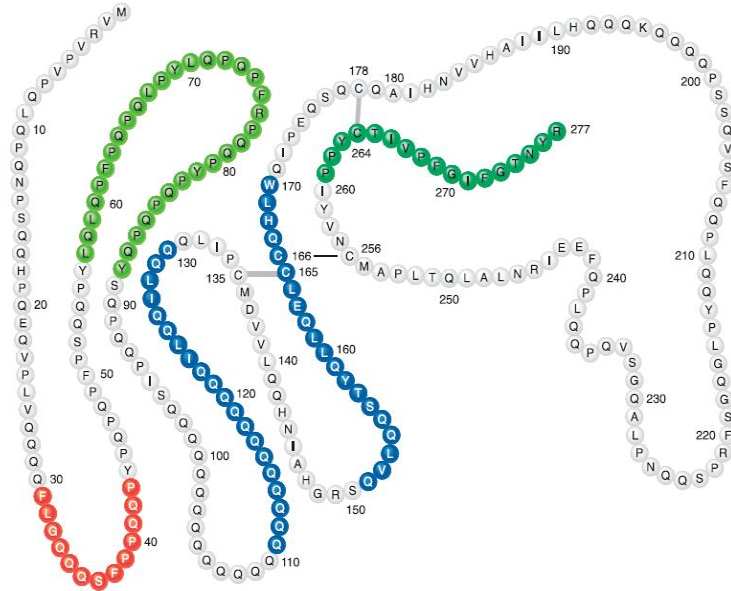
Mevcut tedavi seçenekleri, diyetten gluten kısıtlaması ve glutensiz diyet (GFD) ile sınırlıdır. GFD, birçok durumda bağırsak mukozasının iyileşmesine ve villöz mimarinin normale dönmesine izin verir. Tanı bağırsak biyopsisine dayanmasına rağmen, CD birçok

farklı organı etkileyebilen ve birkaç ekstraintestinal semptomlara neden olabilen sistemik bir hastalıktır (Sturgeon ve Fasano, 2016).

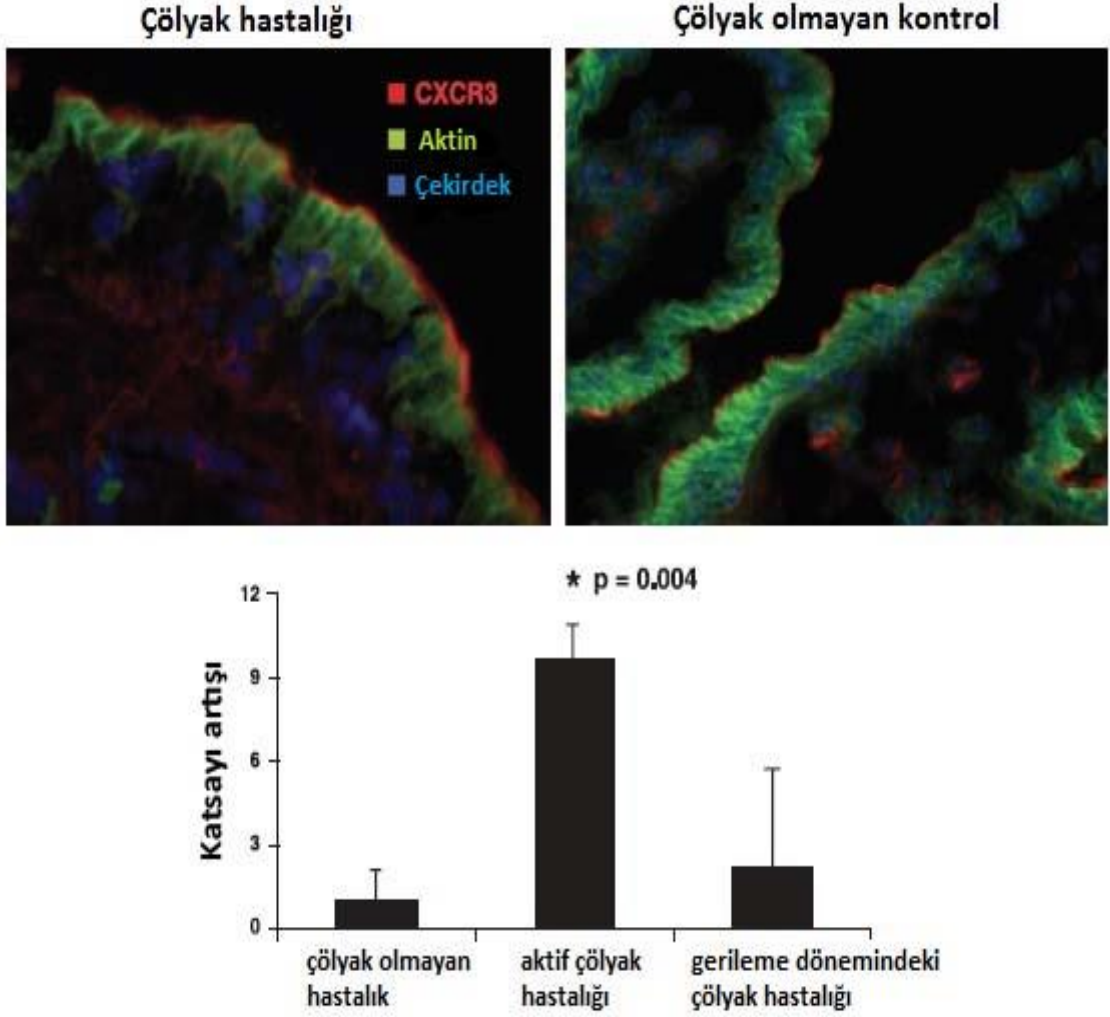
Glüten, gliadin ve glüteninlerden oluşan karmaşık bir moleküldür. Gliadin, buğday, çavdar ve arpada bulunan protein glüteninin bir alt birimidir. Kapsamlı araştırmalarla en az 50 toksik epitop tanımlanmıştır. Etkileri sitotoksisite, immünomodülasyon ve bariyer bozulmasını içerir (Sturgeon ve Fasano, 2016).



**Şekil 9.** Glüten yapısı. Glüten, her ikisi de çölyak hastalığı hastaları için toksik olan iki ana proteinin, gliadinlerin ve glüteninlerin bir karışımından oluşur. Glütenin, globüler gliadinlerin tutulduğu liflerden oluşan bir ağ oluşturur. Solda, çizimler hem proteinlerin her iki sınıfını hem de nasıl etkileştiklerini gösterir. Sağda, bir tarama elektron mikroskobu, gliadinler ve glüteninler arasındaki yapısal etkileşimi gösterir (Fasano, 2011)



**Şekil 10.** Gliadin motifleri. CD hastalarında, sitotoksik aktivite (kırmızı), immünomodülatör aktivite (açık yeşil), zonulin salımı ve bağırsak geçirgenliği oluşturucu aktivite (mavi) ve CXCR3-IL-8 salımını (koyu yeşil) uygulayan  $\alpha$ -gliadin motiflerinin haritalanması (Fasano, 2011)



**Şekil 11.** Çölyak hastalarında ve çölyak olmayan kontrollerde CXCR3. Üst: Çölyak hastalarından veya çölyak olmayan kontrollerden elde edilen insan ince bağırsak biyopsilerinde CXCR3'ün hücre içi immünofloresan mikroskopisi. Kırmızı boyanmış CXCR3, çölyak hastalığı olan hastalardan alınan biyopsilerin intestinal epitelyal hücrelerinin apikal tarafında homojen olarak görülürken, CXCR3 boyaması çölyak olmayan kontrollerde yamalıdır. Alt: CXCR3 geninin kantitatif real-time PCR'ı, çölyak olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında, artmış bir reseptör ekspresyonunu doğruladı ve reseptör ekspresyonu glutensiz bir diyetle tedaviden sonra azaldı. Çölyak hastalığı biyopsilerinde, çölyak olmayan kontrollere kıyasla, CXCR3 eksprese eden immün hücrelerin artmış olmasına dikkat edin. Çekirdek mavi ve hücre iskeleti yeşil olarak gösterilmiştir (Fasano, 2011).

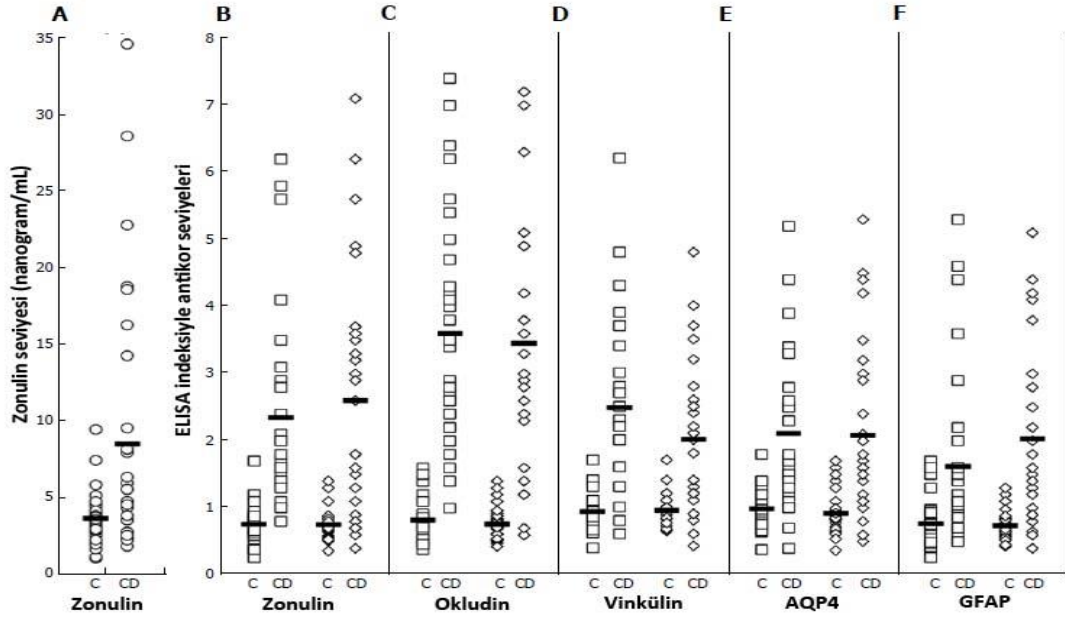
Zonulinin CD hastalığının gelişimine ve patogeneze katılımı iyi belgelenmiş olduğu için, zonulin'in etkilerini çalışmak için bu hastalık bir model olarak kullanılmaya gelmiştir (Clemente ve diğerleri, 2003; Drago ve diğerleri, 2006; Fasano, 2000, 2001, 2008, 2011; Fasano ve diğerleri, 2000; Fasano ve Shea-Donohue, 2005; Lammers ve diğerleri, 2008; Smecuol ve diğerleri, 2005; Thomas ve diğerleri, 2006; Tripathi ve diğerleri, 2009). CD'li hastalarda gluten alımından sonra zonulin üretilir (Drago ve diğerleri, 2006). Bağırsak biyopsilerinin Ussing Chamber'de pepsin-tripsin (PT)-sindirilmiş gliadin parçalarına maruz

kalması, zonulin salınımında bir artışa neden olmuştur. İlginç olarak hem gerileme dönemindeki CD hastalarında hem de sağlıklı kontrol hastalarında zonulin salınımı ölçülebilir, ancak sağlıklı kontrol hastalarında zonulin salınımı seviyesi düşüktür, sıkı bir şekilde düzenlenir ve kısa dönem salınım ile gösterildiği gibi, zonulin 20 dakika içinde başlangıç çizgisine döner (Drago ve diğerleri, 2006).

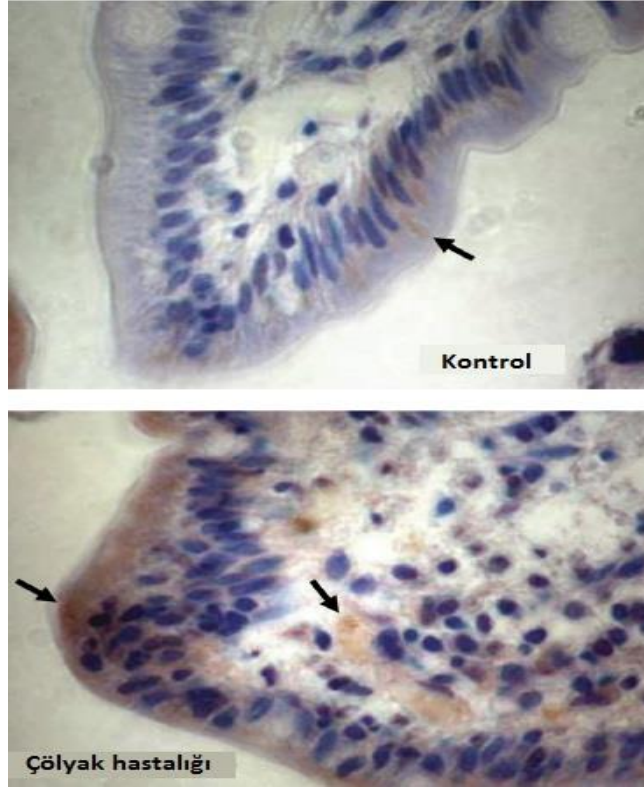
Tersine, CD hastaları gliadin stimülasyonunu takiben çok daha güçlü ve uzamış bir zonulin salınımı gösterir, ardından bağırsak geçirgenliğinde önemli bir artış olur (Drago ve diğerleri, 2006). Zonulin salınımı ve ardından bağırsak geçirgenliğinde artış, zonulin antagonisti AT-1001 kullanılarak bloke edilmiştir (Drago ve diğerleri, 2006). Ayrıca, PT-gliadin uyarımı olmaksızın tam remisyonda olan CD hastalarında, bağırsak tarafından üretilen zonulinin yapıcı bir şekilde artmış olmasının, sağlıklı kontrollere kıyasla geçirgenlikte bir artışla ilişkili olduğu gözlemi dikkate değerdir (Drago ve diğerleri, 2006).

AT1001 (şimdiki adı Larazotide asetat), zonulin yolunu antagonize eden sentetik bir 8 amino asitli peptiddir (Di Pierro ve diğerleri, 2001). Klinik öncesi çalışmalar, larazotid asetatın zonulinin nüfuz etme aktivitesini önleyebildiğini göstermiştir (Watts ve diğerleri, 2005; Gopalakrishnan ve diğerleri, 2012).

Zonulinin CD'nin akut fazı sırasında olup olmadığını belirlemek için, aktif CD'li ve CD olmayan kontrol hastaların bağırsak dokuları, zonulin ekspresyonu için araştırılmıştır (Fasano ve diğerleri, 2000). CD dokularının immünofloresan analizi, kontrol dokularında sürekli olarak bulunmayan karakteristik retiküler patern ile intestinal submukozada artan zonulin ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır (Fasano ve diğerleri, 2000). Aktif CD hastalarından alınan bağırsak doku lizatlarının kantitatif immüno-boyaması, kontrol dokuları ile karşılaştırıldığında artmış zonulin proteini varlığını doğrulamıştır (Fasano ve diğerleri, 2000). CD'deki TJ dengesizlikleri villöz enterositlerde daha çok bildirilmiştir ve bu nedenle gastrointestinal yol boyunca zonulin reseptör dağılımı ile tutarlıdır (Fasano ve diğerleri, 1997; Fasano ve diğerleri, 2000). Son zamanlarda, tedavi edilmemiş CD'nin insüline bağlı diabetes mellitus, Hashimoto tiroiditi, otoimmün hepatit ve bağ dokusu hastalıkları gibi otoimmün bozukluklara yatkınlık kazandırdığı bildirilmiştir (Ventura ve diğerleri, 1999).



**Şekil 12.** Çölyak hastalığı olan hastalarda ve kontrollerde (C), serum zonulin seviyeleri (A) ve IgG (kare işaretleyiciler) ve IgA (elmas işaretleyiciler), sıkı bağlantı (tight junction) proteinleri zonulin (B), okludin (C), vinkülin (D), aquaporin 4 (E) ve glial fibriler asidik protein ( F). CD: Çölyak hastalığı, GFAP: Glial fibriler asidik protein, AQP4: Akuaporin 4 (Vojdani ve diğerleri, 2017).



**Resim 1.** Çölyak hastalığında zonulin immunohistokimyası fotomikrografları. Zonulinle çapraz reaksiyona giren anti-Zot antikorları ile boyanmış, sağlıklı bir kontrolden ve aktif bir CD hastasından ince bağırsak dokularında gerçekleştirilen immünohistokimyanın fotomikrografları. Zonulin hem enterositler hem de lamina propria (oklar) hücrelerinde görselleştirilmiştir ve aktif CD hastalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında aşırı eksprese edilir (Fasano, 2011).



### **2.4.3. Çölyak Olmayan Glüten Duyarlılığı Hastalığında Zonulinin Rolü**

Çölyak olmayan gluten duyarlılığı (NCGS), klinik olarak CD'ye benzer olan fakat CD'de görülen bağırsak hasarına sahip olmayan yeni tanımlanmış bir durumdur (Volta ve diğerleri, 2013). NCGS'li hastaların, gluten maruziyetini takiben bağırsak geçirgenliğinde artışa sahip olabileceği bildirilmiştir (Hollon ve diğerleri, 2015). Ön kanıtlar ayrıca NCGS'li hastalarda serum zonulin düzeylerinin arttığını öne sürmektedir (Barbaro ve diğerleri, 2015).

### **2.4.4. İrritabl Bağırsak Sendromu Hastalığında Zonulinin Rolü**

İrritabl barsak sendromunun (IBS) gelişmesine yol açan patofizyoloji bilinmemektedir, ancak IBS'li hastaların artmış bağırsak geçirgenliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Camilleri ve Gorman, 2007). Son veriler, ishal ilişkili IBS (IBS-D) olan hastaların artmış serum zonulin seviyelerine sahip olduğunu göstermektedir (Barbaro ve diğerleri, 2015).

### **2.4.5. Çevresel Enteropatide Zonulinin Rolü**

Çevresel enteropati (EE) gelişmekte olan ülkelerde görülen etiyojisi bilinmeyen bir hastalıktır. Proksimal bağırsaktaki enfeksiyöz ajanlara sürekli maruz kalmanın, bağırsak geçirgenliğinin artmasına, makromoleküllerin fazlalığına ve yapısal olarak CD'ye benzeyen bir enteropatiye yol açan kronik inflamasyonu tetikleyen endotoksin trafiğine yol açtığı hipotezi ortaya atılmıştır. CD'de olduğu gibi, enteropati sonuçta engellenmiş büyümeye yol açacak şekilde temel besinlerin emilimini azaltmaktadır (Sturgeon ve Fasano, 2016). Son zamanlarda, EE hastalarında serum zonulin düzeylerinin ve bariyer disfonksiyonunun diğer belirteçlerinin engellenmiş büyümeyle korele olduğu gösterilmiştir (Guerrant ve diğerleri, 2016). Bu veriler, fonksiyonel bir bariyer fonksiyon kaybının, patofizyoloji ve EE'de anahtar rol oynayabileceğine dair ek kanıt sağlamıştır (Sturgeon ve Fasano, 2016).

### **2.4.6. Nekrotizan Enterokolit Hastalığında Zonulinin Rolü**

Nekrotizan enterokolit (NEC), prematüre bebekleri etkileyen, bakteriyel translokasyonla sonuçlanan ve bunun da lokal enfeksiyon, inflamasyon ve sonunda bağırsak bölümlerinde nekroza neden olduğu yıkıcı bir hastalıktır. NEC sırasında TJ protein ekspresyonu ve lokalizasyonundaki değişiklikler çeşitli çalışmalarda tarif edilmiştir (Bergmann ve diğerleri, 2013; Clark ve diğerleri, 2006; Hogberg ve diğerleri, 2013; Rentea

ve diğeri, 2012; Shiou ve diğeri, 2011). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışma, NEC'deki zonulin rolünü kapsamıştır. LPS'ye maruz kalmadan önce Caco2 hücrelerinin Bifidobacterium ile ön tedavisi zonulin salınımını azaltmış ve TJ yeterliliğini korumuştur (Ling ve diğeri, 2016). Ling ve diğeri bu sonuçları NEC'e sahip bir in vivo sıçan modelinde doğrulamak için daha ileri gitmiştir (Ling ve diğeri, 2016). Bu çalışma, mikrobiyomdaki değişikliklerin zonulin salınımını ve daha sonra bağırsak bariyeri fonksiyonunu etkileyebileceği bir modeli vurgulamaktadır (Sturgeon ve Fasano, 2016).

#### **2.4.7. Tip 1 Diyabet Hastalığında Zonulinin Rolü**

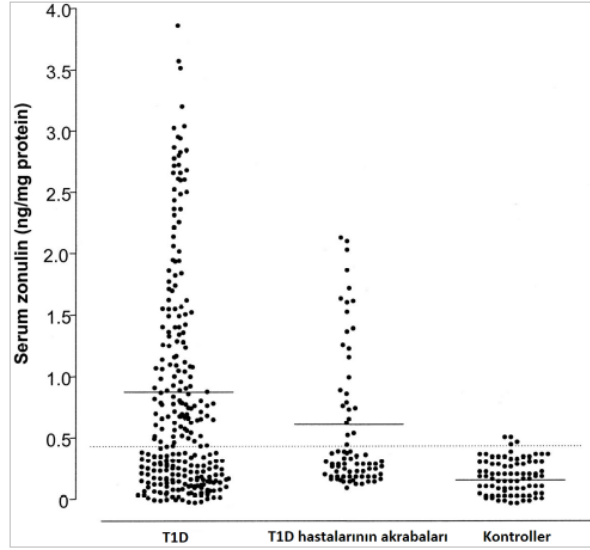
Tip 1 diyabet, pankreasın insülin üreten  $\beta$  hücrelerinin yıkımının neden olduğu bir otoimmün durumdur (Krumbhaar, 1916). T1D'nin tam patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak hem genetik hem de çevresel faktörler oynuyor gibi gözükmektedir. T1D'nin tetikleyicisi keşfedilmemiştir, ancak açık bir nedensel ajan olarak teyit edilmemiş olmasına rağmen birçok olası çevresel faktör incelenmiştir. T1D, çevresel tetikleyicinin bağırsak bariyerini geçmesi ve bağışıklık sistemi ile etkileşmesi gerektiğinden, diğer otoimmün bozukluklara benzer patojenik zorluklara sahiptir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

Bağırsak TJ permeabilitesindeki değişikliklerin, tip 1 diyabetin başlangıcı ile ilişkili erken patofizyolojik değişikliklerden biri olduğu da gösterilmiştir (Fasano ve diğeri, 2000). Bu erken değişiklikler için zonulinin en azından kısmen sorumlu olup olmayacağını belirlemek adına, tip 1 diyabeti belirlenmiş bir fare modeli kullanılmıştır (Fasano ve Uzzau, 1997). İki genetik ırk (yani, BB / Wor diyabete meyilli ve diyabete dirençli fareler), zonulinin intraluminal sekresyonunda ve intestinal permeabilitede önemli değişiklikler gösterip göstermediğini belirlemek için araştırılmıştır. 40 yaşına kadar olan iki grup hayvanda intraluminal zonulin konsantrasyonunda hiçbir fark gözlenmemiştir (Watts ve diğeri, 2000). Daha sonra diyabete eğilimli farelerde intraluminal zonulinde dört kat artış gözlenirken, diyabete dirençli hayvanlarda anlamlı bir artış saptanmamıştır (Watts ve diğeri, 2000). İntرالuminal zonulindeki bu artış: (1) yaşla ilgilidir, (2) sadece ince bağırsakta (yani jejunum ve ileum) saptanabilir fakat kolonda değildir, (3) bağırsağın geçirgenliğinde bir artış ile ilişkilidir, (4) diyabetin başlamasından en az 3-4 hafta öncedir, (5) bu diyabete eğilimli farelerde yüksek kalmayı sürdürür ve (6) tam diyabete doğru ilerleme ile ilişkilidir (Watts ve diğeri, 2000). Bu nedenle bu sonuçlar, zonulinin, bu hayvan modelinde halihazırda açıklanan ve çalışmalarla teyit edilen, erken geçirgenlik

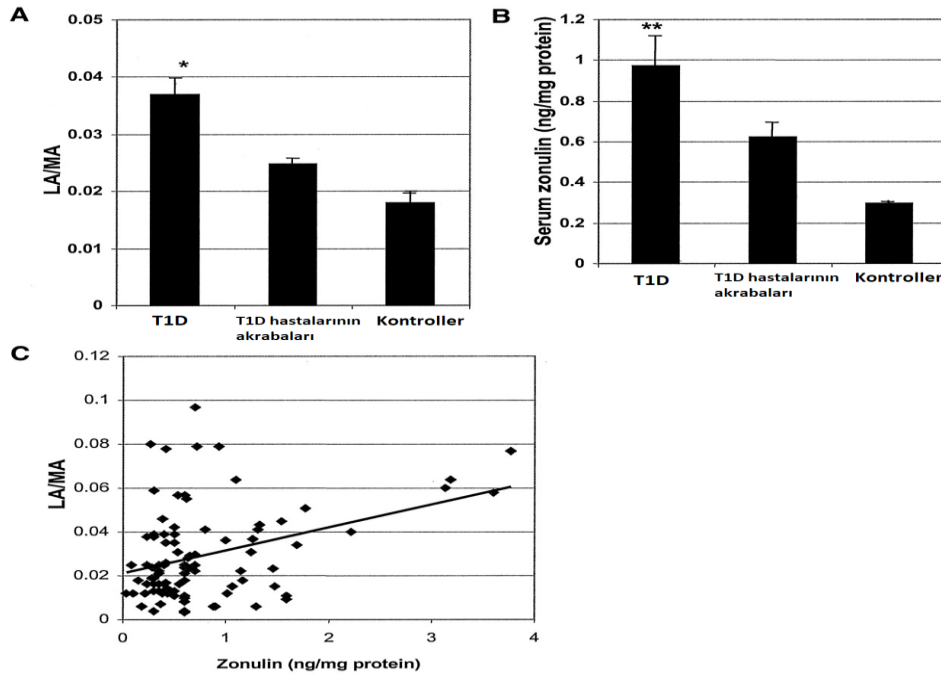
değişikliklerinden (ve dolayısıyla tip 1 diyabetin patojenezinden) sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (Meddings ve diğerleri, 1999).

Gastrointestinal semptomlar T1D hastalarında ortaya çıkacak kadar iyi belgelenmiştir, fakat otonom nöropati kaynaklı sekonder intestinal motiliteye bağlı olduğu düşünülmüştür (Feldman ve Schiller, 1983). Son çalışmalar, bu Gİ semptomlarının ve T1D'nin gelişmesinin başlaması için artmış bağırsak geçirgenliğini tanımlamıştır (Carratu ve diğerleri, 1999; De Magistris ve diğerleri, 1996). Kendiliğinden T1D geliştiren, diyabetik eğilimli biyolojik ıslah (BBDP) sıçanlarda yapılanlar dahil olmak üzere bu çalışmalar, T1D'de bağırsak bariyeri kusurları için olası bir patojenik rol düşündürmektedir. BBDP sıçanları, en az bir ay boyunca glukoz tolerans kaybindan önce gelen ince bağırsakta (fakat kolonda değil) artmış bağırsak geçirgenliğine sahiptirler (Meddings ve diğerleri, 1999). Ek olarak, bariyer fonksiyonunun kaybı sırasında pankreatik adacık hücrelerinin histolojik analizi normaldir (Meddings ve diğerleri, 1999). Bu çalışmalar, bağırsak bariyeri fonksiyonunun kaybının T1D'lerde görülen histolojik hasar veya glikoz tolerans kaybindan önce olduğunu gösterir. Takip eden deneyler bu bulguları doğrulamış ve artmış bağırsak geçirgenliğinin zonulin kaynaklı olduğunu bildirmiştir (Watts ve diğerleri, 2005). Ayrıca, BBDP sıçanlarında zonulin bloke edici AT1001'in (larazotid asetat) ağızdan uygulanması bağırsak bariyer defektini düzeltmiş ve diyabet insidansını azaltmıştır (Watts ve diğerleri, 2005).

BBDP sıçanlarında görülen T1D'deki zonulin ilişkisi, insan üzerindeki çalışmalarda doğrulanmıştır ki bu çalışmalar T1D hastalarının yaklaşık % 50' sinin yükselmiş serum zonulin düzeylerine sahip olduğunu ve bunların bir kısmının bu değişiklikleri hastalığın diyabetik öncesi evresinde gösterdiğini göstermektedir (Sapone ve diğerleri, 2006). İlginç olarak, T1D hastalarının birinci derece akrabalarının bir alt kümesi (yaklaşık % 25) de ayrıca artmış serum zonulin seviyeleri göstermiştir (Sapone ve diğerleri, 2006). Bu veriler, zonulin'in, hastaların bir alt grubunda T1D patojenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sturgeon ve Fasano, 2016).



**Şekil 13.** Tip 1 diyabetik deneklerde (n = 339), birinci derece akrabalarında (n = 89) ve yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol deneklerinde (n = 97) serum zonulin düzeyleri. Tip 1 diyabetik hastalar, akrabalarından ve kontrol deneklerinden daha yüksek serum zonulin düzeyleri göstermiştir (Sapone ve diğerleri, 2006).

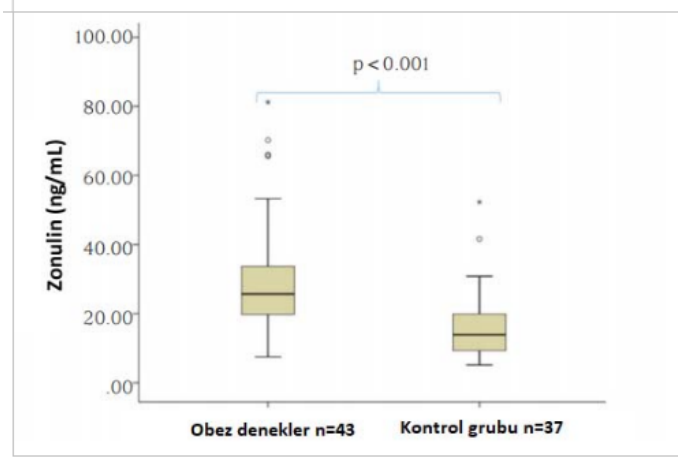


**Şekil 14.** Tip 1 diyabetik hastalarda (n = 36), akrabalarında (n = 56) ve sağlıklı kontrol deneklerinde (n = 43) bağırsak geçirgenliği (A), serum zonulin düzeyleri (B) ve bunların korelasyonları (C). Her iki parametre de tip 1 diyabetik deneklerde, akrabalarına ve kontrol deneklerine göre anlamlı derecede yüksekti. LA / MA ve serum zonulin kayda değer bir korelasyon katsayısı gösterdi. Hem tip 1 diyabetik hastalarda hem de akrabalarında saptanan bağırsak geçirgenliğindeki artış, mannitol saptamasında önemli bir değişiklik olmadan idrarda artmış laktuloz saptaması ile ilişkiliydi. Mannitol transsellüler yolun bir işaretleyicisiyken, laktuloz parasellüler yolun bir işaretleyicisi olduğu için, bu veriler LA / MA'daki gözlenen değişikliklerin, parasellüler yolun geçirgenliğinin arttığını yansıttığını düşündürmektedir. Artmış bağırsak geçirgenliği artmış serum zonulin seviyeleri ile paraleldi ve her iki parametre de tip 1 diyabetik hastalarda akrabalarına göre anlamlı olarak daha yüksekti (Sapone ve diğerleri, 2006).

#### 2.4.8. Obezitede Zonulinin Rolü

Obezitenin son zamanlarda kronik inflamasyon (Olszanecka-Glinianowicz ve diğeri, 2011; Olszanecka-Glinianowicz ve diğeri, 2004; Zahorska-Markiewicz ve diğeri, 2000) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Obezite bir fare modelinde, artan intestinal permeabilite ve makromoleküllerin emilimi gözlenmiştir (Ferraris ve Vinnakota, 1995). Ek olarak, obez hastalar, yüksek kolesterol, tip-2 diyabet (T2D), koroner kalp hastalığı, yüksek tansiyon ve inme gibi obezitelere sekonder komplikasyonlar geliştirme riski altındadır. Üç çalışma, obez ve obez olmayan kişilerde serum zonulin düzeyinin arttığını göstermiştir (Moreno-Navarrete ve diğeri, 2012; Zak-Golab ve diğeri, 2013; Zhang ve diğeri, 2014). Zak-Golab ve arkadaşları total bakteri ve serum zonulin düzeyleri arasında korelasyon göstermiştir. Bağırsak mikrobiyotasının artmış zonulin seviyelerine neden olabileceğini ve bunun ardından endotoksine karşı gelişen (lipopolisakkarit - LPS) anormal bağırsak geçirgenliğine ve sonuç olarak obezitede görülen mikroinflamasyona neden olabileceğini ileri sürmektedirler (Zak-Golab ve diğeri, 2013).

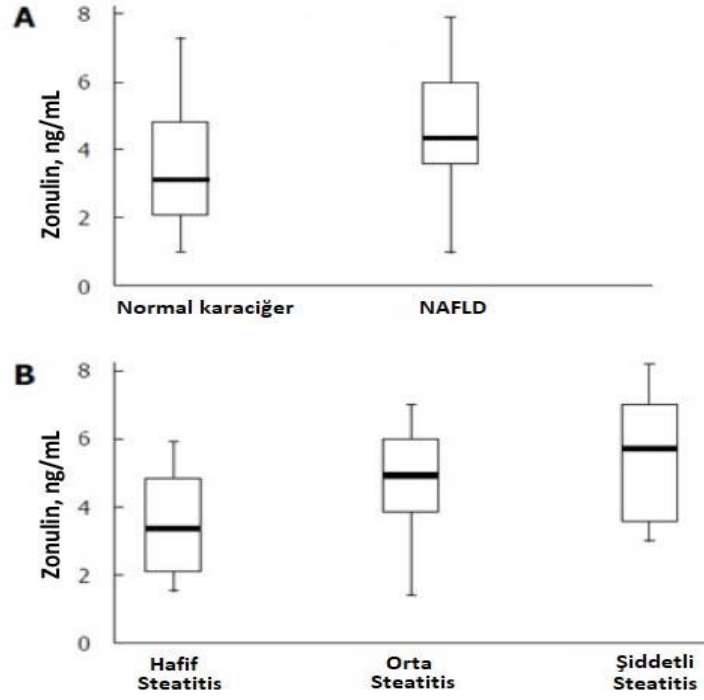
Ayrıca, zonulin'in sadece obezite ile ilişkili olmadığı, aynı zamanda metabolik komplikasyonları ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar sağlanmıştır. Serum zonulin'in T2D hastalarında artmış olduğu gösterilmiştir ve çok değişkenli analiz aracılığıyla insülin duyarlılığı ile serum zonulin arasındaki ilişkinin IL-6 ile modüle edilebileceği ileri sürülmüştür (Jayashree ve diğeri, 2014; Moreno-Navarrete ve diğeri, 2012; Zhang ve diğeri, 2014). Zonulin promoterinin IL-6 kontrolü altında olduğunu (Oliviero ve Cortese, 1989) ve bu nedenle, IL-6 tarafından zonulin modülasyonunun, ekspresyonu ile mekanik olarak ilişkili olabileceğini not etmek ilginçtir. Buna ek olarak, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan (NAFLD) obez çocuklarda, NAFLD olmayan obez çocuklarla karşılaştırıldığında, serum zonulin artmıştır ve steatozun şiddeti ile bağlantılıdır (Pacifico ve diğeri, 2014).



**Şekil 15.** Obez denekler ve sağlıklı kontrol grubu serum zonulin ölçüm oranları (Küme ve diğerleri, 2017).

#### 2.4.9. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Zonulinin Rolü

Son zamanlarda, bir takım kanıt bağırsak florası ile karaciğer arasında güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Compare ve diğerleri, 2012; Duseja ve Chawla, 2014; Vajro ve diğerleri, 2013). Anatomik pozisyonundan dolayı, karaciğer kan akımının % 70'ini portal damar yoluyla bağırsaktan alır ve bu nedenle bağırsaktan türetilen antijenlere karşı ilk savunma hattıdır ve bakteri ile bakteri ürünleri gibi bağırsaktan türetilen toksik faktörlere en çok maruz kalan organlardan biridir (Compare ve diğerleri, 2012). Bağırsak epitelyumu, bağırsaktaki mikropların konakçı bağışıklık sisteminden ayrılmasında merkezi bir rol oynar. Bağırsak epitel hücreleri, bağırsak bariyerinin bütünlüğünü korumada önemli bir rol oynayan sıkı bağlantılarla (tight junctions) birbirine bağlanır. NAFLD hastalarında SIBO oluşumu ve “sızıntılı” TJ nedeniyle artan bağırsak geçirgenliği bildirilmiştir (Duseja ve Chawla, 2014; Miele ve diğerleri, 2009). Miele ve arkadaşları, biyopsi ile kanıtlanmış NAFLD'li 35 yetişkin hastada sağlıklı deneklere kıyasla artmış bağırsak geçirgenliği ve TJ değişiklikleri göstermiştir (Miele ve diğerleri, 2009). Ayrıca hem bağırsak geçirgenliği hem de SIBO prevalansı steatozun şiddeti ile korelasyon göstermişti, ancak NASH varlığı ile ilişkili değildi. Biyopsi ile kanıtlanmış NAFLD'lu çocukları içeren başka bir çalışmada, zonulin düzeyleri ile steatoz şiddeti arasında pozitif bir korelasyon bulundu, ancak NASH, lobüler inflamasyon veya fibrozis skoru ile ilişkili değildi (Pacifico ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, halihazırda çocuklarda ve daha önce yetişkinlerde gösterildiği gibi bağırsak geçirgenliği ile steatohepatit veya fibrozis arasındaki ilişki eksikliği, basit steatoz ve NASH'in farklı olduğu ve birbiriyle ilişkili hastalıklar olmadığını öne süren son teori ile uyuşabilir (Tilg ve Moschen, 2010).



**Şekil 16.** Obez çocuklar için zonulin seviyeleri. (A) Non Alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan ve olmayan obez çocuklar için zonulin seviyeleri (NAFLD). (B) Steatozun şiddetine göre (hafif 10; orta 17; şiddetli 13 hasta) NAFLD'li obez çocuklar için zonulin seviyeleri (Pacifico ve diğerleri, 2014).

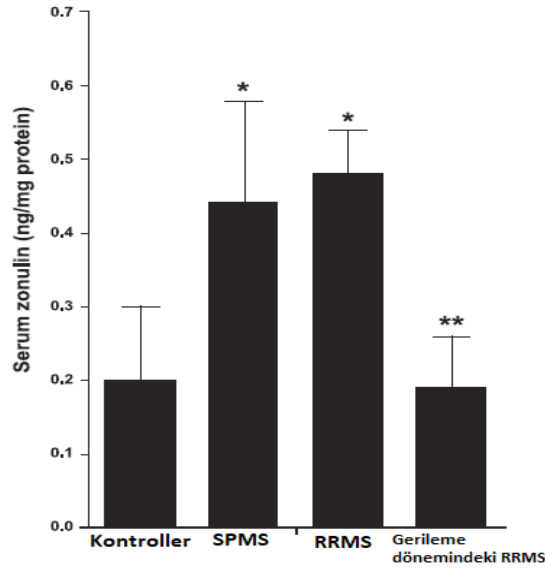
#### 2.4.10. Multipl Skleroz Hastalığında Zonulinin Rolü

Multipl skleroz (MS) hastaları, hem kan-beyin bariyerinde (BBB) hem de bağırsakta artmış geçirgenlik göstermektedir. İlginç olarak, progresif MS'li hastalar artmış serum zonulin düzeyleri gösterirken, hastalığın gerileme devresinde olan nüks eden-iyileşen MS'li hastalarda serum zonulin düzeyleri kontrollere benzerdir (Fasano, 2011). MS'un deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) fare modeline odaklanan bir çalışma, zonulinin MS'da nasıl rol oynadığını daha ayrıntılı olarak açıklamıştır (Nouri ve diğerleri, 2014). Bağırsak geçirgenliği ve intestinal zonulin, nörolojik semptomların ön-klinik fazı sırasında artar ve bu durum, hastalık gelişiminde zonulin için bir rol önerir (Nouri ve diğerleri, 2014).

Kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde bir artışa ek olarak, multipl skleroz (MS) hastaları da ayrıca bağırsak TJ'nin geçirgenliğinde artış tecrübe edebilir (Correale ve Villa, 2007; Morgan ve diğerleri, 2007). Yacyshyn ve arkadaşları, çalışılan MS hastalarının ~% 25' inin bağırsak geçirgenliğinin arttığını göstermiştir (Yacyshyn ve diğerleri, 1996). MS ve Crohn hastalığı hastalarının her ikisinin de, antijen maruziyetinin bir göstergesi olan CD45RO sergileyen artan sayıda periferik B hücresi göstermesi, önceden var olan, genetik olarak tanımlanmış ince bağırsak geçirgenliği anormallikleri ve bu hastalıklarda patojenik bir

faktör olarak yaygın olan değişmiş antijen sunumu konseptini destekler (Fasano, 2011; Yacyshyn ve Meddings, 1995; Yacyshyn ve diğerleri, 1996).

Bir araştırmada, nükseden-hafifleyen MS'a karşı (RRMS) sekonder ilerleyici MS (SPMS) ve periferik dolaşıma zonulin ekspresyonunun bu iki grubu ayırt edip edemeyeceğini tespit etme faaliyetleri yapılarak bu hipoteze meydan okumak için, farklı alt tiplere sahip MS hastalarında serum zonulin düzeyleri ölçülmüştür: RRMS'li 44 hastanın (30 nüks ve 14 gerileme döneminde), 18 SPMS hastasının ve 171 kontrolün serumları incelenmiştir. MS hastalarının ortalama yaşı 35 idi ve hastaların % 65' i kadındı. Tüm hastalara nörolojik muayene ve kontrastlı beyin MRI yapıldı. Nükseden RRMS veya SPMS'li hastaların yaklaşık % 29'unda serum zonulin düzeyleri artmıştı (Yacyshyn ve arkadaşları tarafından bildirilen MS hastalarında artmış bağırsak geçirgenliğine benzer bir yüzde), toplam ortalama serum seviyeleri kontrollere kıyasla ~2.0 kat daha yüksekti (Yacyshyn ve diğerleri, 1996). İlginç bir şekilde gerileme dönemindeki RRMS'li hastalar, kontrollerle kıyaslanabilir serum zonulin seviyeleri göstermiştir. Sadece RRMS'li hastalarda, en yüksek serum zonulin seviyeleri vardı (Fasano, 2011).



**Şekil 17.** Farklı MS türlerinden etkilenen kişilerde serum zonulin seviyeleri. Serum zonulin düzeyleri, farklı alt tiplerden etkilenen MS deneklerde değerlendirildi: Hastalığın şiddetlenmesi sırasında nükseden-hafifleyen (RRMS) (n=30), gerileme dönemindeki RRMS (n=14), sekonder progresif (SPMS) (n=18) ve sağlıklı kontroller (n=171). Bu veriler kısmen Amerikan Nöroloji Akademisi 2004 yıllık toplantısında sunulmuştur (Fasano, 2011).

#### 2.4.11. Polikistik Over Sendromunda Zonulinin Rolü

Polikistik over sendromu (PCOS), yükselen androjen düzeylerine bağlı olarak üreme çağındaki kadınlarda gelişen bir endokrinopatidir. Hem genetik yapının hem de çevrenin



PCOS gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Diamanti-Kandarakis ve diğerleri, 2006). PCOS'lu kadınların çoğunluğu aşırı kilolu ve insüline dirençlidir. PCOS'un kronik bir iltihap durumu ile karakterize olduğu iyi tanımlanmıştır (Sturgeon ve Fasano, 2016). Çalışmalar, PCOS gelişimi için bağırsak mikrobiyota ile birlikte anahtar patojenik elementler olarak, değişmiş bağırsak geçirgenliğine bağlı artmış zonulini önermiştir (Zhang ve diğerleri, 2015).

#### **2.4.12. Akut Akciğer Hasarında Zonulinin Rolü**

Akut akciğer hasarı (ALI) ve akut respiratuvar distres sendromunda plazma içeriğinin akciğerlere sızması gözlenir (Ware ve Matthay, 2000). Zonulin, ALI'de akciğer sıkı bağlantılarının parçalara ayrılmasında rol oynamaktadır (Rittirsch ve diğerleri, 2013). Zonulin yolunun AT-1001 veya zonulin nötralize edici antikorlarla bloke edilmesi, ALI'nin şiddetini azaltmıştır (Rittirsch ve diğerleri, 2013). Ek olarak hem zonulin hem de agonist peptidi, AT-1002, ALI'yi ve artmış akciğer geçirgenliğini şiddetlendirmiştir. Mekanizmanın akciğerde zonulin bağımlı komplement aktivasyonu aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Rittirsch ve diğerleri, 2013).

#### **2.4.13. Astım Hastalığında Zonulinin Rolü**

Astım, hava akımı tıkanıklığı, hava yolu aşırı duyarlılığı ve inflamasyon ile karakterize karmaşık bir klinik sendromdur. Hava yolu inflamasyonunun ve hava yolu işlevindeki değişikliklerin korunduğu mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır (Fasano, 2011). Hırıltı, bazı astımlı çocuklarda gıda zorlukları ile de tetiklenebildiğinden, astımlıların bağırsak geçirgenliğinin artması çevresel alerjenlere duyarlılıkta rol oynayabilir (Benard ve diğerleri, 1996; Hijazi ve diğerleri, 2004; Knutson ve diğerleri, 1996).

Akciğer geçirgenliğinde artışa ek olarak, bağırsak geçirgenliği de astım gibi diğer akciğer hastalıklarında rol oynamaktadır (Benard ve diğerleri, 1996; Hijazi ve diğerleri, 2004). Ön veriler, astımlı hastaların bir alt kümesinin artmış serum zonulin düzeylerine sahip olduğunu ve yaklaşık % 40' ının bağırsak geçirgenliğinin arttığını ileri sürmektedir (Fasano A, 2011). Bu veriler hem akciğer hem de bağırsak mukozasının, spesifik antijenlerin submukozaya erişebildiği yollar olabileceğini ve takip eden bağışıklık sistemine sunumuyla akciğerin inflamasyonuna yol açabileceğini düşündürmektedir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

#### **2.4.14. Koroner Arter Hastalığında Zonulinin Rolü**

Koroner arter hastalığı (CAD) dünya çapında büyük bir ölüm nedenidir. Birçok çalışma, bulaşıcı patojenler ve CAD arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Eurich ve diğerleri, 2012; Neumann ve diğerleri, 2011; Vcev ve diğerleri, 2007). Ek olarak aterosklerotik plak biyopsilerinde enterobakteri tespit edilmiştir. CAD hastalarının kanlarında artmış serum zonulin seviyelerinin ve yüksek düzeyde Enterobacteriaceae familyası üyesi olan bakterilerin olduğu gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2016). Bu veriler, zonulin bağımlı bakteriyel translokasyonun bakterilerin dolaşımdaki artmış seviyelerine neden olabileceğini ve bunu takiben CAD'a neden olan aterosklerotik plağın başlangıcına neden olabileceğini düşündürmektedir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

#### **2.4.15. Nörolojik bozukluklarda Zonulinin Rolü**

Daha önce zonulin yolunun sadece bağırsakta değil, hava yolları ve kan-beyin bariyeri dahil olmak üzere diğer epitelyal ve endotel bölgelerde de etkili olduğunu bildirilmiştir (Karyekar ve diğerleri, 2003; Lu ve diğerleri, 2000; Marino ve diğerleri, 1999; Marino ve diğerleri, 2003; Menon ve diğerleri, 2005; Rossi ve diğerleri, 2002).

BBB endotelyal hücreler tarafından oluşturulur ve dolaşımdaki kanı beyinden ayırır. Zonulin ayrıca endotelyal sıkı bağlantıları da modüle edebileceğinden, nörolojik bozuklukların patogeneğinde zonulin düzensizliğinin rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Sturgeon ve Fasano, 2016). Zonulinin beyin tümörleri, özellikle gliomalara dahil olduğu gösterilmiştir (Diaz-Coranguez ve diğerleri, 2013; Skardelly ve diğerleri, 2009). Bir glioma hücre sınırı üzerinde yapılan in vitro çalışmalar, glioma olmayan kontrol hücrelerine kıyasla zonulinin yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir (Diaz-Coranguez ve diğerleri, 2013). Ek olarak, zonulinin, BBB boyunca nöronal progenitör hücrelerin transmigrasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Diaz-Coranguez ve diğerleri, 2013).

Yaygın dağılımı ve işlevi nedeniyle, zonulin yolunun düzensizliğinin, malign dönüşüm ve metastaz dahil, hücre içi iletişimi içeren hastalık durumlarına katkıda bulunabileceği hipotezi ortaya koyuldu (Fasano, 2011). Bu teori son zamanlarda Skardelly ve arkadaşları tarafından gliomlarda zonulin ekspresyonunda bir artış rapor edilerek doğrulanmıştır (Skardelly ve diğerleri, 2009). Skardelly ve arkadaşları gliomalarda, BBB'nin malignite ve degradasyon derecesi ile korele olan, zonulinin artmış ekspresyonunun bulunduğunu göstermiştir (Skardelly ve diğerleri, 2009). Yazarlar,

gliomaların bir kanser ve dejenerasyon markeri olan c-kit'in artan ekspresyonunun, zonulin ekspresyonunda bir artış ile ilişkili olduğunu ve her ikisinin de insan beyin kanserlerinin malignite derecesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Skardelly ve diğerleri, 2009). Zonulin ekspresyonu ayrıca neoplastik ciddiyetine paralel olarak kan-beyin bariyerinin bozulmasıyla da ilişkilidir (Skardelly ve diğerleri, 2009).

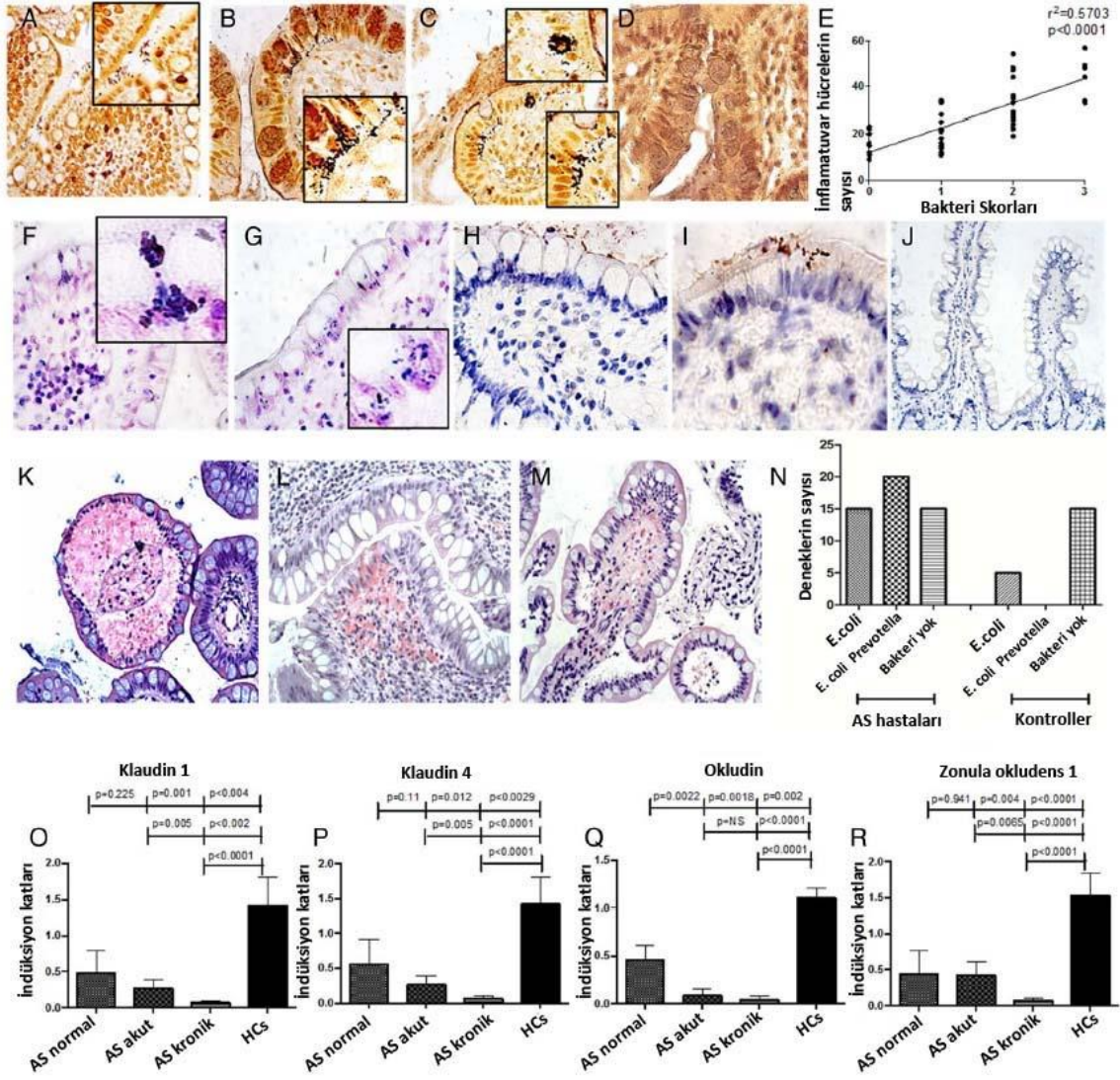
#### **2.4.16. HIV Hastalığında Zonulinin Rolü**

İnsan bağışıklık yetmezliği virüsünün (HIV) immünopatogenezinde bağırsağın tamamlayıcı bir rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Deeks ve diğerleri, 2013; Sandler ve diğerleri, 2011; Tenorio ve diğerleri, 2014). İlginç bir şekilde, zonulin düzeylerinin azalmasının HIV hastalarında artan mortalite ile korele olduğu bildirilmiştir (Hunt ve diğerleri, 2014). Ek olarak, HIV tedavisi ilaçlarıyla tedavi, maravirok ve raltegravir (CCR5 reseptör antagonisti ve integrin inhibitörü), serum zonulin düzeylerini arttırmaktadır (Serrano-Villar ve diğerleri, 2016). Kombine edildiğinde, bu veriler, doğuştan gelen immunité fonksiyonuyla zonulin yolunun, HIV enfeksiyonuna karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

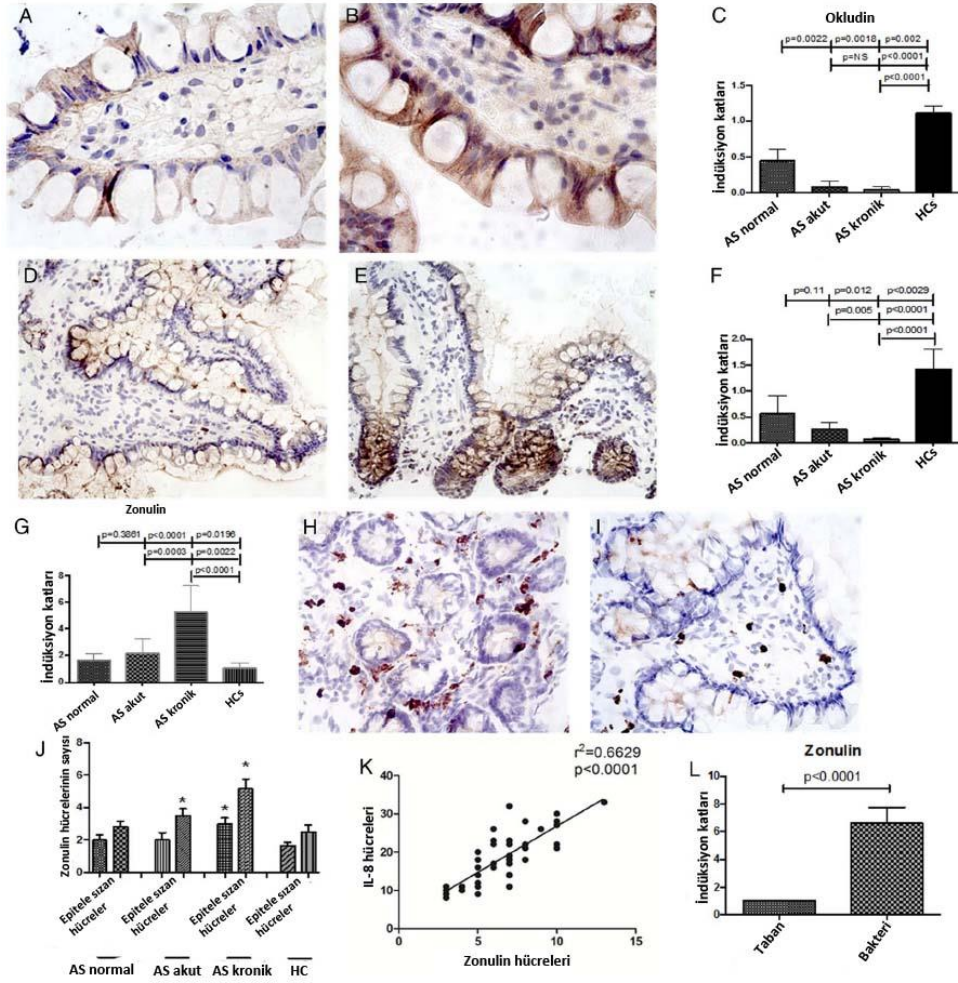
#### **2.4.17. Ankilozan Spondilitte Zonulinin Rolü**

Son zamanlarda ankilozan spondilitli (AS) hastaların terminal ileumunda subklinik bağırsak iltihabı varlığı ile birlikte disbiyoz gösterilmiştir. AS'li hastaların bağırsaklarında, bağırsak iltihabı ile kayda değer korelasyon gösteren bakteriyel skorlarla, yapışkan ve invaziv bakteriler gözlenmiştir. Bağırsak vasküler bariyerinde (GVB) bozulma AS'de ayrıca mevcuttu, zonulinin önemli ölçüde yukarı doğru düzenlenmesi eşlik edecek şekilde, yüksek serum LPS, LPS-BP, iFABP ve zonulin seviyeleri ile ilişkiliydi (Ciccia ve diğerleri, 2016).

Bakteriyel ileit, artmış zonulin ekspresyonu ve hasarlanmış bağırsak mukozal bariyeri ve GVB, AS'li hastaların bağırsağını karakterize eder ve artmış kan zonulin seviyeleri ve bakteri ürünleri ile ilişkilidir. Bakteri ürünleri ve zonulin, monosit davranışını etkiler (Ciccia ve diğerleri, 2016).



**Şekil 18.** (A-D) Ankilozan spondilit (AS) hastalarının ileumunda invaziv ve yapışkan bakteriler bulunur ve sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin değişimleri ile ilişkilidir. AS'de olan ancak kontrol grubunda olmayan (D), yapışkan (A) ve invaziv (B ve C) bakterileri gösteren temsili mikrofotografılar. (E) Bakteri skorları, sızan mononükleer hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkilidir. (F-G) İstilacı gram pozitif bakterilerin varlığını gösteren AS'li hastalarda gram boyamasını gösteren temsili görüntüler. (H-J) AS (H ve I) ve kontrol (J) hastalarında lipopolisakarit (LPS) için immünohistokimiyayı gösteren temsili görüntüler. (K-M) Histolojik değişiklikler, hemoraji (K ve L) ve epitelyumun bazal membrandan ayrılması gibi (M), bakterilerin varlığı ile ilişkilidir. (N) İzole bakteri kültürleri esas olarak *Escherichia coli* ve *Prevotella* spp.'yi göstermiştir. (O – R) Klaudin 1 (O), klaudin 4 (P), okludin (Q) ve zonula okludens 1'in (R) göreceli m-RNA seviyeleri, tüm hastalar ve tüm kontrollerden elde edilen ileal numunelerde kantitatif real-time (RT) -PCR ile değerlendirilmiştir (Ciccia ve diğerleri, 2016).



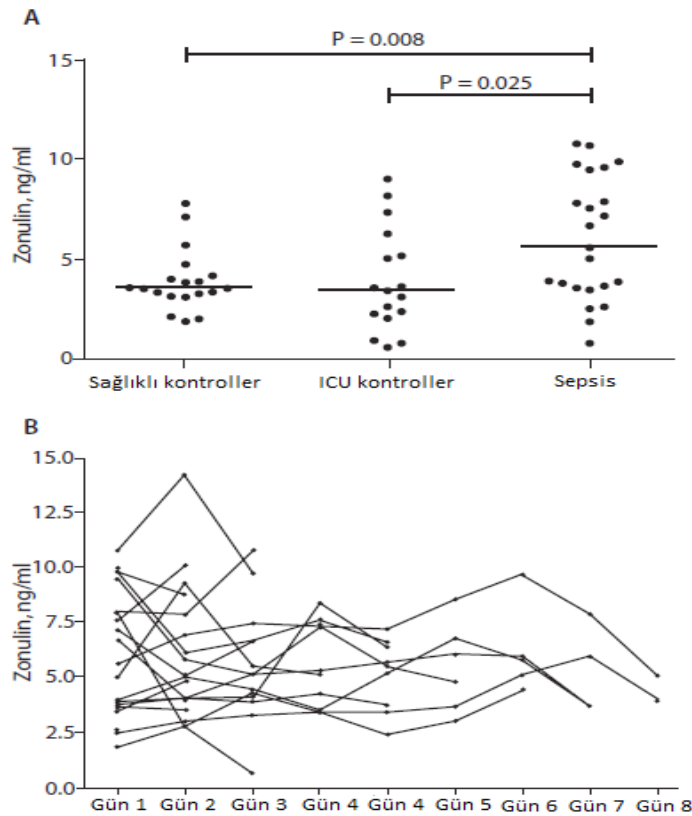
**Şekil 19.** Ankilozan spondiliti (AS) olan hastalarda okludin, kludin 4 ve zonulin 1 doku ekspresyonu değişmiştir ve bağırsak bakterileri tarafından modüle edilir. (A ve B) AS hastalarının (A) ve kontrol grubunun (B) bağırsağında okludin ekspresyonunu gösteren temsili görüntüleme. (C) AS ile karşılaştırıldığında sağlıklı kontrollerde daha fazla sayıda okludin pozitif hücre gözlenmiştir. (D ve E) AS hastalarının (D) ve kontrol grubunun (E) bağırsaklarında kludin 4 ekspresyonunu gösteren temsili görüntüleme. (F) AS ile karşılaştırıldığında sağlıklı kontrollerde daha fazla sayıda kludin 4 pozitif hücre gözlenmiştir. (G) Zonulin 1'in göreceli m-RNA seviyeleri, AS ve sağlıklı kontrol grubu tüm deneklerden elde edilen ileal numunelerde gerçek zamanlı (RT) -PCR ile değerlendirilmiştir. (H ve I) AS hastalarının (H) ve kontrol grubunun (I) bağırsaklarında zonulin 1 ekspresyonunu gösteren temsili görüntüleme. (J) Tüm hastaların ve kontrol grubunun ileal biyopsilerinde zonulin 1 pozitif hücrelerin miktarı ölçülmüş ve AS'li hastalarda daha fazla sayıda zonulin 1 pozitif hücre bulunduğu gösterilmiştir. (K) Zonulin pozitif hücre sayısı, IL-8 pozitif hücre sayısı ile kayda değer şekilde ve doğrudan ilişkilidir. (L) Caco-2 hücreleri, AS'li beş hastadan elde edilen ileal biyopsilerden izole edilen bakteriler ile inkübe edildi ve zonulin ekspresyonunun modülasyonu RT-PCR ile değerlendirildi (Ciccia ve ark, 2016)

#### 2.4.18. Sepsiste Zonulinin Rolü

İntestinal bariyer disfonksiyonu septisemi patogenezinde ve progresyonunda rol oynamaktadır. Yoseph ve arkadaşları bir deneysel sepsis modelinde TJ proteinlerinin ekspresyonunun değiştiğini göstermişlerdir (Yoseph ve diğerleri, 2016). Septisemi olan hastalarda serum zonulin düzeylerinin arttığı bulunmuştur (Klaus ve diğerleri, 2013).

Cerrahi teknikler ve perioperatif bakımdaki ilerlemelere rağmen cerrahi sonrası septisemi yaygın bir komplikasyondur. Zonulin'in cerrahi sonrası septisemide anahtar bir iştirakçi olabileceği hipotezi öne sürülmüştür (Liu ve diğerleri, 2015). Liu ve arkadaşları probiyotiklerle yapılan tedavilerin ameliyat sonrası septisemiye nasıl azaltılabileceğini ve azalmış serum zonulin düzeyleri ile korele olduğunu tanımlamıştır (Liu ve diğerleri, 2015). Bu veriler, zonulinin enterositlerden daha fazla salınmasının, epitelyum boyunca bakterilerin göçüne yol açtığını ve bunun da septisemiye yol açabileceğini göstermektedir (Sturgeon ve Fasano, 2016).

Klaus ve arkadaşları (2013) sepsisi olan 25 hasta, 18 septik olmayan cerrahi sonrası yoğun bakım ünitesi hastası ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı gönüllüyle yaptıkları çalışmada, sepsis sırasında sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek plazma zonulin seviyeleri için kanıt sağlamışlardır. Çalışmanın verilerine göre artan zonulin, sepsis sırasında gözlenen artmış bağırsak geçirgenliği için ek bir mekanizma görevi görebilir (Klaus ve diğerleri, 2013).



**Şekil 20.** (Panel A) Sağlıklı gönüllülerde (Sağlıklı Kontrol), septik olmayan hastalarda (ICU Kontrolü) ve septik hastalarda (Sepsis) plazma zonulin konsantrasyonları (Panel B), septik hastalarda plazma zonulin konsantrasyonlarının zaman akışı. Çalışma süresi boyunca önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Klaus ve diğerleri, 2013).

## 2.5. Zonulin Sisteminin Terapötik Kullanımı

Şu anda ilaç verilmesi için test edilen TJ modülatörlerinin sınırları göz önünde bulundurulduğunda, zonulin sistemi üzerindeki temel araştırmalardan elde edilen bulguların, intersellüler TJ'lerin regülasyonu yoluyla ilaç emiliminin arttırılmasına yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesine uygulanıp uygulanamayacağını araştırmak mantıklıdır ((Fasano, 1998; Fasano, 2001). Bugüne kadar, zonulinin ana kaynağı, insan kadavralarından biyokimyasal saflaştırmadır. Bu nedenle Zot, ilaç verme için zonulin sisteminden yararlanmak adına geçerli bir alternatif olarak kullanılmıştır, çünkü her iki protein de, zonulin reseptörüne bağlanmak için aynı bağlanma motifini paylaşır ve bu nedenle de hücre içi TJ'lerin modülasyonuna yol açan, aynı hücre içi sinyalleme aktif ederler (Di Pierro ve diğerleri, 2000; Fasano ve diğerleri, 1991; Fasano ve diğerleri, 1995; Fasano ve diğerleri, 1997; Fasano ve Uzzau, 1997; Wang ve diğerleri, 2000).

*Zonula okludens toksinin (Zot)* bir bağırsak emilim arttırıcı olarak etkinliğini sağlamak için, oral yoldan verilecek ilaçlar olarak insülin ve immünoglobulin G seçilmiştir. Bu seçim, bu proteinlerin nispeten büyüklüğü, yapısı, biyolojik aktiviteleri ve terapötik uygunluğuna dayanmaktadır. Tavşan ileumunda yapılan in vitro deneyler, Zot'un zamana bağlı bir şekilde hem insülinin (% 72' sinde) hem de immünoglobulin G'nin (% 52'sinde) intestinal emilimini geri dönüşümlü olarak arttırdığını göstermiştir (Fasano ve Uzzau, 1997). Tavşan, in vivo perfüzyon deneyi kullanılarak test edildiğinde, Zot hem jejunum hem de distal ileumda insülin geçişini 10 kat arttırırken, kolonda önemli değişiklikler gözlenmemiştir (Fasano ve Uzzau, 1997).

*Zonula okludens toksin* ile birlikte enterik uygulanmasından sonra insülinin biyoaktivitesini değerlendirmek için, hormon akut tip 1 diyabetli erkek farelere Zotla birlikte veya birlikte olmayarak oral olarak uygulanmış ve farelerin kan glikoz seviyeleri seri olarak ölçülmüştür. Tek başına insülin oral yoldan verildikten sonra, 5–30 uluslararası ünite (IU) dozlarında verildiğinde, tedavi edilen hayvanların kan şekeri düzeyleri önemli ölçüde azaltılmamıştır (Fasano ve Uzzau, 1997). Buna karşılık, insülin (10 IU kadar düşük dozlarda) oral olarak Zot ile birlikte uygulandığında, kan glukoz konsantrasyonunda önemli bir azalma gözlenmiştir (Fasano ve Uzzau, 1997). Bu azalma, subkutan olarak uygulanan (1.2-2.4 IU oranlarında) geleneksel insülin dozunda görülenle karşılaştırılabilir; kan şekeri seviyeleri uygulamadan sonra altı saat içinde normale döndü. Zot ile kombinasyon halinde insülin ile tedavi edilen hayvanların hiçbirinde diyare, ateş veya diğer sistemik semptomlar

görülmemiştir ve histolojik muayenede ince bağırsakta yapısal değişiklikler gösterilmemiştir (Fasano ve Uzzau, 1997).

Hem *in vitro* hem de *in vivo* deneyler, zonulin sisteminin primatlarda da etkili olduğunu göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2000). Benzer şekilde, Zot, maymunda hem jejunum hem de ileumda, zamana bağlı bir şekilde tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında insülinin intestinal absorpsiyonunu arttırmıştır (Watts ve diğerleri, 2000).

*Zonula okludens toksin* ayrıca bir diyabet mellitus *in vivo* primat modelinde test edilmiştir. İnsülin, diyabetik maymunlara tek başına veya artan miktarlarda Zot ile kombinasyon halinde intragastrik olarak uygulanmıştır. Zot ve insülinin oral olarak birlikte uygulanması, doza bağımlı bir şekilde kan glikoz seviyelerini düşürmüştür. Kan insülin düzeylerinin ölçümleri, insülin biyoyararlanımının kontrollerde % 5.4' ten % 10.7' ye ve % 18' e sırasıyla Zot 2 µg / kg ve 4 µg / kg'a eşzamanlı olarak yükseldiğini ortaya çıkarmıştır (Watts ve diğerleri, 2000). Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar, zonulin sisteminin nüfuz etkisinin primatlarda da oluştuğunu ve bu sistemin kinetik ve bölgesel etkilerinin tavşan modelinde gözlemlenenlere benzer olduğunu göstermektedir (Fasano, 2001).

Zonulin sisteminin keşfi, hücreler arası TJ'lerin karmaşık patofizyolojik düzenlemesine ışık tutmuştur, ancak hala tamamen ele alınmaktan uzakta kalmaktadır. Zonulin'in ince bağırsağın hücreler arası TJ'lerinin fizyolojik düzenlenmesinde yer alması akla yatkındır. Bu kavramsal zonulin modelinin düzensizliği, otoimmün hastalığa (yani, CD ve tip 1 diyabet) yol açan gelişimsel ve bağırsak kaynaklı bozukluklar, doku iltihabı, malign transformasyon ve metastaz dahil olmak üzere düzensiz interselüler iletişimi içeren hastalık durumlarına katkıda bulunabilir. Aynı sistem, şu anda rekombinant DNA teknikleriyle tasarlanan veya insan genomu projesi yoluyla elde edilebilecek olan makromoleküllerin ve ilaçların hedeflenen dokuya özel olarak teslimi fırsatını sunabilir (Fasano, 2001).



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

Genel bilgilerde de belirtildiği gibi köpeklerde ishal farklı yaş gruplarında yaygın olarak seyretmekte ve kliniklerimizde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Aynı durum bulaş kaynağı olan etmenler için de söz konusudur. Diğer taraftan viral, bakteriyel ya da paraziter hastalıklarda sızıntılı bağırsağın patofizyolojisinin ortaya çıkarılması ve erken hasarın ortaya konulması hastalıkların prognozu açısından önem taşımakta ve alanında bir ilke öncülük etmektedir. Köpeklerde yapılan bu çalışmanın benzer patofizyolojiyle seyreden farklı hastalıklarda beşeri alana ışık tutacağı aşıkardır. Çalışmada kullanılacak hasta hayvanlardan I. grup 9 adet Giardiazisli, II. grup 9 adet Coronavirüslü, III. grup 9 adet Distemperli, IV. grup 9 adet Parvoviruslu, V. grup 9 adet noninfeksiyöz ishallerli hayvan içermekte ve VI. grup 9 adet sağlıklı kontrolden oluşmaktadır. Canlı hayvan kullanma gerekçesi, çalışmanın amacıyla uygun olarak tez çalışması kapsamında yaşayan hayvanlarda hastalık/sağlık aktivitesindeki değişimin ilgili biyobelirteçlerle saptanmış olmasıdır.

#### 3.1.1. Cihazlar

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda bulunan, buzdolabı/derin dondurucu (Bosch KSU40631NE), santrifüj (LC-04B), hemogram cihazı (Mindray BC5000), biyokimya cihazı (Fusifilm NX500i), biyolojik güvenlik dolapları, buzdolapları (4 °C, -20 °C, -86 °C), makas, cımbız, pense vb. gereçler, santrifüj tüpü (1.5 ml, 5 ml vb. kapasiteli), tek kullanımlık uçlar (0.5-10µl-20µl, 20-200µl, 200-1000µl aralığında) kullanılmıştır.

#### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Saf su veya distile su, EDTA, heparin.

### 3.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmaya Tablo 1’ de belirtilen farklı etiyolojik sebeplere ilişkin olarak hasta olan ve sağlıklı kontrol denekleri de dahil olmak üzere toplam 54 adet hayvan dahil edilmiştir. İshalli köpekler farklı hastalıklara ilişkin olarak 5 gruba dağıtılmıştır. Bu amaçla grup sayılarının eşit olmasına özen gösterilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubu CME ve/veya diğer vektör kaynaklı hastalıklardan arı olduğu belirlenen, sağlıklı ve aşılı köpekler arasından seçilen 9 köpekten oluşmuştur.

İshale neden olan hastalıkların sızıntılı bağırsak ile ilişkisine dair çalışmaların köpeklerde azlığı da göz önüne alınarak, ön değerlendirmeye tabi tutulan hasta köpekler ve sağlıklı kontrol grubu arasından 54 adedi (kliniklere getirildiği tarihteki yaş durumları göz önüne alınarak) farklı, ırk, yaş ve her iki cinsiyetten teşekkül etmiştir.

### 3.2. Yöntem

Bu çalışma kapsamında hemorajik ya da non-hemorajik gastroenteritis saptanan köpekler değerlendirilmiştir. En az 1 gündür süregelen ishal anamnezi ile kliniğe getirilen farklı yaş, ırk ve her iki cinsiyetten en az 54 olgu, klinik laboratuvar analizleri doğrultusunda etiyolojik sınıflandırmaya tabi tutulmuş (tablo 1), her olgudan *Vena cephalica antebrachii*’den anikoagülantsız tüplere 2’ şer ml kan alınmış, ardından santrifüje edilerek ELISA ile serum zonulin testi uygulanmıştır. Kan alma tüplerinin pirojen ve endotoksin içermediğine ve ekstrakte edilmiş serum ve plazma örneklerinin hemoliz ve hiperlipidemi içermemesine dikkat edilmiştir. Test için örnekler -80 derecede saklanmış, sonuçlara yönelik olarak tüm analizler akredite laboratuvarlardan birinde yapılmıştır. Aynı şekilde olgulardan steril svaplar aracılığıyla fekal örnekler alınmış ve örnekler % 70’ lik etanol içerisine konularak ELISA yöntemiyle fekal zonulin testi uygulanmaya kadar 4 derece sabit sıcaklıkta saklanmıştır. Zonulin bozulmuş bağırsak geçirgenliğinin gösterilmesinde önemli bir biyobelirteç olduğundan, olgular üzerinde en az bir ay öncesine kadar antibiyotik kullanılmamış olmasına dikkat edilmiştir.

**Tablo 3.** Çalışma kapsamına alınan köpekler ve hastalık tanıları.

Çalışma kapsamına alınan gruplar ve olgu sayıları (n)	Enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz gruplara dağılım
Grup I (n=9)	Giardiazis
Grup II (n=9)	Coronavirus
Grup III (n=9)	Distemper
Grup IV (n=9)	Parvoviral enterit
Grup V (n=9)	Nonenfeksiyöz ishal
Grup VI (n=9)	Sağlıklı kontrol

**Tablo 4.** Çalışma kapsamına alınan köpeklere yapılan analizler.

Çalışma kapsamına alınan köpeklere yapılan analizler	Enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz gruplara dağılım
Kan zonulin seviyesi	ELISA
Fekal zonulin seviyesi	ELISA
Enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz etken teşhisi	Hasta başı hızlı test kitleri/Immüno-kromatografik-ELISA

Çalışma kapsamına alınmış köpeklerde serum zonulin seviyeleri ve fekal zonulin seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak teşhis edilmiştir. Enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz etkenlerin teşhisi hasta başı hızlı test kitleri/Immüno-kromatografik-ELISA yöntemiyle yapılmıştır.

Canine Zonulin (ZUN) ELISA kitinin, seyreltilmemiş orijinal canine serumu, plazma veya doku homojenat numunelerindeki analit seviyesini belirlemek için kullanılması amaçlanmıştır. Kitin duyarlılığı 1.0ng/ml, algılama aralığı 1.56ng/ml-50ng/ml'dir. Toplanan serumlar yaklaşık 20 dakika 1000×g'de (veya 3000rpm) santrifüjlenmiş, süpernatantı dikkatlice toplanmıştır. Sonuçlar Blank'in (OD0) ortalama optik yoğunluğunu çıkarmak için, her standart ve numune için çift okumaların ortalamasını alınarak bulunmuştur.

**Tablo 5.** Sonuçların Okunması.

Konsantrasyon	Boş	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Ortalama O.D. (450 nm)	ODo	OD1	OD2	OD3	OD4	OD5	OD6

### 3.2.1. Serum Zonulin Analizi

Serum tüplerine alınan 1 ml kan örneği 3000 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün üzerinde ayrılan serumun başka tüpe aktarılmasının ardından analizin gerçekleşeceği güne kadar -80°C’de muhafaza edildi.

### 3.2.2. Fekal Zonulin Analizi

Kırmızı kapaklı dışkı toplama tüplerine steril svaplar aracılığıyla alınan fekal örnekler % 70’ lik etanol içerisine konularak 4°C sabit sıcaklıkta saklanmıştır.

## 3.3. Test Metodolojisi

### 3.3.1. Test hazırlığı

Elisa Kit’i 20 dakika önceden buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına geldiğinde test prosedürü başlatıldı. Konsantre yıkama solüsyonu çift damıtılmış su (1:25) ile seyreltildi. Canine zonulin iyofilize standart numuneye 1.0 ml standart seyreltici eklendi ve 30 dakika bekletildi. Numune tamamen çözüldükten sonra hafifçe karıştırıldı ve gerektiği kadar seyreltme yapıldı. 7 temiz tüp sırasıyla 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 numaraları ile etiketlendi ve her tüpe 300 mikrolitre standart örnek seyreltici eklendi. Tüp 2’ den tüp 3’ e 300 mikrolitre seyreltici pipetlendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra Tüp 2’ den tüp 3’ e 300 mikrolitre seyreltici pipetlendi ve iyice karıştırıldı. Tüp 7’ ye kadar yukarıdaki adımlar tekrarlandı. Tüp 8’ de standart numune dilüsyonu negatif kontrol olarak belirlendi. Biyotinlenmiş Köpek Zonulin antikor sıvısı oluşturmak adına konsantre biyotinlenmiş antikor (1:100) seyreltmek için antikor seyreltici kullanıldı. Enzim-konjugat sıvısı hazırlamak için konsantre enzim-konjugatı, enzim-konjugat seyreltici (1:100) ile seyreltildi ve enzim-konjugat sıvısı oluşturuldu. Renk reaktifi sıvısı, renk reaktifi A ve renk reaktifi B ile 9:1 oranında hazırlandı.

### 3.3.2. Kit kompozisyonu

**Tablo 6.** Kit Kompozisyonu.

İsim	96 test	48 test	Depolama
Antikor kaplı plaka	8x12	8x6	4/-20 °C
Köpek Zonulin Standartları	2 vial	1 vial	4/-20 °C
Biyotinlenmiş antikor (1:100)	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Enzim eşleniği (1:100)	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Enzim seyreltici	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Antikor seyreltici	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Standart seyreltici	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Örnek seyreltici	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Yıkama tamponu (1:25)	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Renk Reaktifi A	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Renk Reaktifi B	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Renk Reaktifi C	1 vial	1 vial	4/-20 °C
Talimatlar	1 set	1 set	RT

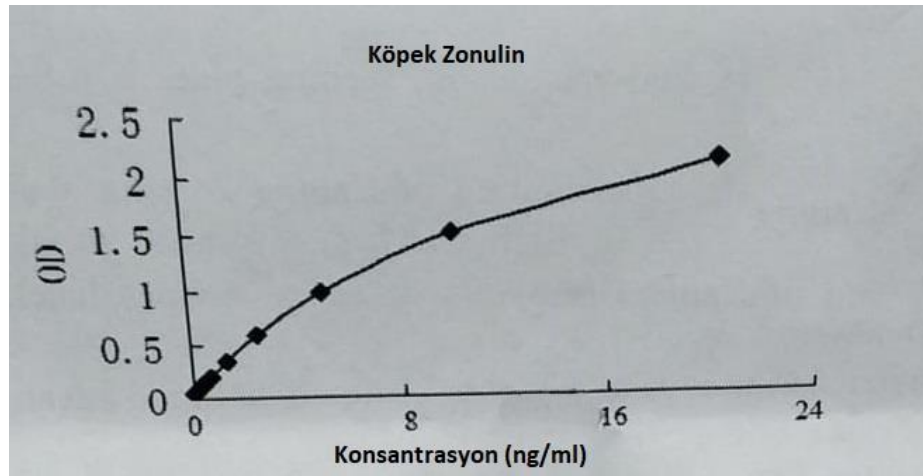
### 3.3.3. Testin yapılışı

Oda sıcaklığına denk gelen kilitli poşetten gerekli şeritler çıkarıldı. İlgili kuyucuklara numuneler veya farklı konsantrasyonlarda canine zonulin standart numuneleri eklendi (her kuyu için 100 µl), 0 ng/ml kuyucuk standart seyreltici ile dolduruldu. Reaksiyon kuyuları yapışkan bantlarla kapatıldı, kuluçka makinesinde 37 °C'de 90 dakika kuluçkalandı. Biyotinlenmiş canine zonulin antikor sıvısı 30 dakika önceden hazırlandı. Elisa plakası 2 kez yıkandı. Biyotinlenmiş canine zonulin antikor sıvısı her kuyucuğa eklendi (her biri için 100 µl). Reaksiyon kuyuları yapışkan bantlarla kapatıldı, kuluçka makinesinde 37°C'de 60

dakika kuluçkalandı. Enzim-konjugat sıvısı 30 dakika önceden hazırlandı. Elisa plakası 3 kez yıkandı. Boş kuyucuklar (her biri için 100 µl) hariç her kuyucuğa enzim-konjugat sıvısı eklendi. Reaksiyon kuyuları yapışkan bantlarla kapatıldı, kuluçka makinesinde 37°C'de 60 dakika kuluçkalandı. Elisa plakası 5 kez yıkandı. Bireysel kuyuya (kör kuyuya da) 100 µl Renk Reaktif sıvısı eklendi, 37°C'de karanlık inkübatörde kuluçkalama yapıldı. Yüksek konsantrasyonlu standart eğri için renk koyulaştığında ve renk gradyanı belirdiğinde, tarama durduruldu. Kromojenik reaksiyon 30 dakika içinde kontrol edildi. Bireysel kuyucuğa (ayrıca kör kuyucuğa) 100 µl Renk Reaktif C eklendi. İyice karıştırıldı ve OD (450 nm) 10 dakika içinde okundu.

### 3.3.4. Sonuç Belirleme

Her numune ve numunenin OD değeri, boş kuyunun değerinden çıkarıldı. Standart eğri manuel olarak çizildi. Numunelerin konsantrasyon değeri apsis ve OD okumaları dikey koordinat olarak alındı. Standart örneğin her bir koordinat noktasını bağlamak için düz çizgi kullanıldı. Sonucu analiz etmek ve hesaplamak için profesyonel eğri yazılımı kullanıldı.



Şekil 21. Zonulin Konsantrasyonu.

**Tablo 7.** İşletim Prosedürlerinin Özeti.

Adım	İşletim prosedürlerinin özeti
1	Reaktifler, numuneler ve standartları hazırlandı.
2	Hazırlanan numune ve standart reaksiyon 37 °C'de 90 dakika eklendi.
3	Plaka yıkandı, biyotinlenmiş antikor çalışma solüsyonu eklendi, 37 °C 60 dakika
4	Enzim çalışma solüsyonunu eklemek için üç kez yıkandı, 37 °C 30 dakika.
5	Beş kez yıkama yapıldı ve ardından 30 dakika içinde 37°C Renk Reaktifi solüsyonu eklendi.
6	Renk Reaktifi C eklendi.
7	Mikroplaka okuyucunun, OD değerlerini 10 dakika içinde ölçmesi beklendi.
8	Test edilen örneklerin faktör içeriği hesaplandı.

## 4. BULGULAR

Çalışma kapsamına 1-5 yaşlı her iki cinsiyetten (25 adet erkek-22 adet dişi) ve farklı ırklardan (1 adet alman kurdu, 1 adet cane corso, 2 adet doberman, 3 adet french bulldog, 1 adet golden retriever, 5adet kangal, 2 adet labrador retriever, 2 adet maltipoo, 19 adet melez, 3 adet pitbull, 2 adet pug, 4 adet rottweiler, 2 adet terrier) 47 adet köpek dahil edildi. Olgu 1-40 arasındaki görseller tablo 7.1.1 ile tablo 7.1.40 ve resim 7.1.1. ile resim 7.2.40 arası gösterilmiş, demografik bilgiler ve ilgili fotografik hafızaya yer verilmiştir.

**Tablo 8.** Fekal analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Ayrıca Corona virüs grubu ile Giardia ve Coronavirus ile Parvovirus grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Serum analizleri yapılan hastalarda, sağlıklı grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Ayrıca Corona grubu ile Giardia, Distemper ve Parvovirus grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Fekal ve serum karşılaştırmalarında ise aynı grup içinde giardia hariç tüm gruplar birbirinden farklıdır.

Gruplar	Fekal Zonulin (ng/mL) $\bar{X} \pm SH$	Serum Zonulin (ng/mL) $\bar{X} \pm SH$	P değeri
Giardia	41.66 $\pm$ 4.36 <sup>bc</sup>	63.27 $\pm$ 42.68 <sup>bc</sup>	ÖD
Coronovirüs	19.59 $\pm$ 4.35 <sup>b</sup>	7.19 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>	0.008
Distemper	75.31 $\pm$ 41.06 <sup>b</sup>	20.34 $\pm$ 4.29 <sup>bc</sup>	0.012
Parvovirus	86.48 $\pm$ 49.45 <sup>bc</sup>	20.98 $\pm$ 5.13 <sup>bc</sup>	0.012
Non-enfeksiyöz	23.88 $\pm$ 6.29 <sup>b</sup>	9.38 $\pm$ 2.51 <sup>b</sup>	0.008
Sağlıklı	3.76 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.008

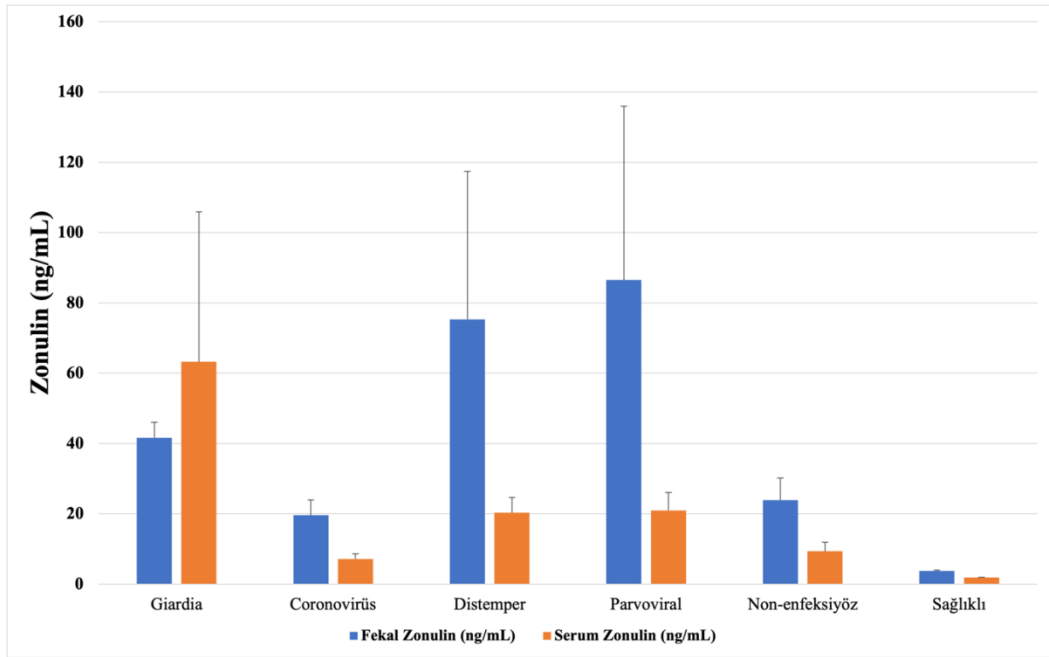
ÖD: önemli değil

<sup>a,b,c</sup>: Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen veriler birbirinden istatistiksel anlamlıdır.



**Tablo 9.** Fekal ve serum analizlerine ait korelasyon analizleri.

Gruplar	Fekal Zonulin (ng/mL)	Serum Zonulin (ng/mL)	P değeri
Giardia	0,84		0,004
Coronavirüs	0,98		0,000
Distemper	0,59		0,096
Parvoviral	0,78		0,013
Non-enfeksiyöz	0,96		0,000
Sağlıklı	0,57		0,110



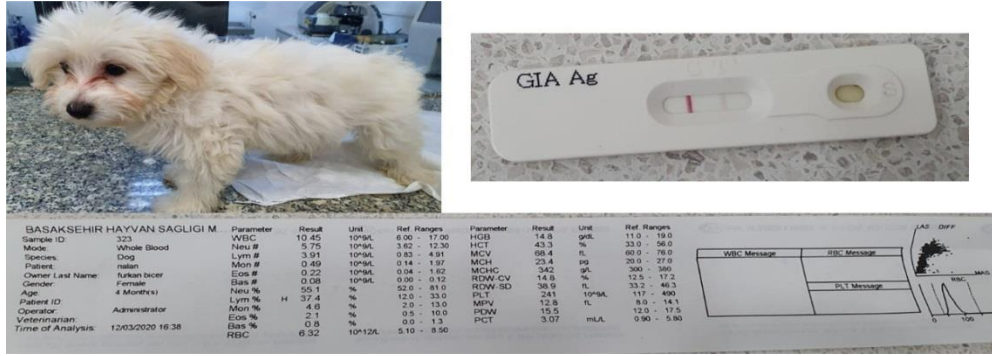
**Şekil 22.** Fekal ve serum zonulin seviyelerine ait ortanca, minimum ve maksimum değerler.

#### 4.1. Olgulara ait demografik veriler

Çalışma kapsamına alınan 47 köpekten görsel kayıtları mevcut 40'inin demografik verileri ilgili görsellerde tablo 7.1.1. ile tablo 7.1.40 arasında ve resim 7.1.1 ile resim 7.1.40 arasında sunuldu.

**Tablo 10.** Olgu 1 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
İrki	Terrier
Cinsiyet	Dişi
Hastalık Tanısı	Giardiazis



**Resim 2.** Olgu 1 görselleri.

**Tablo 11.** Olgu 2 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	3 aylık
İrki	Maltipoo
Cinsiyet	Dişi
Hastalık Tanısı	Giardiazis, Coronavirus



**Resim 3.** Olgu 2 görselleri.

**Tablo 12.** Olgu 3 bilgileri ve hastalık tanısı.

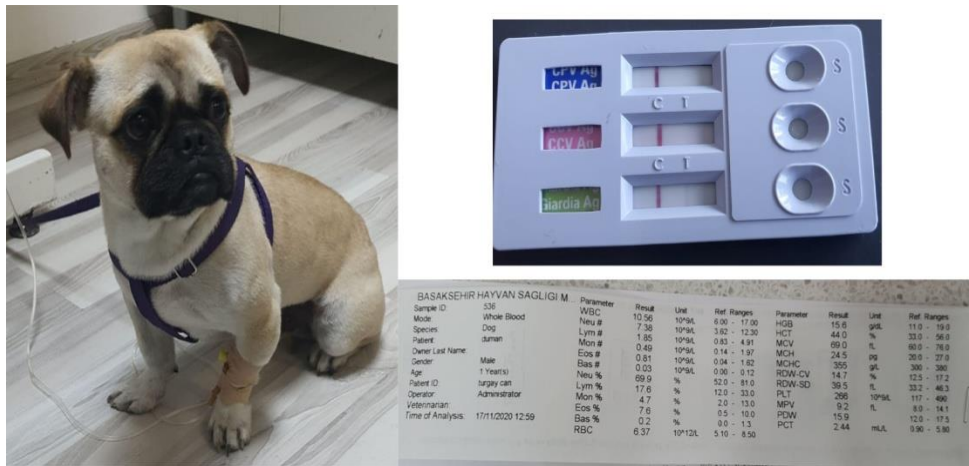
Yaş	7 aylık
İrki	Rottweiler
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis



**Resim 4.** Olgu 3 görselleri.

**Tablo 13.** Olgu 4 bilgileri ve hastalık tanısı..

Yaş	1 yaş
İrki	Pug
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis



**Resim 5.** Olgu 4 görselleri.

**Tablo 14.** Olgu 5 bilgileri ve hastalık tanısı.

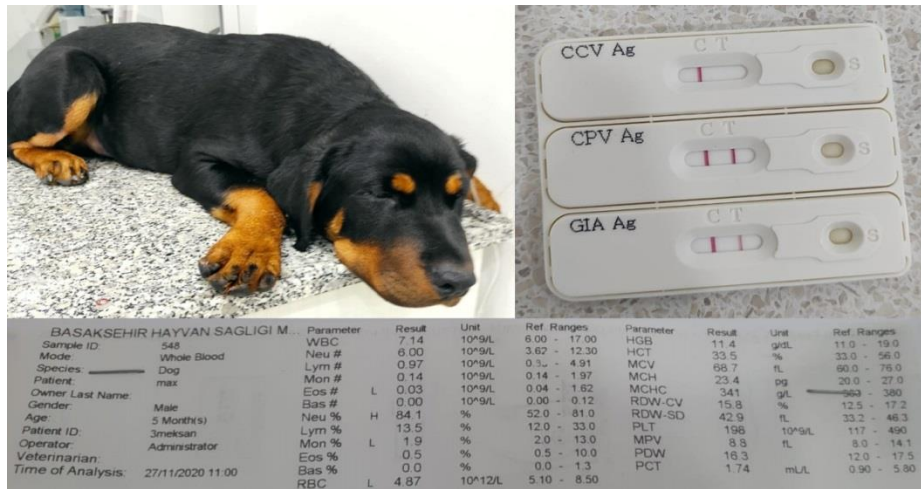
Yaş	4 ay
İrki	Melez
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis, Parvoviral enteritis



**Resim 6.** Olgu 5 görselleri.

**Tablo 15.** Olgu 6 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	5 aylık
İrki	Rottweiler
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis, Parvoviral Enteritis



**Resim 7.** Olgu 6 görselleri.

**Tablo 16.** Olgu 7 bilgileri ve hastalık tanısı.

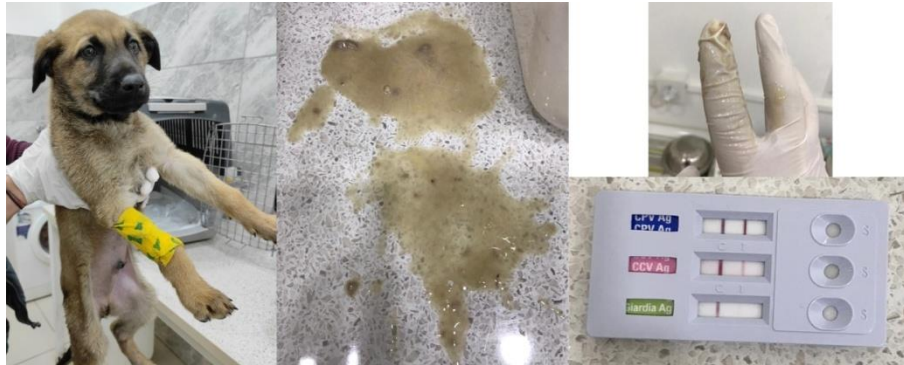
Yaş	1 yaş
İrki	Melez
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis, Parvoviral Enteritis



**Resim 8.** Olgu 7 görselleri

**Tablo 17.** Olgu 8 bilgileri ve hastalık tanısı.

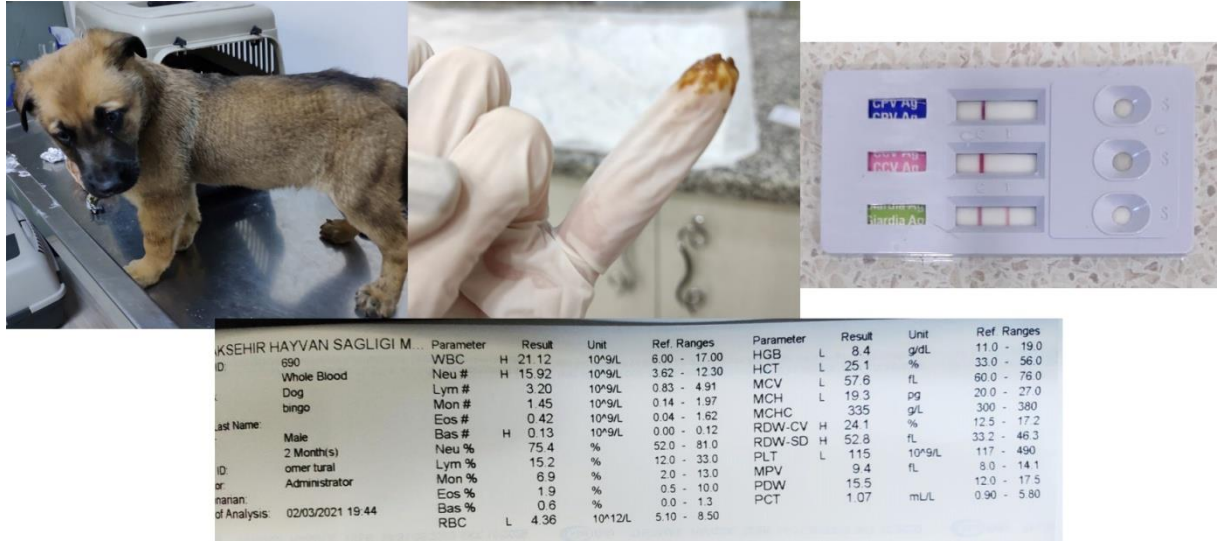
Yaş	3 ay
İrki	Melez
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis, Coronavirus



**Resim 9.** Olgu 8 görselleri.

**Tablo 18.** Olgu 9 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
İrki	Melez
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Giardiazis



**Resim 10.** Olgu 9 görselleri.

**Tablo 19.** Olgu 10 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	3 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrki	Melez
Hastalık Tanısı	Coronavirus, Parvoviral Enteritis



**Resim 11.** Olgu 10 görselleri.

**Tablo 20.** Olgu 11 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
Irkı	Melez
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Coronavirus



**Resim 12.** Olgu 11 görselleri

**Tablo 21.** Olgu 12 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
Irkı	Melez
Hastalık Tanısı	Coronavirus, Distemper



**Resim 13.** Olgu 12 görselleri

**Tablo 22.** Olgu 13 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
İrki	Kangal
Cinsiyet	Dişi
Hastalık Tanısı	Coronavirus



**Resim 14.** Olgu 13 görselleri

**Tablo 23.** Olgu 14 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	3 aylık
İrki	Melez
Cinsiyet	Dişi
Hastalık Tanısı	Coronavirus, Parvovirus



**Resim 15.** Olgu 14 görselleri



**Tablo 24.** Olgu 15 bilgileri ve hastalık tanısı.

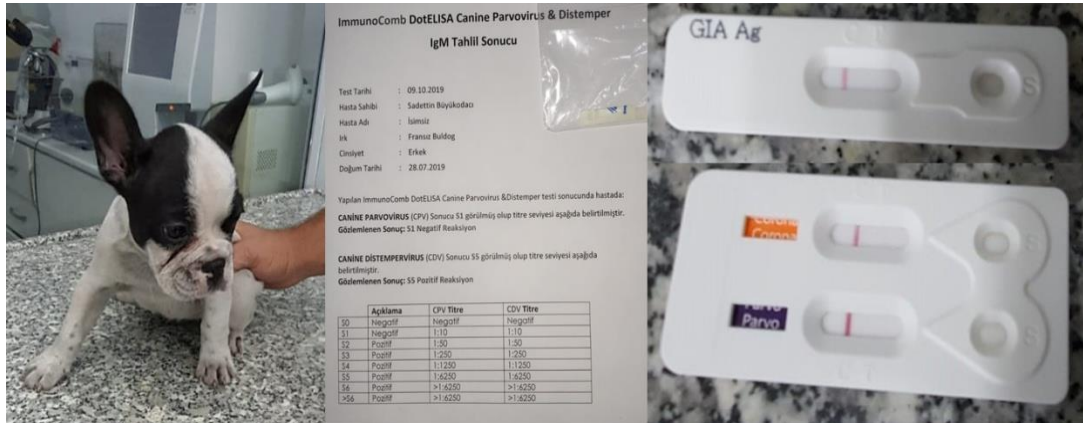
Yaş	2 aylık
İrki	Melez
Cinsiyet	Dişi
Hastalık Tanısı	Coronavirus



**Resim 16.** Olgu 15 görselleri

**Tablo 25.** Olgu 16 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	6 aylık
İrk	French Bulldog
Cinsiyet	Erkek
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 17.** Olgu 16 görselleri

**Tablo 26.** Olgu 17 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 18.** Olgu 17 görselleri

**Tablo 27.** Olgu 18 bilgileri ve hastalık tanısı.

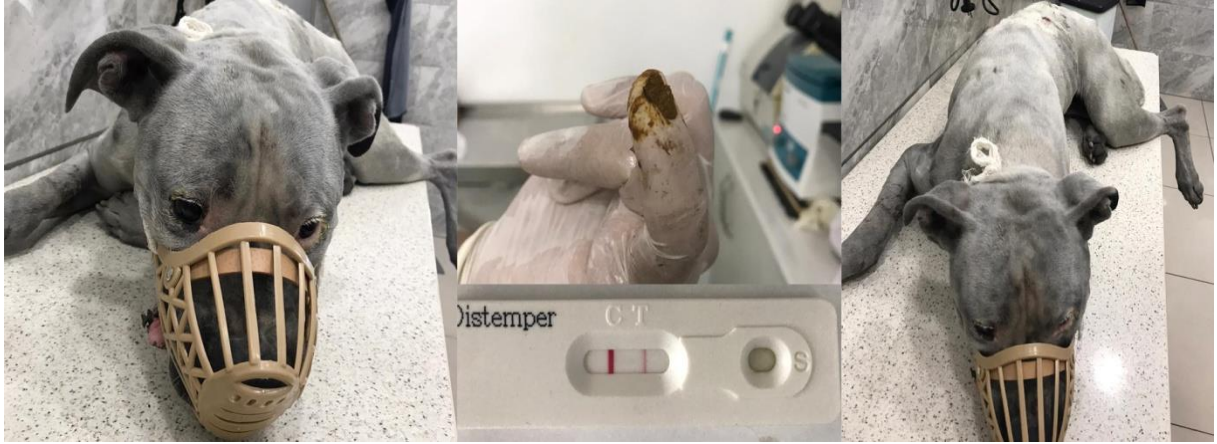
Yaş	1 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Labrador Retriever
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 19.** Olgu 18 görselleri

**Tablo 28.** Olgu 19 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	1 yaş
Cinsiyet	Erkek
İrk	Pitbull
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 20.** Olgu 19 görselleri

**Tablo 29.** Olgu 20 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	1 yaş
Cinsiyet	Erkek
İrk	Kangal
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 21.** Olgu 20 görselleri

**Tablo 30.** Olgu 21 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 22.** Olgu 21 görselleri

**Tablo 31.** Olgu 22 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 23.** Olgu 22 görselleri

**Tablo 32.** Olgu 23 bilgileri ve hastalık tanısı.

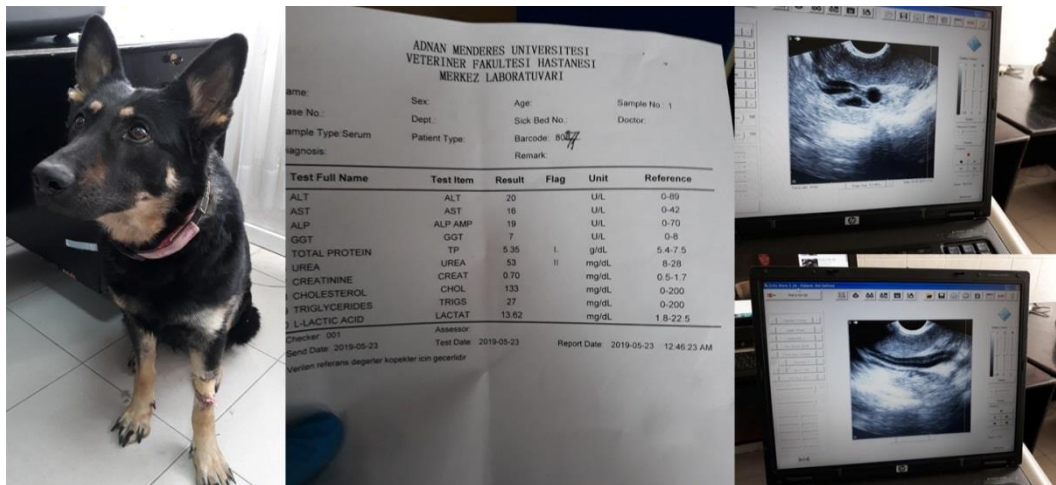
Yaş	2 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Distemper



**Resim 24.** Olgu 23 görselleri.

**Tablo 33.** Olgu 24 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	5 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Alman Kurdu
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 25.** Olgu 24 görselleri.

**Tablo 34.** Olgu 25 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz ishal



**Resim 26.** Olgu 25 görselleri.

**Tablo 35.** Olgu 26 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	3 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Kangal
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz



**Resim 27.** Olgu 26 görselleri

**Tablo 36.** Olgu 27 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	1 yaşında
Cinsiyet	Erkek
İrk	Rottweiler
Hastalık Tanısı	Parvoviral Enterit



**Resim 28.** Olgu 27 görselleri.

**Tablo 37.** Olgu 28 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Pitbull
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 29.** Olgu 28 görselleri

**Tablo 38.** Olgu 29 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	5 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 30.** Olgu 29 görselleri

**Tablo 39.** Olgu 30 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 yaş
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Parvoviral Enterit



**Resim 31.** Olgu 30 görselleri



**Tablo 40.** Olgu 31 bilgileri ve hastalık tanısı.

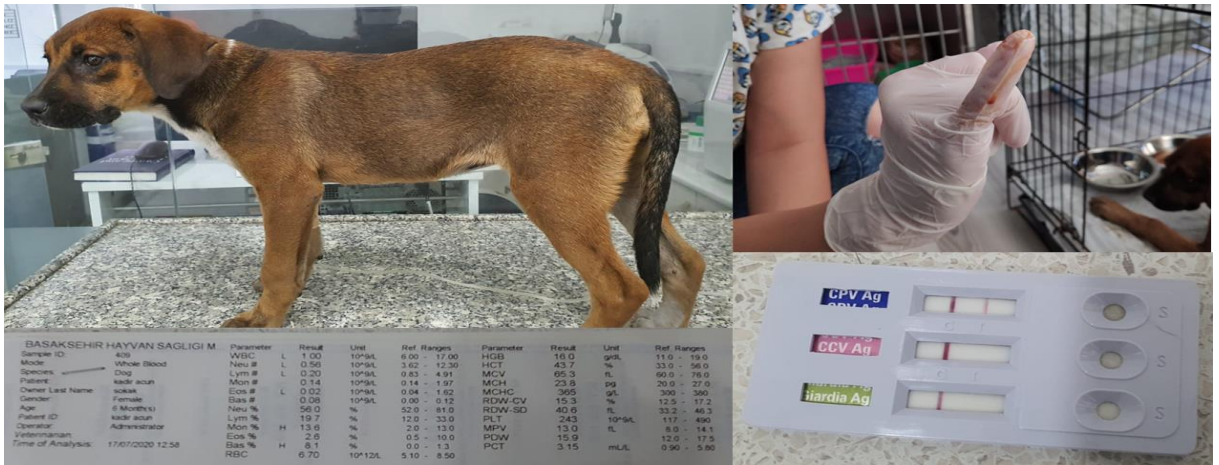
Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Cane Corso
Hastalık Tanısı	Coronavirus



**Resim 32.** Olgu 31 görselleri

**Tablo 41.** Olgu 32 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	5 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Parvoviral Enterit



**Resim 33.** Olgu 32 görselleri

**Tablo 42.** Olgu 33 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Golden Retriever
Hastalık Tanısı	Parvoviral Enterit



**Resim 34.** Olgu 33 görselleri

**Tablo 43.** Olgu 34 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 35.** Olgu 34 görselleri

**Tablo 44.** Olgu 35 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Doberman
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 36.** Olgu 35 görselleri

**Tablo 45.** Olgu 36 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	3 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Labrador Retriever
Hastalık Tanısı	Sağlıklı kontrol



**Resim 37.** Olgu 36 görselleri

**Tablo 46.** Olgu 37 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	4 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Doberman
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 38.** Olgu 37 görselleri

**Tablo 47.** Olgu 38 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	5 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Melez
Hastalık Tanısı	Noninfeksiyöz İshal



**Resim 39.** Olgu 38 görselleri

**Tablo 48.** Olgu 39 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	2 aylık
Cinsiyet	Dişi
İrk	Pitbull
Hastalık Tanısı	Sağlıklı kontrol



**Resim 40.** Olgu 39 görselleri

**Tablo 49.** Olgu 40 bilgileri ve hastalık tanısı.

Yaş	1 aylık
Cinsiyet	Erkek
İrk	Kangal
Hastalık tanısı	Parvoviral enterit



**Resim 41.** Olgu 40 görselleri.

## 4.2. İstatiksel Analizler

İshalli köpeklere ait fekal ve serum örneklerinden elde edilen zonulin verilerinin ortalama ve standart hata değerleri tablollaştırıldı. Verilerin homojenite testleri Shapiro-Wilk analizine göre gerçekleştirildiğinde normal dağılım göstermediği ve logaritmik transformasyon işlemlerine rağmen normal dağılım göstermeyen verilerin bulunduğu tespit edildi. Bu bağlamda non-parametrik test tekniklerinden yararlanılarak gruplar arasındaki karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Fekal ve serum örneklerinin arasındaki farkların gruplar arası değerlendirmelerinde Kruskal-Wallis ANOVA, aynı grubun fekal ve serum zonulin seviyelerinin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testinden yararlanıldı. Fekal ve serum örneklerinin her bir grup içerisinde ayrı ayrı korelasyon analizlerinde de Spearman korelasyon yönteminden yararlanıldı. Tüm analizler SPSS 26.0 (IBM, Amerika) programında gerçekleştirilmiş olup analizlerde p değerinin 0,05' in altında olduğu durumlar istatistiksel anlamlı kabul edildi.

## 5. TARTIŞMA

Zonulin ilk olarak Fasano tarafından, sıkı bağlantıların çözülmesini indükleyen ve ardından bağırsak geçirgenliğini artıran *Vibrio cholerae*'den türetilen *Zonula occludens* toksinine bir insan protein analogu olarak tanımlandı (Fasano, 2001). Fasano'nun çalışma grubuna göre, çölyak hastalığının akut fazı sırasında bağırsak dokularında zonulin ekspresyonu yükselir (Clemente ve diğerleri, 2003). Fasano, 2000 yılında, zonulin düzensizliğinin bağırsak bariyer fonksiyonlarının bozulmasına katkıda bulunabileceğini ve gıda alerjileri, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, sistemik otoimmün hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi farklı immünopatolojik hastalıkların patogenezinde yer alan antijenlerin geçişine yol açabileceğini önceden bildirmiştir (Fasano, 2000). Bakteriler, zonulin salınımının güçlü tetikleyicileri olarak tanımlandı (Guttman ve Finlay, 2009). Biz de bu tez çalışması ile köpeklerde gastroenteritis ile ilişkide olabilen enfeksiyöznon-enfeksiyöz bazı hastalıklarda serum/fekal zonulin seviyelerinin tespitine yönelik araştırmalarda bulunduk. Önceki bildirimler (Guttman ve Finlay, 2009; Fasano, 2000) ışığında bu çalışma kapsamında gastrointestinal tutulumu neden olan hem enfeksiyöz hem de non-enfeksiyöz hastalıklarda gerek dışkıda gerekse serumda zonulin tespiti veteriner iç hastalıkları alanına denk gelen ilk çalışma olabilir. Bu yönü ile hem çığır açacak hem de teşhis ile sağaltım protokollerinde değişim sağlayabilir.

Patogenezi halen tam açıklığa kavuşturulamamış IBH'nın, artan bağırsak geçirgenliği ile ilişkide olabileceği bilinmektedir. Akut faz yanıtı eşlik eden IBH'de zonulin up-regülasyonunun saptandığı kanıtlanmıştır (Vanuytsel ve diğerleri, 2013). IBH'nın patogenezinde disbiyozis olağan şüpheliler arasındadır ve farklı enterik bakterilere maruz kalan ince bağırsaklar, bağırsak lümenine ve/veya kan dolaşımına zonulin salgılar. Sadece Crohn hastalığında dışkı ve serumda zonulin düzeylerinin yükselmesi bu teori ile uyumlu olabilir. Zonulin seviyeleri ile IBH yaygınlığı, fistülizasyon ve/veya penetran tutulum veya önceki bağırsak cerrahisi arasında herhangi bir ilişki kanıtlanamamıştır (Karin ve diğerleri, 2017).

Zonulin, bağırsak geçirgenliğini en iyi yansıtan dışkı proteindir. Artan fekal seviyeleri, bozulmuş bir bağırsak bariyerinin bir belirteci olarak kabul edilir ve iltihaplanmaya ikincil reaksiyonları yansıtır. IBD kohortundaki yüksek kalprotektin seviyeleri, inflamatuvar bir durumu yansıtabilir. Bununla birlikte, yüksek fekal zonulin'in

yalnızca inflamasyon varlığını değil, diğer faktörlerin neden olduğu artan bağırsak geçirgenliğini de yansıttığından şüphelenilmektedir (Karin ve diğerleri, 2017).

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) bulunan insanlarda gerçekleştirilen önceki bir çalışmada dışkı ve serum zonulin düzeylerini İBH lokalizasyonu ve tutulumu ilk kez değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ülseratif kolitisli (UC) hastalarda değil, sadece Crohn hastalığı olan hastalarda daha yüksek fekal ve serum zonulin seviyeleri göstermiş; üst sindirim sistemi tutulumu olan Crohn hastalığında daha yüksek fekal zonulin konsantrasyonlarına doğru bir eğilim olduğu saptanmıştır (Karin ve diğerleri, 2017). Söz konusu çalışmada fekal zonulin, Crohn hastalığında önemli ölçüde yükselirken, ülseratif kolitis hastalarında yükselmemiştir. Crohn hastalığında ülseratif kolite göre farklı bir permeabilite anormalliği olduğu ve bu anormalliğin hastalığın oluşumunda önemli olabileceği varsayılabilir. Crohn hastalığının rapor edilen genetik ilişkilerinin en azından bir kısmı bu yolları içeriyor gibi görünmektedir (Buhner ve diğerleri, 2006). Bu tez çalışmasında farklı enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalıklar değerlendirilmiş, olası permeabilite değişimlerine ait tamamlayıcı testler [suda çözünebilir non-metabolize şeker moleküllerinin intestinal kanalda penetrasyonu] maddi kısıtlılıklar nedeniyle değerlendirilemese de, zonulin tayini ile bu açık kapatılmaya çalışılmıştır. Söz konusu non-metabolize şeker moleküllerinin bizim alanımızda kullanımı pratik ve kolay olmasa da, sonraki çalışmalarımız buna yönelik metodolojik tanısal testlerin gelişimini içerecektir.

Gıda gibi çevresel bileşenler, bağırsak geçirgenliğinin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olabilir. Ek olarak, bağırsak mikrobiyotasının da bağırsak geçirgenliğini etkilediği gösterilmiştir. İBH'de ve sağlıklı sigara içenlerde önemli ölçüde daha yüksek fekal zonulin seviyelerinin tespiti, sigara içmenin neden olduğu bağırsak homeostazının önemli etkisine işaret etmektedir. Sigara içmek, İBH patogenezinde en önemli çevresel risk faktörlerinden biri olarak kabul edilir ve bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu etkileyen ilgili faktörler listesine dahil edilmelidir (Birrenbach ve Böcker, 2004; Benjamin ve diğerleri 2012; Severs ve diğerleri, 2016). Sigara tüketimi insanlarda İBH'nin patogenezinde rol alabilir ki, mukozal bağışıklık tepkilerinin modülasyonu, bağırsak sitokin ve eikosanoid seviyelerindeki değişiklikler veya bağırsak geçirgenliğindeki artışlar hipotez olarak yerini almaktadır (Biedermann ve diğerleri, 2013). Zonulin'in bağırsak iltihabındaki önemi iyi anlaşıldığından, sigara içenlerde yüksek fekal zonulin seviyeleri, sigara içimi, bağırsak dismikrobisi, sızdıran bağırsak ve İBD'de hastalığın seyri arasındaki potansiyel patogenetik bağlantıyı açıklayabilir. Herhangi bir bağırsak iltihabı belirtisi olmayan görünüşte sağlıklı



kişilerde bile yüksek dışkı zonulin düzeylerini gösteren çalışma sonuçları, bağırsak mikro-çevresi ile sigara içmek gibi çevresel faktörler (örneğin olası kilo ile ilgili) arasında, büyük karmaşık bir etkileşime işaret ettiği düşünülmektedir (Biedermann ve diğerleri, 2014). Bu tez kapsamına alınan tüm olgularda hayvanseverlere/hasta sahiplerine evde ya da köpeklerinin yanında sigara içmemeleri önemle rica edildi.

Serumda ya da dışkıda artan zonulin seviyelerinin bağırsak disbiyozisinin bir aynası olabileceği, fekal mikrobiyoloji ile enfeksiyonun ya da ince bağırsakta aşırı bakteriyel kolonizasyonun dışlanması için yeterli laboratuvar kanıtı [bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilecek önemli bir faktör olan antibiyotik veya diğer immünomodülatör uygulamalar hakkında bilgi eksikliği] önemli handikaplardır (Karin ve diğerleri, 2017). Bizim çalışmamızda yine bağırsak mikrobiyomuna ait 16s rRNA ve shotgun sekans analizleri gerçekleştirilmesi adına girişimlerde bulunulsa da, olgu başına ikili analiz maliyeti [120 doların üzerinde] buna olanak vermemiştir. Yine de sonraki çalışmalarımızda zonulin seviyeleri ile bağırsak mikrobiyom analizleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi adına hamelerde bulunulacaktır.

Bu tez çalışması ile birebir örtüşmüyor gibi gözükse de sıkça tartışmada atıfta bulunulduğu üzere IBH'li pediatrik bireylerde kontrol grubuna göre daha yüksek fekal zonulin seviyelerinin tespiti ile fekal zonulin ve fekal kalprotektin seviyeleri arasında korelasyon saptanması tesadüf değildir (Szymanska ve diğerleri, 2021). İlgili çalışmada zonulinle ilişkide proteinlerin, intraselüler sıkı bağlantı noktalarını reverzibl olarak modüle ederek, ince bağırsakların epiteliyal katmanlarında permabiliteyi arttırmaları; hastalık aktivitesinin yeni ve non-invaziv bir biyobelirteci olabileceğini göstermektedir (Szymanska ve diğerleri, 2021).

Zonulin ile ilgili proteinler, bağırsak geçirgenliğini yansıtan dışkı proteinleridir ve bunların artan dışkı düzeylerinin, özellikle ince bağırsakta, bozulmuş bir bağırsak bariyerinin bir belirteci olduğu düşünülür (Turner ve diğerleri, 2017). Artan serum/plazma zonulin konsantrasyonları, gıda alerjileri, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, sistemik otoimmün hastalıklar ve bağırsağın enflamatuar hastalıkları gibi farklı immünopatolojik hastalıklarda tespit edilmektedir (Tatucu-Babet ve diğerleri, 2020). Fekal ve serum zonulin seviyeleri arasındaki korelasyonda farklılıklar vardır (Fasano, 2020). Şimdiye kadar yayınlanmış sadece birkaç çalışma IBH'de zonulin kullanımını tanımlamaktadır ve bunların tümü yetişkin hastaları içermektedir (Kort ve diğerleri, 2011; Küme ve diğerleri, 2017; Guttman ve Finlay, 2009).

Caviglia ve diğeri (2019) IBH'li hastalarda zonulin'in rolü ile serum ve fekal seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştırdı. Çalışma gruplarına 118 IBH hastası [86 Crohn hastası (Ch) ile ve 32 ülseratif kolitis hastası] ve 23 sağlıklı kontrol (HC) dahil edildi. Yazarlar, IBH 'de serum zonulin konsantrasyonlarının HC'lere kıyasla (34.5 [26.5–43.9] ng/mL'ye karşı 8.6 [6.5–12.0] ng/mL,  $p < 0.001$ ) daha yüksek olduğunu ve serum ve dışkı zonulin (R = 0.15,  $p = 0.394$ ) arasında herhangi bir korelasyon gözlemlenmediğini göstermişlerdir (Caviglia ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında sırası ile Giardia ( $p=0,004$ ), Coronavirüs ( $p=0,000$ ), Parvoviral gastroenteritis ( $p=0,013$ ) ve non-enfeksiyöz gruplarda ( $p=0,000$ ) fekal zonulin (ng/mL) ile serum zonulin (ng/mL) arasında korelasyon belirlendi.

Tartışma kısmında bu ana kadar (karşılaştırmalı) verilen zaruri insan çalışmalarının dışında, tez çalışmamızın tartışma kısmını genişletmek ve derinleştirerek, kanıta dayalı verileri sunmak adına köpeklerde gerçekleştirilen çalışmalardan dem vurmak isabetli olacaktır. İnsanlarda, bağırsak geçirgenliğinin bir biyobelirteci olan serum zonulin'in, altta yatan enteropatilerle korelasyon göstermesi ile terapötik bir hedef olarak potansiyel uygulama bulması gibi hipotezlerle gerçekleştirilen bir çalışmada köpeklerde kronik enteropati için bir biyobelirteç olarak serum zonulini değerlendirilmiştir.

En az 3 hafta süreyle anoreksi, hiporeksi, disreksi, kusma, kilo kaybı veya ishal gibi gastrointestinal belirtilerden en az birine sahip 21 sahipli köpeğin yanı sıra diğeri yaş eşleştirilmiş 21 kontrol köpeği de dahil edilen çalışmada tam kan sayımı, serum kimyası, spesifik köpek pankreas lipazı, kobalamin, istirahat kortizol, abdominal ultrason ve histopatolojik gastrointestinal endoskopiye dayalı olarak kronik enteropati teşhisi konulmuştur. Kan numuneleri, ticari bir köpek serumu zonulin kantitatif ELISA kullanılarak analiz edilmiştir. Kronik enteropatili köpeklerin medyan serum zonulin değerleri 0.28 ng/mL iken, kontrol köpekleri 0.27 ng/mL idi. Bu popülasyonlar arasında köpek serum zonulin seviyelerinde anlamlı bir fark yoktu.

İlgili çalışmada yazarlara göre ticari bir köpek zonulin ELISA kullanılarak, serum zonulin seviyeleri, kronik enteropatili köpekler ile kontrol köpekleri arasında ayırım yapılmamıştır (Dinesh ve diğeri, 2022). Bir başka çalışmada köpeklerde sıklıkla laboratuvar anormallikleri ile ilişkili, değişken şiddetli gastrointestinal belirtilerle karakterize bağırsak lenfanjiyektazisi'nin (IL), şiddetinin derecelendirilmesine yönelik [ve/veya erken teşhis ile monitorizasyon] belirteçler araştırılmıştır. İlgili araştırmada IL'li köpeklerde yeni tanısal/takip belirteçleri olarak serum C-reaktif protein, serum bakteriyel lipopolisakkarit, serum parçalanmış sitokeratin 18, serum sitrülün ve zonulin (hem serumda

hem de dışkıda) seviyeleri tespit edilmiştir. Serum sitrülün hariç tüm belirteçler, hastalıklı ve kontrol köpekleri arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmasına rağmen gerek zonulin (hem serumda hem de dışkıda) gerekse diğer incelenen biyobelirteçler köpek IL'si için umut verici belirteçler olarak saptanmıştır (Rossi ve diğerleri, 2021).

Bizim çalışmamızda yukarıda son sözü edilen ve güncel olan her iki çalışma ile karşılaştırmalı değerlendirmede bulunmak yerinde ve isabetli olacaktır. Bu tez kapsamında ilgili olgularımızda serum zonulin seviyeleri açısından en yüksek değerler Giardia, parvoviral gastroenteritis ve distemper virüs ile enfekte köpeklerde; buna karşın fekal zonulin seviyeleri açısından en yüksek değerler yine sırası ile parvoviral gastroenteritis, distemper virüs ve giardiazisli köpeklerde saptanmıştır. Fekal zonulin seviyeleri açısından sağlıklı kontrollerle ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar mevcuttu. Yine corona virüs grubu ile giardia ve corona ile parvo grupları birbirinden anlamlı derecede farklı fekal zonulin seviyelerine sahipti. Serum zonulin seviyeleri açısından sağlıklı grup ile tüm gruplar anlamlı fark saptandı. Yine corona grubu ile giardia, distemper ve parvoviral gastroenteritis grupları arasında belirgin farklılık mevcuttu.

Serum zonulin ölçümünün, bağırsak bariyeri bütünlüğünün bir belirteci olarak değerlendirilmesinde mevcut ticari zonulin ELISA testlerinin sınırlamalarından bahsetmek önemlidir (Ajamian ve diğerleri, 2019). Ajamian ve diğerleri (2019) farklı ZRP tahlillerini araştıran araştırmacılar, hepsinin, hiçbiri ZRP olmayan farklı proteinler saptadığını gösterdi. Bu nedenle, hedef proteinler gerçekten tanımlanmaya kadar bağırsak mukozal bariyer işlev bozukluğunu ve geçirgenliğini değerlendirmede dolaşımdaki konsantrasyonların hiçbir değeri olamaz (Scheffler ve diğerleri, 2018). Ticari ELISA saptama metodolojisi, rekombinant zonulin/prehaptoglobin-2 proteini için spesifik ve güvenilir monoklonal yakalama ve saptama antikörlerinin geliştirilmesiyle geliştirilebilir (Scheffler ve diğerleri, 2018).

Tüm bu sonuçları ve aralarındaki tutarsızlıkları göz önünde bulundurarak, ZRP'nin potansiyel olarak yeni, invaziv olmayan bir IBD aktivitesinin biyolojik belirteci olarak rolü hakkında herhangi bir kesin ve nesnel sonuç çıkarmak için yeterli kanıt mevcut değildir. Bununla birlikte, artan bağırsak geçirgenliğinin bir belirteci olduğundan, ZRP, uygun şekilde tasarlanmış çalışmalar kullanılarak daha fazla araştırmaya değer (Szymanska ve diğerleri, 2021).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zonulin' in diğer türlerde non-invaziv bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak vaat edilmesine rağmen, köpeklerde pek değerlendirilmemiştir. Bu tez çalışmasında köpeklerde gastroenteritise neden olan bazı enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalıklarda serum ve fekal zonulin seviyelerinin tespiti, muhtemelen alanımıza yönelik ilk çalışma olabilir. Serum zonulin seviyeleri açısından en yüksek değerler Giardia, parvoviral gastroenteritis ve distemper virüs ile enfekte köpeklerde; buna karşın fekal zonulin seviyeleri açısından en yüksek değerler yine sırası ile parvoviral gastroenteritis, distemper virüs ve giardiazisli köpeklerde belirlendi. Yine farklı bir analitik yaklaşım olarak fekal zonulin seviyeleri açısından sağlıklı kontrollerle ile tüm gruplar arasında anlamlı farklar dikkat çekti. Coronavirüs grubu ile giardia, coronavirus ile parvoviral gastroenteritis grupları birbirinden anlamlı derecede farklı fekal zonulin seviyelerine sahipti. Serum zonulin seviyeleri açısından sağlıklı grup ile tüm gruplar anlamlı fark saptandı. Yine coronavirus grubu ile giardia, distemper ve parvoviral gastroenteritis grupları arasında belirgin farklılık mevcuttu. İntestinal permeabilitenin önemli bir biyobelirteci olan zonulin seviyelerinin gerek serum gerekse dışkıda tespiti gastrointestinal inflamasyonu bulunan olgularda önemli bir prognostik ve sağaltım belirteci olabilir. Şöyle ki değişen gerek serum gerekse dışkı zonulin seviyeleri başka bir ko-morbidite olsun olmasın, bağırsak permeabilite artışına işaret ederek, bu vakalarda uygulanabilecek tüm protokollerde değişim sağlayabilir. İlaveten anılan tahlillerin gerek serum gerekse dışkıda altın standart olarak kullanımına yönelik test metodolojisi geliştirilerek, rutine oturtulması teşhise yönelik önemli kazanımlarda sağlayabilir. Biraz daha spekülatif bir tahminleme ile zonulin tahlillerinin anılan hastalıklarda non-invaziv biyobelirteç olarak sayısız başka parametreye üstünlük sağlayabileceği, hatta erken teşhise olanak sağlayabileceği öngörülebilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ajamian, M., Steer, D., Rosella, G., Gibson, P.R. (2019). Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS ONE*, 14(1): e0210728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210728>
- Al-Sadi, R.M., Ma, T.Y. (2007). IL-1 causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of Immunol*, 178(7):4641-9. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4641.
- Arrieta, M.C., Bistriz, L., Meddings, J.B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55(10):1512-20. doi:10.1136/gut.2005.085373
- Arrieta, M.C., Madsen, K., Doyle, J., Meddings, J. (2009). Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*, 58(1):41-8. doi: 10.1136/gut.2008.150888
- Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, 347(12):911-20. doi:10.1056/NEJMra020100
- Barbaro, M.R., Cremon, C., Caio, G., Bellacosa, L., De Giorgio, R., Volta, U. (2015). The role of zonulin in non-celiac gluten sensitivity and irritable bowel syndrome. *United European Gastroenterology Journal*, 2015; 3:A87
- Baudry, B., Fasano, A., Ketley, J., Kaper, J.B. (1992). Cloning of a gene (ZOT) encoding a new toxin produced by vibrio cholerae. *Infection and Immunity*, 60(2): 428–434. doi:10.1128/iai.60.2.428-434.1992
- Begon, J., Juillerat P., Cornuz, J., Clair, C. (2015). Smoking and digestive tract: a complex relationship. Part 2: intestinal microbiota and cigarette smoking, *Revue Medicale Suisse*, 11(478):1304-6.PMID: 26211089

- Benard, A., Desreumeaux, P., Huglo, D., Hoorelbeke, A., Tonnel, A.B., Wallaert, B. (1996). Increased intestinal permeability in bronchial asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(6):1173-8. doi:10.1016/s0091-6749(96)70181-1.
- Benjamin, L.J., Hedin C.R.H., Koutsoumpas, A., Ng, S.C., McCarthy, N.E., Prescott, N.J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C.G., Sanderson, J., Hart, A.L., Kamm, M.A., Knight, S.C., Forbes, A., Stagg, A.J., Lindsay, J.O., Whelan, K. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(6):1092-100. doi:10.1002/ibd.21864.
- Bergmann, K.R., Liu, S.X., Tian, R., Kushnir, A., Turner, J.R., Li, H.L., Chou, P.M., Weber, C.R., De Plaen, I.G. (2013). Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *The American Journal of Pathology*, 182(5):1595-606. doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.013.
- Bischoff, S.C. (2011). 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC Medicine*. 9, 24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>
- Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*, 14: 189. doi:10.1186/s12876-014-0189-7
- Broom, L.J., Kogut, M.H. (2018). Inflammation: friend or foe for animal production? *Poultry Science*, 97(2):510-514. doi:10.3382/ps/pex314.
- Buckley, A., Turner, J.R. (2018). Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1):a029314. doi:10.1101/cshperspect.a029314.
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H.H., Lochs, H. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*, 55(3):342-7. doi:10.1136/gut.2005.065557.

- Büning, C., Geissler, N., Prager, M., Sturm, A., Baumgart, D.C., Büttner, J., Bühner, S., Haas, V., Lochs, H. (2012). Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(10):1932-9. doi:10.1002/ibd.22909.
- Camilleri, M., Gorman, H. (2007). Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 19(7):545-52. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00925.x.
- Carratu, R., Secondulfo, M., de Magistris, L., Iafusco, D., Urio, A., Carbone, M.G., Pontoni, G., Carteni, M., Prisco, F. (1999). Altered intestinal permeability to mannitol in diabetes mellitus type I. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28(3):264-9. doi:10.1097/00005176-199903000-00010.
- Cavicchia, P.P., Steck, S.E., Hurley, T.G., Hussey, J.R., Ma, Y., Ockene, I.S., Hébert, J.R. (2009). A New Dietary Inflammatory Index Predicts Interval Changes in Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein. *The Journal of Nutrition*, 139(12):2365-72. doi:10.3945/jn.109.114025.
- Caviglia, G.P., Dughera, F., Ribaldone, D.G., Rosso, C., Abate, M.L., Pellicano, R., Bresso, F., Smedile, A., Saracco, G.M., Astegiano, M. (2019). Serum zonulin in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Minerva Medica*, 110(2):95-100. doi:10.23736/S0026-4806.18.05787-7.
- Celi, P., Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Steinert, R.E., Klünter, A.M., Verlhac, V. (2017). Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.012>
- Celi, P., Verlhac, V., Calvo, E.P., Schmeisser, J., Klünter, A.M. (2019). Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250, 9–31. doi:10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.07.012

- Ciccia, F., Guggino, G., Rizzo, A., Alessandro, R., Luchetti, M.M., Milling, S., Saieva, L., Cypers, H., Stampone, T., Benedetto, P.D., Gabrielli, A., Fasano, A., Elewaut, D., Triolo, G. (2017). Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(6):1123-1132. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210000
- Clark, J.A., Doelle, S.M., Halpern, M.D., Saunders, T.A., Holubec, H., Dvorak, K., Boitano, S.A., Dvorak, B. (2006). Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(5):G938-49. doi:10.1152/ajpgi.00090.2006.
- Clayburgh, D.R., Shen, L., Turner, J.R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory Investigation; A journal of Technical Methods and Pathology*, 84(3):282-91. doi:10.1038/labinvest.3700050.
- Clemente, M.G., De Virgiliis, S., Kang, J.S., Macatagney, R., Musu, M.P., Di Pierro, M.R., Drago, S., Congia, M., Fasano, A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52(2):218-23. doi:10.1136/gut.52.2.218.
- Clemente, M.G., Musu, M.P., Troncone, R., Volta, U., Congia, M., Ciacci, C., Neri, E., Not, T., Maggiore, G., Strisciuglio, P., Corazza, G.R., Gasbarrini, G., Cicotto, L., Sole, G., Fasano, A., De Virgiliis, S. (2004). Enterocyte actin autoantibody detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis: results of a multicenter study. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(8):1551-6. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30296.x.
- Compare, D., Coccoli, P., Rocco, A., Nardone, O.M., De Maria, S., Carteni, M., Nardone, G. (2012). Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases:NMCD*, 22(6):471-6. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.007.
- Conway, P.L. (1994). Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant, W.B., Hagemester, H. (Eds.), *Proceedings of the Vith International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* (pp. 231–240). Dummerstof EAAP Publication.



- Correale, J., Villa, A. (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, 40(2):148-60. doi:10.1080/08916930601183522.
- Davin, R., Manzanilla, E.G., Klasing, K.C., Perez, J.F. (2012). Evolution of zinc, iron, and copper concentrations along the gastrointestinal tract of piglets weaned with or without in-feed high doses of zinc oxide compared to unweaned littermates. *Journal of Animal Science*, 90 Suppl 4:248-50. doi: 10.2527/jas.53999.
- Davin, R., Manzanilla, E.G., Klasing, K.C., Perez, J.F. (2013). Effect of weaning and in-feed high doses of zinc oxide on zinc levels in different body compartments of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition(Berl)*, 97 Suppl 1:6-12. doi:10.1111/jpn.12046.
- De Magistris, L., Secondulfo, M., Iafusco, D., Carbone, A.G., Urio, A., Pontoni, G., Carratu, R. (1996). Altered mannitol absorption in diabetic children. *The Italian Journal of Gastroenterology*, 28(6):367. PMID: 8891852
- Deeks, S.G., Tracy, R., Douek, D.C. (2013). Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*, 39(4):633-45. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.001.
- Diamanti-Kandarakis, E., Kandarakis, H., Legro, R.S. (2006). The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine*, 30(1):19-26. doi:10.1385/ENDO:30:1:19.
- Diaz-Coranguez, M., Segovia, J., Lopez-Ornelas, A., Puerta-Guardo, H., Ludert, J., Chavez, B., Meraz-Cruz, N., Gonzalez-Mariscal, L. (2013). Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One*, 8(4): e60655. doi:10.1371/journal.pone.0060655
- Dietert, R.R., Silbergeld, E.K. (2015). Biomarkers for the 21st century: listening to the microbiome. *Toxicological Sciences:an official journal of the Society of Toxicology*, 144(2):208-16. doi: 10.1093/toxsci/kfv013.
- Dinesh, N., Slovak, J.E., Kogan, C., Kopper, J.J. (2022). Preliminary evaluation of serum zonulin in canine chronic enteropathies. *The Journal of Small Animal Practice*, doi:10.1111/jsap.13506. PMID: 35535433.

- Di Pierro, M., Lu, R., Uzzau, S., Wang, W., Margaretten, K., Pazzani, C., Maimone, F., Fasano, A. (2001) Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22):19160-5. doi:10.1074/jbc.M009674200.
- Drago, S., El Asmar, R., Di Pierro, M., Clemente M.G., Tripathi, A., Sapone, A., Thakar, M., Iacono, G., Carroccio, A., D'Agate, C., Not, T., Zampini, L., Catassi, C., Fasano, A. (2006). Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(4):408-19. doi:10.1080/00365520500235334.
- Duseja, A., Chawla, Y.K. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clinics in Liver Disease*, 18(1):59-71. doi:10.1016/j.cld.2013.09.002.
- D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., Giardini, O. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatrica*, 85(9):1076-9. doi:10.1111/j.1651-2227.1996.tb14220.x.
- El Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G.V., Catassi, C., Fasano, A. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, 123(5):1607-15. doi:10.1053/gast.2002.36578.
- Eurich, D.T., Johnstone, J.J., Minhas-Sandhu, J.K., Marrie, T.J., Majumdar, S.R. (2012). Pneumococcal vaccination and risk of acute coronary syndromes in patients with pneumonia: population-based cohort study. *Heart*, 98(14):1072-7. doi:10.1136/heartjnl-2012-301743.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17(2):375-412. doi: 10.1083/jcb.17.2.375.
- Fasano, A. (1998). Innovative strategies for the oral delivery of drugs and macromolecules. *Trends in Biotechnology*, 16(4):152-7. doi:10.1016/s0167-7799(97)01170-0.
- Fasano, A. (1999). Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *The American Journal of Physiology*, 276(4):C765-76. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.4.C765.

- Fasano, A. (2001). Intestinal zonulin: open sesame! *Gut*,49(2): 159–162.doi:10.1136/gut.49.2.159
- Fasano, A. (2001). Pathological and therapeutical implications of macromolecule passage through the tight junction. *In: Tight Junctions* (p. 697–722). Boca Raton.
- Fasano, A. (2008). Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *The American Journal of Pathology*, 173(5): 1243–1252.doi:10.2353/ajpath.2008.080192
- Fasano, A. (2000). Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 915:214-22. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05244.x.
- Fasano, A. (2011). Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, 91(1):151-75. doi:10.1152/physrev.00003.2008.
- Fasano, A. (2020). All disease begins in the (leaky) gut: Role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000 Research*,9:F1000 Faculty Rev-69. doi:10.12688/f1000research.20510.1.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumplun, D.W., Wasserman, S.S., Tall, B.D., Ketley, J.M., Kaper, J.B. (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88(12): 5242–5246.doi:10.1073/pnas.88.12.5242
- Fasano, A., Fiorentini, C., Donelli, G., Uzzau, S., Kaper, J.B., Margaretten, K., Ding, X., Guandalini, S., Comstock, L., Goldblum, S.E. (1995). Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*,96(2):710-20.doi:10.1172/JCI118114.
- Fasano, A., Nataro, J.P. (2004). Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6):795-807.doi:10.1016/j.addr.2003.10.045.

- Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A., Goldblum, S.E. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*, 355(9214):1518-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02169-3.
- Fasano, A., Shea-Donohue, T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology*,2(9):416-22. doi: 10.1038/ncpgasthep0259.
- Fasano, A., Uzzau, S. (1997). Modulation of intestinal tight junctions by zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(6): 1158–1164. doi:10.1172/JCI119271
- Fasano, A., Uzzau, S., Fiore, C., Margaretten K. (1997). The enterotoxic effect of zonula occludens toxin (Zot) on rabbit small intestine involves the paracellular pathway. *Gastroenterology*, 112(3):839-46. doi: 10.1053/gast.1997.v112.pm9041245.
- Feldman, M., Schiller, L.R. (1983). Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*,98(3):378-84. doi:10.7326/0003-4819-98-3-378.
- Ferraris, R.P., Vinnakota, R.R. (1995). Intestinal nutrient transport in genetically obese mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*,62(3):540-6. doi:10.1093/ajcn/62.3.540.
- Fleming, T.P., Ghassemifar, M.R., Sheth, B. (2000). Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18(2):185-93. doi:10.1055/s-2000-12557.
- Furness, J.B., Cottrell, J.J. (2017). Signalling from the gut lumen. *Animal Production Science*, 57, 2175–2187. doi:10.1071/AN17276
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.J., Bravo, D.M., Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*,10(12):729-40. doi:10.1038/nrgastro.2013.180.

- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7):1539-50. doi: 10.1083/jcb.141.7.1539.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123(6 Pt 2):1777-88. doi:10.1083/jcb.123.6.1777.
- Furuse, M., Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology*, 16(4):181-8. doi:10.1016/j.tcb.2006.02.006.
- Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., Malagelada, J. (2001). Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut*, 48(4): 503–507. doi:10.1136/gut.48.4.503
- Gopalakrishnan, S., Durai, M., Kitchens, K., Tamiz, A.P., Somerville, R., Ginski, M., Paterson, B.M., Murray, J.A., Verdu, E.F., Alkan, S.S., Pandey N.B. (2012). Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides*, 35(1):86-94. doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.015.
- Guerrant, R.L., Leite, A.M., Pinkerton, R., Medeiros, P.H., Cavalcante, P.A., DeBoer, M., Kosek, M., Duggan, C., Gewirtz, A., Kagan, J.C., Gauthier A.E., Swann, J., Mayneris-Perxachs, J., Bolick, D.T., Maier, E.A., Guedes, M.M., Moore, S.R., Petri, W.A., Havt, A., Lima, I.F., Prata, M.M., Michaleckyj, J.C., Scharf, R.J., Sturgeon, C., Fasano, A., Lima, A.A. (2016). Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. *PLoS One*, 11(9):e0158772. doi:10.1371/journal.pone.0158772.
- Guttman, J.A.; Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4):832-41. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.028.
- Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., Furuse, M. (2013). Analysis of the ‘angulin’ proteins LSR, ILDR1 and ILDR2—tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 4):966-77. doi:10.1242/jcs.116442.

- Hijazi, Z., Molla, A.M., Al-Habashi, H., Muawad, W.M., Molla, A.M., Sharma, P.N. (2004). Intestinal permeability is increased in bronchial asthma. *Archives of Disease in Childhood*, 89(3):227-9.doi:10.1136/adc.2003.027680.
- Högberg, N., Stenback, A., Carlsson, P., Wanders, A., Lilja, H.E. (2013). Genes regulating tight junctions and cell adhesion are altered in early experimental necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(11):2308-12.doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.06.027.
- Hollon, J., Puppa, E.L., Greenwald, B., Goldberg, E., Guerrero, A., Fasano A. (2015). Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients*,7(3): 1565–1576.doi:10.3390/nu7031565
- Hunt, P.W., Sinclair, E., Rodriguez, B., Shive, C., Clagett, B., Funderburg, N., Robinson, J., Huang, Y., Epling, L., Martin, J.N., Deeks, S.G., Meinert, C.L., Natta, M.L., Jabs, D.A., Lederman, M.M. (2014). Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(8):1228-38.doi:10.1093/infdis/jiu238.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*,171(6):939-45. doi:10.1083/jcb.200510043.
- Isolauri, E., Kaila, M., Arvola, T., Majamaa, H., Rantala, I., Virtanen, E., Arvilommi, H. (1993).Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Pediatric Research*, 33:548–553. <https://doi.org/10.1203/00006450-199306000-00002>
- Guttman, J.A., Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4):832-41. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.028.

- Jayashree, B., Bibin, Y.S., Prabhu, D., Shanthirani, C.S., Gokulakrishnan, K., Lakshmi, B.S., Mohan, V., Balasubramanyam, M. (2014). Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 388(1-2):203-10. doi: 10.1007/s11010-013-1911-4.
- Malickova, K., Francova, I., Lukas, M., Kolar, M., Kralikova, E., Bortlik, M., Duricova, D., Stepankova, L., Zvolaska, K., Pankova, A., Zima, T. (2017). Fecal zonulin is elevated in Crohn's disease and in cigarette smokers. *Practical Laboratory Medicine*, 9:39-44. doi:10.1016/j.plabm.2017.09.001.
- Karyekar, C.S., Fasano, A., Raje, S., Lu, R., Dowling, T.C., Eddington, N.D. (2003). Zonula occludens toxin increases the permeability of molecular weight markers and chemotherapeutic agents across the bovine brain microvessel endothelial cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(2):414-23. doi: 10.1002/jps.10310.
- Kim, C.H., Kim, D., Ha, Y., Cho, K.D., Lee, B.H., Seo, I.W., Kim, S.H., Chae, C. (2009). Expression of mucins and trefoil factor family protein-1 in the colon of pigs naturally infected with *Salmonella typhimurium*. *Journal of Comparative Pathology*, 140(1):38-42. doi: 10.1016/j.jcpa.2008.10.002.
- Klaus, D.A., Motal, M.C., Burger-Klepp, U., Marschalek, C., Schmidt, E.M., Lebherz-Eichinger, D., Krenn, C.G., Roth, G.A. Increased plasma zonulin in patients with sepsis. *Biochimica Medica (Zagreb)*, 23(1): 107–111. PMID:23457771.
- Knutson, T.W., Bengtsson, U., Dannaeus, A., Ahlstedt, S., Knutson, L. (1996). Effects of luminal antigen on intestinal albumin and hyaluronan permeability and ion transport in atopic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(6):1225-32. doi:10.1016/s0091-6749(96)70189-6.
- Kogut, M.H., Arsenault, R.J. (2016). Editorial: gut health: the new paradigm in food animal production. *Frontiers in Veterinary Science*, 3: 71. doi: 10.3389/fvets.2016.00071
- Kort, S., Keszthelyi, D., Masclee, A.A. (2011). Leaky gut and diabetes mellitus: What is the link? *Obesity Reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12(6):449-58. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00845.x.

- Koutsos, E.A., Calvert, C.C., Klasing, K.C. (2003). The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 135(4):635-46. doi: 10.1016/s1095-6433(03)00158-2.
- Koutsos, E.A., Garcia Lopez, J.C., Klasing, K.C. (2006). Carotenoids from in ovo or dietary sources blunt systemic indices of the inflammatory response in growing chicks (*Gallus gallus domesticus*). *The Journal of Nutrition*, 136(4):1027-31. doi:10.1093/jn/136.4.1027.
- Krumbhaar, E.B. (1916). Spontaneous Diabetes in a Dog. *The Journal of Experimental Medicine*, 24(4):361-5. doi: 10.1084/jem.24.4.361.
- Küme, T., Acar, S., Tuhan, H., Çatlı, G., Anık, A., Çalan, Ö.G., Böber, E., Abacı, A. (2017). The Relationship between Serum Zonulin Level and Clinical and Laboratory Parameters of Childhood Obesity. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 9(1): 31–38. doi:10.4274/jcrpe.3682
- Biedermann, L., Zeitz, J., Mwinyi, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S.J., Steurer-Stey, C., Frei, A., Frei, P., Scharl, M., Loessner, M.J., Vavricka, S.R., Fried, M., Schreiber, S., Schuppler, M., Rogler, G. (2013). Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One*, 8(3):e59260. doi:10.1371/journal.pone.0059260.
- Biedermann, L., Brülisauer, K., Zeitz, J., Frei, P., Scharl, M., Vavricka, S.R., Fried, M., Loessner, M.J., Rogler, G., Schuppler, M. (2014). Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(9):1496-501. doi:10.1097/MIB.000000000000129.
- Lammers, K.M., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S., Netzel-Arnett, S., Antalis, T., Vogel, S.N., Fasano, A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*, 135(1):194-204.e3. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.023.



- Laukoetter, M.G., Bruewer, M., Nusrat, A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Current Opinion in Gastroenterology*, 22(2):85-9. doi:10.1097/01.mog.0000203864.48255.4f.
- Lee, W.J., Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6):416-24. doi:10.1038/nchembio.1535.
- Li, C., Gao, M., Zhang, W., Chen, C., Zhou, F., Hu, Z., Zeng, C. (2016). Zonulin Regulates Intestinal Permeability and Facilitates Enteric Bacteria Permeation in Coronary Artery Disease. *Scientific Reports*, 6: 29142. doi:10.1038/srep29142
- Ling, X., Linglong, P., Weixia, D., Hong, W. (2016). Protective Effects of Bifidobacterium on Intestinal Barrier Function in LPS-Induced Enterocyte Barrier Injury of Caco-2 Monolayers and in a Rat NEC Model. *PLoS One*, 11(8): e0161635. doi:10.1371/journal.pone.0161635
- Liu, Z., Li, C., Huang, M., Tong, C., Zhang, X., Wang, L., Peng, H., Lan, P., Zhang, P., Huang, N., Peng, J., Wu, X., Luo, Y., Qin, H., Kang, L., Wang, J. (2015). Positive regulatory effects of perioperative probiotic treatment on postoperative liver complications after colorectal liver metastases surgery: a double-center and doubleblind randomized clinical trial. *BMC Gastroenterology*, 15:34. doi:10.1186/s12876-015-0260-z.
- Lu, R., Wang, W., Uzzau, S., Vigorito, R., Zielke, H.R., Fasano A. (2000). Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (Zot) receptor from human brain. *Journal of Neurochemistry*, 74(1):320-6. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740320.x.
- Madara, J.L. (1989). Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(4): 1089–1094. doi:10.1172/JCI113987
- Madara, J.L., Dharmasathaphorn, K. (1985). Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *The Journal of Cell Biology*, 101(6):2124-33. doi:10.1083/jcb.101.6.2124.
- Madara, J.L., Pappenheimer, J.R. (1987). Structural basis for physiological regulations of paracellular pathways in intestinal epithelia. *The Journal of Membrane Biology*, 100(2):149-64. doi:10.1007/BF02209147.

- Madara, J.L., Trier, J.S. (1980). Structural abnormalities of jejunal epithelial cell membranes in celiac sprue. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*, 43(3):254-61.
- Magnuson, T., Jacobson, J.B., Stackpole, C.W. (1978). Relationship between intercellular permeability and junction organization in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 67(1):214-24. doi:10.1016/0012-1606(78)90310-x.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., (2015). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2):330-9. doi:10.1136/gutjnl-2015-309990.
- Marcial, M.A., Carlson, S.L., Madara, J.L. (1984). Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure-function relationships. *The Journal of Membrane Biology*, 80(1):59-70. doi:10.1007/BF01868690.
- Marinaro, M., Di Tommaso, A., Uzzau, S., Fasano, A., De Magistris, M.T. (1999). Zonula occludens toxin is a powerful mucosal adjuvant for intranasally delivered antigens. *Infection and Immunity*, 67(3):1287-91. doi:10.1128/IAI.67.3.1287-1291.1999.
- Marinaro, M., Fasano, A., De Magistris, M.T. (2003). Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses. *Infection and Immunity*, 71(4): 1897–1902. doi:10.1128/IAI.71.4.1897-1902.2003
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of Cell Biology*, 142(1):117-27. doi:10.1083/jcb.142.1.117.
- Martin, V.J., Leonard, M.M., Fiechtner, L., Fasano, A. (2016). Transitioning from descriptive to mechanistic understanding of the microbiome: the need for a prospective longitudinal approach to predicting disease. *The Journal of Pediatrics*, 179: 240–248. doi:10.1016/j.jpeds.2016.08.049

- Mazariegos, M.R., Tice, L.W., Hand, A.R. (1984). Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproterenol stimulation. *The Journal of Cell Biology*, 98(5):1865-77. doi:10.1083/jcb.98.5.1865.
- Meddings, J.B., Jarand, J., Urbanski, S.J., Hardin, J., Gall, D.G. (1999). Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *The American Journal of Physiology*, 276(4):G951-7. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.4.G951.
- Menon, D., Karyekar, C.S., Fasano, A., Lu, R., Eddington, N.D. (2005). Enhancement of brain distribution of anticancer agents using DeltaG, the 12 kDa active fragment of ZOT. *International Journal of Pharmaceutics*, 306(1-2):122-31. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.09.006.
- Mielants, H., De Vos, M., Goemaere, S., Schelstraete, K., Cuvelier, C., Goethals, K., Maertens, M., Ackerman, C., Veys, E.M. (1991). Intestinal mucosal permeability in inflammatory rheumatic diseases. II. Role of disease. *The Journal of Rheumatology*, 18(3):394-400. PMID:1906939
- Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Mascianà, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., Vecchio, F.M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C.P., Grieco, A. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 49(6):1877-87. doi:10.1002/hep.22848.
- Mooradian, A.D., Morley, J.E., Levine, A.S., Prigge, W.F., Gebhard, R.L. (1986). Abnormal intestinal permeability to sugars in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 29(4):221-4. doi:10.1007/BF00454879.
- Moreno-Navarrete, J.M., Sabater, M., Ortega, F., Ricart, W., Fernandez-Real, J.M. (2012). Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One*, 7(5):e37160. doi:10.1371/journal.pone.0037160.

- Morgan, L., Shah, B., Rivers, L.E., Barden, L., Groom, A.J., Chung, R., Higazi, D., Desmond, H., Smith, T., Staddon, J.M. (2007). Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience*, 147(3):664-73. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.051.
- Neumann, T., Lulsdorf, K.A., Krings, P., Reinsch, N., Erbel, R. (2011). Coronary artery disease in HIV-infected subjects. Results of 101 coronary angiographies. *Herz*, 36(1):18-23. doi:10.1007/s00059-010-3410-7.
- Nouri, M., Bredberg, A., Westrom, B., Lavasani, S. (2014). Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One*, 9(9):e106335. doi:10.1371/journal.pone.0106335.
- Noverr, M.C., Huffnagle, G.B. (2005). The ‘microflora hypothesis’ of allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society Allergy and Clinical Immunology*, 35(12):1511-20. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02379.x.
- Oliviero, S., Cortese, R. (1989). The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6-responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. *The EMBO Journal*, 8(4):1145-51. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb03485.x.
- Olszanecka-Glinianowicz, M., Chudek, J., Kocelak, P., Szromek, A., Zahorska-Markiewicz, B. (2011). Body fat changes and activity of tumor necrosis factor a system—a 5-year follow-up study. *Metabolism: clinical and experimental*, 60(4):531-6. doi:10.1016/j.metabol.2010.04.023.
- Olszanecka-Glinianowicz, M., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Zurakowski, A. (2004). Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism: clinical and experimental*, 53(10):1268-73. doi:10.1016/j.metabol.2004.07.001.
- Pacifico, L., Bonci, E., Marandola, L., Romaggioli, S., Bascetta, S., Chiesa, C. (2014). Increased circulating zonulin in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(45): 17107–17114. doi:10.3748/wjg.v20.i45.17107

- Peeters, M., Geypens, B., Claus, D., Nevens, H., Ghoo, Y., Verbeke, G., Baert, F., Vermeire, S., Vlietinck, R., Rutgeerts, P. (1997). Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 113(3):802-7. doi:10.1016/s0016-5085(97)70174-4.
- Rentea, R.M., Liedel, J.L., Welak, S.R., Cassidy, L.D., Mayer, A.N., Pritchard, K.A., Oldham, K.T., Gourlay, D.M. (2012). Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *Journal of Pediatric Surgery*, 47:1135-42. doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.03.018
- Revel, J.P., Brown, S.S. (1976). Cell junctions in development with particular reference to the neural tube. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 40:443-55. doi:10.1101/sqb.1976.040.01.042.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., Nadeau, B.A., Day, D.E., Huber-Lang, M.S., Grailer, J.J., Zetoune, F.S., Andjelkovic, A.V., Fasano, A., Ward, P.A. Zonulin as prehepato-globin2 regulates lung permeability and activates the complement system. (2013). *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(12): L863–L872. doi:10.1152/ajplung.00196.2012
- Rossi, M., Maurano, F., Luongo, D., Fasano, A., Uzzau, S., Auricchio, S., Troncone, R. (2002). Zonula occludens toxin (Zot) interferes with the induction of nasal tolerance to gliadin. *Immunology Letters*, 81: 217–221, 2002.
- Rossi, G., Gavazza, A., Vincenzetti, S., Mangiaterra, S., Galosi, L., Marchegiani, A., Pengo, G., Sagratini, G., Ricciutelli, M., Cerquetella, M. (2021). Clinicopathological and Fecal Proteome Evaluations in 16 Dogs Presenting Chronic Diarrhea Associated with Lymphangiectasia. *Veterinary Sciences*. 8(10): 242. doi:[10.3390/vetsci8100242](https://doi.org/10.3390/vetsci8100242)
- Buhner, S., Buning C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt H.H., Lochs, H. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*, 55(3):342-7. doi:10.1136/gut.2005.065557.

- Romero, E.S., Cotoner, C.A., Camacho, C.P., Bedmar, M.A., Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas:Organo Oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 107(11):686-96.doi:10.17235/reed.2015.3846/2015.
- Sandler, N.G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M.C., Nixon, D.E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S.R., Emery, S., Neaton, J.D., Brenchley J.M., Deeks, S.G., Sereti, I., Douek, D.C. (2011). Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 203:780-90. PMID:21252259.
- Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M.G.,Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni,M., Generoso, M., Lafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D., Fasano, A. (2006). Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 55(5):1443-9.doi:10.2337/db05-1593.
- Sardet, C., Pisam, M., Maetz, J. (1979). The surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. *Journal of Cell Biology*,80 (1): 96–117. <https://doi.org/10.1083/jcb.80.1.96>
- Scheffler, L., Crane, A., Heyne, H., Tönjes, A., Schleinitz, D., Ihling, C.H., Stumvoll, M., Freire, R., Fiorentino, M., Fasano, A., Kovacs, P., Heiker, J.T. (2018). Widely Used Commercial ELISA Does Not Detect Precursor of Haptoglobin2, but Recognizes Properdin as a Potential Second Member of the Zonulin Family. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 22. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.0002>
- Villar, S.S., Sainz, T., Ma, Z.M., Utay, N.S., Chun, T.W., Mann, S., Kashuba, A.D., Siewe, B., Albanese, A., Cancio P.T., Sinclair E., Somasunderam, A., Yotter, T., Deeks, S.G., Landay, A., Pollard, R.B., Miller, C.J., Moreno, S., Asmuth, D.M. (2016). Effects of Combined CCR5/Integrase Inhibitors-Based Regimen on Mucosal Immunity in HIV Infected Patients Naive to Antiretroviral Therapy: A Pilot Randomized Trial. *PLoS Pathogens*, 12(1): e1005381.doi:10.1371/journal.ppat.1005381

- Severs, M., van Erp, S.J.H., van der Walk, M.E., Mangen, M.J.J., Fidder, H.H., van der Have, M., van Bodegraven, A.A., de Jong, D.J., van der Woude, C.J., Romberg-Camps, M.J.L., Clemens, C.H.M., Jansen J.M., van de Meeberg, P.C., Mahmmod, N., Ponsieon, C.Y., Bolwerk, C., Vermeijden J.R., Pierik, M.J., Siersema, P.D., Leenders, M., van der Meulen-de Jong, A.E., Dijkstra, G., Oldenburg, B. (2016). Smoking is associated with extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 10(4):455-61. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv238.
- Shen, L., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Yu, D., Turner, J.R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual Review of Physiology*, 73:283-309. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142150.
- Shiou SR, Yu Y, Chen S, Ciancio MJ, Petrof EO, Sun J, Claud EC. Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *J Biol Chem* 2011; 286:12123-32; PMID:21262973;http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.154625
- Shivappa, N., Steck, S.E., Hurley, T.G., Hussey, J.R., Hébert, J.R. (2014). Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutrition*, 17(8):1689-96. doi:10.1017/S1368980013002115.
- Skardelly, M., Armbruster, F.P., Meixensberger, J., Hilbig, H. (2009). Expression of Zonulin, c-kit, and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Gliomas. *Translational Oncology*, 2(3):117-20. doi:10.1593/tlo.09115.
- Smecuol, E., Sugai, E., Niveloni, S., Vazquez, H., Pedreira, S., Mazure, R., Moreno, M.L., Label, M., Maurino, E., Fasano, A., Meddings, J., Bai, J.C. (2005). Permeability, zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 3(4):335-41. doi:10.1016/s1542-3565(04)00778-5.
- Steinert, R.E., Feinle-Bisset, C., Geary, N., Beglinger, C. (2013). Digestive physiology of the pig symposium: secretion of gastrointestinal hormones and eating control. *Journal of Animal Science*, 91(5):1963-73. doi:10.2527/jas.2012-6022.

- Sturgeon, C., Fasano, A. (2016). Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*, 4(4):e1251384. doi:10.1080/21688370.2016.1251384.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 299(6710):1259-60. doi:10.1136/bmj.299.6710.1259.
- Szymanska, E.; Wierzbicka, A.; Dadalski, M.; Kierkus, J. (2021). Fecal Zonulin as a Noninvasive Biomarker of Intestinal Permeability in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Diseases—Correlation with Disease Activity and Fecal Calprotectin. *Journal of Clinical Medicine*, 10(17): 3905. doi:10.3390/jcm10173905
- Birrenbach, T., Böcker, U. (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications, *Inflammatory Bowel Diseases*, 10(6):848-59. doi:10.1097/00054725-200411000-00019.
- Vanuytsel, T., Vermeire, S., Cleynen, I. (2013). The role of Haptoglobin and its related protein, Zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue Barriers*, 1(5): e27321. doi:10.4161/tisb.27321
- Tatucu-Babet, O.A., Forsyth, A., Owen, E., Navarro-Perez, D., Radcliffe, J., Benheim, D., Mendis, H., Jois, M., Itsiopoulos, C., Tierney, A.C. (2020). Serum zonulin measured by enzyme-linked immunosorbent assay may not be a reliable marker of small intestinal permeability in healthy adults. *Nutrition Research*, 78, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.003>
- Teahon, K., Smethurst, P., Levi, A.J., Menzies, I.S., Bjarnason, I. (1992). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut*, 33(3):320-3. doi:10.1136/gut.33.3.320.
- Tenorio, A.R., Zheng, Y., Bosch, R.J., Krishnan, S., Rodriguez, B., Hunt, P.W., Plants, J., Seth, A., Wilson, C.C., Deeks, S.G., Lederman, M.M., Landay, A.L. (2014). Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(8):1248-59. doi:10.1093/infdis/jiu254.



- Thomas, K.E., Sapone, A., Fasano, A., Vogel, S.N. (2006). Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(4):2512-21. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2512.
- Tilg, H., Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5):1836-46. doi:10.1002/hep.24001.
- Tripathi, A., Lammers, K.M., Goldblum, S., Shea-Donohue, T., Netzel-Arnett, S., Buzza, M.S., Antalis, T.M., Vogel, S.N., Zhao, A., Yang, S., Arrietta, M.C., Meddings, J.B., Fasano, A. (2009) Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39):16799-804. doi:10.1073/pnas.0906773106.
- Turner, D., Levine, A., Walters, T.D., Focht, G., Otley, A., López, V.N., Koletzko, S., Baldassano, R., Mack, D., Hyams, J., Griffiths A.M. (2017). Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(2):254-260. doi:10.1097/MPG.0000000000001227.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews, Immunology*, 9(11):799-809. doi:10.1038/nri2653.
- Turner, J.R. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American Journal of Pathology*, 169(6):1901-9. doi:10.2353/ajpath.2006.060681.
- Vajro, P., Paoletta, G., Fasano, A. (2013). Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5):461-8. doi: 10.1097/MPG.0b013e318284abb5.

- Vcev, A., Nakic, D., Mrden, A., Mirat, J., Balen, S., Ruzic, A., Persic, V., Soldo, I., Matijevic M., Barbic, J., Matijevic, V., Bozic, D., Radanovic, B. (2007). Helicobacter pylori infection and coronary artery disease. *Collegium Antropologicum*, 31:757-60. PMID:18041385
- Ventura, A., Magazzu, G., Greco, L. (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in celiac patients. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*, 117(2):297-303. doi:10.1053/gast.1999.0029900297.
- Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., Frati, F. (2008). Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Immunology*, 153 Suppl 1(Suppl 1):3-6. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03713.x.
- Visser, J.T., Lammers, K., Hoogendijk, A., Boer, M.W., Brugman, S., Beijer-Liefers, S., Zandvoort, A., Harmsen, H., Welling, G., Stellaard, F., Bos, N.A., Fasano, A., rozing, J. Restoration of impaired intestinal barrier function by the hydrolysed casein diet contributes to the prevention of type 1 diabetes in the diabetes-prone BioBreeding rat. *Diabetologia*, 2621–2628. doi:10.1007/s00125-010-1903-9
- Volta, U., Caio, G., Tovoli, F., De Giorgio, R. (2013). Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cellular & Molecular Immunology*, 10(5):383-92. doi:10.1038/cmi.2013.28.
- Vojdani, A., Vojdani, E., Kharrazian, D. (2017). Fluctuation of zonulin levels in blood vs stability of antibodies. *World Journal of Gastroenterology*, 23(31): 5669–5679. doi:10.3748/wjg.v23.i31.5669
- Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., Turner, J.R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American Journal of Pathology*, 166(2):409-19. doi:10.1016/s0002-9440(10)62264-x.

- Wang, F., Schwarz, B.T., Graham, W.V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D.R., Abraham, C., Turner, J.R. (2006). IFN-gamma-induced TNFR2 upregulation is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*, 131(4): 1153–1163. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.022
- Wang, W., Uzzau, S., Goldblum, S.E., Fasano, A. (2000). Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 24:4435-40. doi:10.1242/jcs.113.24.4435.
- Ware, L.B., Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 342(18):1334-49. doi:10.1056/NEJM200005043421806.
- Watts, T., Berti, I., Sapone, A., Gerarduzzi, T., Not, T., Zielke, R., Fasano, A. (2005). Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8):2916-21. doi: 10.1073/pnas.0500178102.
- Watts T., Not T., Berti I., *et al.* Alterations in zonulin secretion parallels changes in intestinal permeability and precede the onset of diabetes in BB/Wor diabetic rats. *Journal of Investigative Medicine*, 2000:48:184.
- Weber, C.R., Turner, J.R. (2007). Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut*, 56(1):6-8. doi:10.1136/gut.2006.104182.
- Wegh, C.A.M., de Roos, N.M., Hovenier, R., Meijerink, J., Besseling-van der Vaart, I., van Hemert, S., Wittemen, B.J.M. (2019). Intestinal Permeability Measured by Urinary Sucrose Excretion Correlates with Serum Zonulin and Faecal Calprotectin Concentrations in UC Patients in Remission. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2019:2472754. doi:10.1155/2019/2472754.
- Willing, B.P., Van Kessel, A.G. (2010). Host pathways for recognition: establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. *Livestock Science*, 133, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.031>
- Yegani, M., Korver, D.R., (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87(10):2052-63. doi:10.3382/ps.2008-00091.

- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hübl, W., Waldhöer, T., Lochs, H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet (London, England)*, 341(8858):1437-9. doi: 10.1016/0140-6736(93)90882-h.
- Xavier, R.J., Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152):427-34. doi: 10.1038/nature06005.
- Yacyshyn, B.R., Meddings, J.B. (1995). CD45RO expression on circulating CD19 B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology*, 108(1):132-7. doi:10.1016/0016-5085(95)90017-9.
- Yacyshyn, B., Meddings, J., Sadowski, D., Bowen-Yacyshyn, M.B. (1996). Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO<sup>+</sup>B cells and increased intestinal permeability. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(12):2493-8. doi:10.1007/BF02100148.
- Yegani, M., Korver, D.R. (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87(10):2052-63. doi:10.3382/ps.2008-00091.
- Yoseph, B.P., Klingensmith, N.J., Liang, Z., Breed, E.R., Burd, E.M., Mittal, R., Dominguez, J.A., Petrie, B., Ford, M.L., Coopersmith, C.M. (2016). Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock*, 46(1):52-9. doi:10.1097/SHK.0000000000000565.
- Yu, Q.H., Yang, Q. (2009). Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biology International*, 33(1):78-82. doi:10.1016/j.cellbi.2008.09.007.
- Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Olszanecka-Glinianowicz, M., Zurakowski, A. (2000). Serum concentrations of TNF- $\alpha$  and soluble TNF- $\alpha$  receptors in obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: journal of the International Association for the study of Obesity*, 24(11):1392-5. doi:10.1038/sj.ijo.0801398.

- Zak-Golab, A., Kocelak, P., Aptekorz, M., Zientara, M., Juszczyk, L., Martirosian, G., Chudek, J., Olszanecka-Glinianowicz, M. (2013). Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile, and zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *International Journal of Endocrinology*, 2013:674106. doi:10.1155/2013/674106.
- Zhang, D., Zhang, L., Zheng, Y., Yue, F., Russell, R.D., Zeng, Y. (2014). Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 106(2):312-8. doi:10.1016/j.diabres.2014.08.017.
- Zhang, D., Zhang, L., Yue, F., Zheng, Y., Russell, R. (2015). Serum zonulin is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance and severity of anovulation. *European Journal of Endocrinology*, 172(1):29-36. doi:10.1530/EJE-14-0589.

# EKLER

## Ek 1

Doktora Tezi Hasta Bilgi Formu

Veteriner Hekim Deniz ŞARDAĞ

Anamnez:

İrk:

Yaş:

Cinsiyet:

Eşkal:

Parvoviral gastroenterit:

- Progresif Dehidrasyon  
 Kusma  
 Diyare (mukoid-kanlı)  Diğer  
 Lökopeni  Lökositoz  Diğer  
 Hipertermi  Hipotermi  Diğer  
 Myokarditis  
 Hızlı test kiti sonucu (ELISA)  
Numune:  Dışkı  Serum

Distemper:

- Nörolojik form  Oküler form  
 Gastrointestinal form  Solunum formu  
 Deri formu  
 Hızlı test kiti sonucu (ELISA)  
 Diğer  
Numune:  Dışkı  Serum

Giardiazis

- Dehidrasyon  
 Kusma  
 Diyare (mukoid-kanlı)  Diğer  
 Direkt Smear sonucu  
 Mikroskopi (Trofozoit kist)  
 Fekal Elisa  
Numune:  Dışkı  Serum

Corona-Rotavirus:

- Dehidrasyon  
 Kusma  
 Diyare (mukoid-kanlı)  Diğer  
 Bronkopnömoni  
 Hızlı test kiti sonucu (ELISA)  
Numune:  Dışkı  Serum

Non-Infeksiyöz Diyare:

- Progresif Dehidrasyon  
 Diyare (mukoid-kanlı)  Diğer  
Numune:  Dışkı  Serum

Diğer:

# ADÜ HAYEK RAPORU



T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 09/07/2020

**Oturum** : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2020 Yılı II. Oturum  
**Sayı** : 64583101/2020/045  
**Proje Başlığı** : Köpeklerde gastroenteritise neden olan bazı enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalıklarda serum ve fekal zonulin seviyelerinin tespiti  
**Proje Yürütücüsü** : Kerem URAL  
**Proje Ekibi** : Deniz ŞARDAĞ  
**Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:**  
İnsan embriyosu ve fütüsü kullanılması  
İnsan embriyosu ve fütüsü dokularının kullanılması  
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması  
**Hayvan Çalışması**  
İnsanlarda araştırma  
İnsan olmayan primatların kullanılması  
Transgenik hayvanların kullanılması  
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

**Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.**

Prof. Dr. Feri SARIERLER  
Başkan

Prof. Dr. M. Dincer BILGİLİ  
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Tahir DOST  
Üye

Prof. Dr. Özgür TÜRKÖZAN  
Üye

Prof. Dr. İyıl SÖNMEZ  
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI  
Üye

(Yüksek İzmit)

Dr. Öğr. Üyesi Umut  
DEMETÖĞLÜ  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder  
ÇİTÇİNDAG  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Solmaz  
KARAVANLAN  
Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Gülce  
GÜLER Sor. Vet. Hek.

Şenay TEKİNBAŞ  
HAYTAP Üye

İhsan AKMAN  
Serbest Vet. Hek. Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ  
Sor. Vet. Hek.

Mustafa COBANOGULLU  
Sivil Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Köpeklerde Gastroenteritise Neden Olan Bazı Enfeksiyöz Ve Non-enfeksiyöz Hastalıklarda Serum Ve Fekal Zonulin Seviyelerinin Tespiti” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Deniz ŞARDAĞ

Öğrencinin Adı ve Soyadı

12 / 09 / 2022



## ÖZ GEÇMİŞ

<b>Soyadı, Adı</b>	: ŞARDAĞ, Deniz
<b>Uyruk</b>	: T.C.
<b>Doğum yeri ve tarihi</b>	: İzmir / 06.05.1988
<b>Yabancı dil</b>	: İngilizce, İtalyanca

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	2022
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2018

### BURLAR, ÖDÜLLER ve SERTİFİKALAR

University of Sassari / Faculty of Mathematical, Physical and Natural Sciences / Department of Botanical, Ecological and Geological Sciences / Professor Antonella Lugliè / Staj sertifikası	2010-2011
University of Sassari / Department of Zoology and Evolutionary Genetics / Ph.D. Marco Casu / Staj sertifikası	2010-2011
University of Sassari / Department of Animal Biology / Section of Parasitology and Parasitic Diseases / Prof. Giovanni Garippa / Uygulamalı Eğitim sertifikası	2010-2011
University of Sassari / Department of Animal Biology / Section of Parasitology and Parasitic Diseases / Prof. Giovanni Garippa / Seminer Katılım sertifikası	2011
University of Sassari / Faculty of Veterinary Medicine / Prof. Giovanni Garippa / Paraziter Hastalıklar Kurs Katılım Sertifikası	2011
ISO 22000 GGYS İç Denetçi / Türkiye / İstanbul	2009
ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel ve Dökümantasyon / Türkiye / İstanbul	2009