

ÖZET

YENİ KULLANIM

Mevcut buluş, bir galaktooligosakkaritin enflamasyonun engellenmesinde, özellikle bağırsak enflamasyonun engellenmesinde kullanımı ile ilgilidir.

5

İSTEMLER

1. Bağırsak enflamatuvar rahatsızlıklarının engellenmesinde kullanım için 3 veya daha fazla bir DP'ye sahip olan bir galaktooligosakkarit olup, burada galaktooligosakkaritler trisakkaritler Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)- Glc, Gal (β 1-3)- Gal (β 1-4)-Glc, tetrasakkarit Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)-Glc ve pentasakkarit Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)-Glc'den oluşan gruptan seçilmektedir.
2. İstem 1'e göre galaktooligosakkarit olup, İstem 1'e göre kullanım için bir toz veya şurup olarak sunulmaktadır.

TARİFNAME

YENİ KULLANIM

Mevcut buluş, bir galaktooligosakkaritin enflamasyonun engellenmesinde, özellikle bağırsak enflamasyonun engellenmesinde kullanımı ile ilgilidir. Galaktooligosakkaritler memeli gastrointestinal sindirim enzimlerine karşı dirençli olan fakat spesifik kolon bakterileri tarafından fermente edilen sindirilemeyen karbonhidratlardır.

İnsan bağırsak florası patojenik, tehlikesiz ve faydalı mikrobiyal cinsler içermektedir. Patojenik olanların baskın olması hem akut (ör. gastroenteritis) hem de kronik (ör. enflamatuvar bağırsak hastalığı ve bazı bağırsak kanserleri) olabilen bağırsak rahatsızlıklarına neden olabilmektedir.

Kolondaki kısıtlı bir sayıda bakterinin veya birinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçime bağlı olarak stimüle ederek konağı faydalı bir şekilde etkileyen, böylelikle konağın sağlığında bir gelişmeye yol açan sindirilemeyen gıda bileşenleri olarak tanımlanan prebiyotiklerin enflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) gibi bir takım enflamatuvar koşullarda dolaylı bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bazı IBD hastalarında adaptif bağışıklık sisteminin komensal bağırsak florasına karşı hiper-duyarlı olduğu bulunmuştur (bkz. Guarner F, Malagelada JR, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., (2003); 17; 793-804). Sonuç olarak prebiyotikler hastalıkta bir nüksün engellenmesine yardımcı olmuş olan faydalı bağırsak mikroflorasını geliştirmek için kullanılmıştır (bkz. Sartor RD., Gastroenterology, (2004), 126, 1620-1633).

Probiyotikler olarak sınıflandırılan bir grup bileşik galaktooligosakkaritlerdir. Bunlar Glc β 1-4 [Gal β 1-6]_n formunun,

burada $n = 2 - 5$, galaktoz içeren oligosakkaritleridir ve enzim β -galaktosidazın transgalaktosilaz aktivitesini kullanarak laktoz şurubundan üretilmektedir (Crittenden, (1999) Probiotics: A Critical Review, Tannock, G. (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, pp 141-156).

EP 1 644 482 sayılı patent belgesi laktozu yeni bir galaktooligosakkarit karışımına çeviren bir galaktosidaz enzimi üreten yeni bir *Bifidobacterium bifidum* suşunu açıklamaktadır. Bu galaktooligosakkarit karışımı disakkaritler Gal (β 1-3) Glc; Gal (β 1-3)-Gal; Gal (β 1-6)-Gal; Gal (α 1-6)-Gal; trisakkaritler Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc veya Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc; tetrasakkarit Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc veya pentasakkarit Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc içermektedir ve prebiyotik özelliklere sahip olduğu ve faydalı bakteriler bifidobakterilerin ve laktik asit bakterilerinin popülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu galaktooligosakkarit karışımı ticari olarak Bimuno (Tescilli Ticari marka) adı altında pazarlanmaktadır ve Clasado Ltd'den (Milton Keynes, BK) bulunmaktadır.

Vulevic, J ve arkadaşları Am. J Clin. Nutr., (2008), 88: 1438-46 yayınında galaktooligosakkaritlerin sağlıklı yaşlı kişilere uygulanmasının hem fekal mikroflora bileşimi hem de bağışıklık tepkisi üzerinde nasıl pozitif etkilerle sonuçlandığını açıklamaktadır.

3 veya daha fazla bir DP'ye (polimerizasyon derecesi) sahip olan bir galaktooligosakkaritin memeli bağırsak mukozasının enflamatuar tepkisini direkt olarak modüle edebildiği gösterilmiştir. Özellikle enflamatuar ajanların mevcudiyetinde pro-enflamatuar kemokin tepkisini azaltmaktadır. Dolayısıyla bu tür bir galaktooligosakkarit

enflamatuar bağırsak hastalığı, kolit, nekrotize enterokolit, psödomembranöz kolit, ülseratif kolit, Crohn hastalığı, divertikülit, iskemi, vs. gibi bağırsak enflamatuar koşullarını tedavi etmekte faydalı olabilmektedir.

- 5 Buluşa göre bağırsak enflamatuar rahatsızlıklarının engellenmesinde kullanım için 3 veya daha fazla bir DP'ye sahip olan bir galaktooligosakkarit sağlanmakta olup, galaktooligosakkaritler trisakkaritler Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)- Glc, Gal (β 1-3)- Gal (β 1-4)- Glc, tetrasakkarit Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)-Glc ve
10 pentasakkarit Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)- Glc'den oluşan gruptan seçilmektedir. Tercihen galaktooligosakkarit 3'ten 5'e kadar bir DP'ye sahiptir.

- Enterositler lüminal çevreyi konaktan ayıran tek bir polarize epitelya tabaka oluşturmaktadır. Bunlar konak savunması için aktif
15 yardımcılarıdır. Bunların herhangi bir enflamatuar uyarıcıya karşı kalıtsal bağışıklık tepkisi birincil olarak epitelyumun bariyer fonksiyonunu hızlı bir şekilde yeniden oluşturmaktan sorumludur. Epitelyum gerekirse nötrofiller gibi kalıtsal bağışıklık hücrelerini hasarlı mukozaya alma prosesini başlatan pro-enflamatuar sitokinleri
20 ve kemokinleri eksprese etmek için indüklenebilmektedir. Örneğin IL-8 gibi pro-inflamatuar kemokinler epitelyal hücreler tarafından ve makrofajlar tarafından nötrofilleri ve PMN'leri (polimorfonükleer lökositler) bir bağışıklık tepkisi sırasında iltihaplı mukozaya almak için uyarabilmektedir. Makrofaj Enflamatuar Protein-3 α (MIP-3 α)
25 veya CCL20 kemokin reseptörü CCR6'nın aktivasyonu aracılığıyla lenfositleri ve dendritik hücreleri aktive ederek adaptif bağışıklık sistemini ortaya çıkaran başka bir kemokindir. IL-8 ve MIP-3 α

(CCL20) indüksiyonu bir enflamasyon zorluğuna karşı tepki derecesini belirtmektedir.

Galaktooligosakkaritin farklı yetiştirkin kolon hücre kültürü modellerinin enflamatuvar tepkisi üzerindeki etkisi çalışılmıştır.

- 5 Beklenmedik bir şekilde fizyolojik konsantrasyonlarda bağırsak epitelyal hücrelerinde, başka bir deyişle insan enterositlerinde TNF- α enflamatuvar uyaran tarafından indüklenen pro-enflamatuvar kemokin tepkisini azaltmaktadır.

- 10 Galaktooligosakkarit örneğin oda sıcaklığında korunan bir Biogel P2 kolonu kullanan örneğin büyüklük dışlanımlı kromatografi kullanarak saflaştırma vasıtasıyla Bimuno olarak bilinen, ticari olarak bulunabilen galaktooligosakkaritlerden hazırlanabilmektedir. Örnek tozun ağırlık/hacimce %10 suda çözündürülmesi ve deiyonize su ile 2 ml/dk'lık bir hızda ayrıştırılması vasıtasıyla hazırlanabilmektedir.

- 15 Alternatif olarak Bimuno karışımının aktif fraksiyonu uygun enzim kullanılarak enzimatik transgalaktosilasyon vasıtasıyla hazırlanabilmektedir.

- Galaktooligosakkarit bir toz, bir şurup olarak veya yumuşak bir pastil formunda sunulabilmektedir. Bir bağırsak rahatsızlığından, örneğin bir
20 bağırsak enflamatuvar rahatsızlıktan mustarip olan bir hastaya günlük olarak 1 ila 10 g, tercihen 2 ila 5 g, en çok tercihen 2,75 g'lık etkili bir aktif galaktooligosakkarit dozunda uygulanabilmektedir. Bu tek bir doz olarak veya birkaç saat arayla iki ayrı doz olarak alınabilmektedir. Galaktooligosakkarit tozu sıcak bir içeceğe eklenebilmekte veya
25 yemeğe serpilebilmektedir. Şurup kendi başına tüketilebilmekte veya alternatif olarak bir içecek içine karıştırılabilmekte veya yemek üzerine koyulabilmektedir. Yumuşak pastil ağızda çiğnenmektedir.

Enflamasyonu engellemek için galaktooligosakkarit bir bireye 1 ila 10 g, tercihen 2 ila 5 g, en çok tercihen 2,75 g'lık etkili bir günlük dozda uygulanabilmektedir.

5 Mevcut buluş ayrıca aşağıdaki örneklere ve şekillere atıfta bulunularak açıklanacaktır.

Şekil 1, B-GOS'un T84 hücrelerinde TNF- α indüklü IL-8 sekresyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

10 Şekiller 2(A) ve (B), B-GOS'un NCM-460 hücrelerinde TNF- α indüklü IL-8 ve MIP-3 α sekresyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

Şekiller 3(A) ve (B), B-GOS'un TNF- α işlenmiş NCM-460 hücrelerinde IL-8 ve MIP-3 α ekspresyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

15 Şekiller 4(A), (B) ve (C), B-GOS'un TNF- α işlenmiş NCM-460 hücrelerinin çekirdeklerine NF- κ B p65 proteininin translokasyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

Şekiller 5 ve 6, B-GOS'un NCM-460 hücrelerinde TNF- α indüklü IL-8 sekresyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

20 Şekiller 7(A) ve (B), B-GOS'un DSS ile işleme tabi tutulmuş farelerde TNF- α indüklü IL-6 ve MIP-2 sekresyonu üzerindeki etkisini göstermektedir;

Şekiller 8(A) ve (B), galaktooligosakkaritlerin farklı fraksiyonlarının sırasıyla IL-8 ve MIP-3 α üretimi üzerindeki etkisini göstermektedir ve

25 Şekiller 9(A) ve (B), NCM460 hücreleri Bimuno ve DP3 ve bunun DP>3 fraksiyonları ile işleme tabi tutulduğu zaman

sırasıyla TNF- α indüklü IL 8 ve MIP-3 α üretimi üzerindeki etkiyi göstermektedir.

ÖRNEK 1

Galaktooligosakkaritlerin sitokin sekresyonu üzerindeki etkisi

5 Bağırsak epitelyal hücreleri 5×10^5 hücre/m²lik bir başlangıç konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plakalarda konflüansa kadar büyütüldü. Hücreler %70 konflüansa eriştiği zaman şu şekilde dört kere işleme tabi tutuldu: (i) negatif kontrol, (ii) TNF- α (10 ng/mL) pozitif kontrol, (iii) B-GOS (5 g/L) ve (iv) TNF- α (10 ng/mL) ile B-GOS (5 g/L). İnsan sütünde bulunan oligosakkaritlerin fizyolojik konsantrasyonu olduğundan dolayı 5 g/L'lik bir oligosakkarit konsantrasyonu kullanıldı. 16 saat sonra süpernatantlar toplandı ve ELİZA vasıtasıyla IL-8 ve MIP-3 α sekresyonunun belirlenmesi için -20 °C'de depolandı. Aşağıdaki deneylerde TNF- α IL1 β veya flagellin ile değiştirildi.

IL-8'in Miktar Tayini. IL-8 konsantrasyonu önceden açıklandığı gibi ELİZA vasıtasıyla ölçüldü (Claud EC, Savidge T, Walker WA 2003 Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* 53: 419-425). Kısaca 96 kuyucuklu bir yüksek bağlama plakasının her bir kuyucuğunda (Nunc Immulon, Fisher Scientific, Middletown, VA, ABD) gece boyunca 100 μ L'lik 3 μ g/mL fare anti-insan IL-8 monoklonal antikorunun ile kaplandı, PBS içinde 200 μ L %1 BSA ile üç kere yıkandı ve 100 L örnekle bir saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Kuyucuklar daha sonra üç kere yıkandı ve 100 μ L'lik 0,1 μ g/m biyotin etiketli fare anti-insan IL-8 antikorunu ile bir saat boyunca inkübe edildi. Başka bir yıkamadan sonra her bir kuyucuk 100 μ L yaban turpu peroksidaz ile inkübe edildi, 100

μ L O-fenilendiamin dihidroklorür ve hidrojen peroksit ile inkübe edilmeden önce tekrar yıkandı. Reaksiyon 100 μ L 2N H₂SO₄ ile durduruldu ve abzorban 490 nm’de okundu. IL-8’in örneklerdeki konsantrasyonu IL-8 standart eğrisinden hesaplandı.

- 5 ***MIP-3 α ’nın Miktar Tayini.*** MIP-3 α sekresyonun miktarı plakanın gece boyunca 100 μ L 2,0 μ g/mL fare anti-insan MIP-3 α monoklonal antikoru ile gece boyunca yıkanması haricinde IL-8’e benzer bir şekilde ELİZA vasıtasıyla ölçüldü. Tespit antikoru biyotin etiketli fare anti-insan MIP-3 α antikoru 100 μ L’lik bir hacimle 50 ng/mL’lik bir konsantrasyonda tespit antikoru olarak kullanıldı. MIP-3 α ’nın örneklerdeki konsantrasyonu MIP-3 α standart eğrisinden hesaplandı.

- Hücre canlılığı analizi.*** B-GOS sitotoksitesi tripan mavisi dışlanım testi kullanılarak araştırıldı. NCM-460 hücreleri 2x10⁵ hücre/mL’lik bir başlangıç konsantrasyonundan lameller üzerinde büyütüldü.
- 15 Hücreler B-GOS (5 g/L) veya kontrol ortamıyla üç kere işleme tabi tutuldu. 16 saat sonra NCM-460 hücreleri tripan mavisi dışlanım analizi vasıtasıyla hücre canlılığına yönelik analiz edildi (Raimondi F, Crivaro V, Capasso L, Maiuri L, Santoro P, Tucci M, Barone MV, Pappacoda S, Paludetto R 2006 Unconjugated bilirubin modulates the intestinal epithelial barrier function in a human-derived in vitro model. *Pediatr Res* 60: 30-33). B-GOS’nin bu konsantrasyonda hücrelerin canlılığı üzerinde belirgin bir etkisi yoktu.

- B-GOS’nin sitokin transkripsiyonunun indüksiyonu üzerindeki etkisi.*** NCM-460 hücreleri 5x10⁵ hücre/m’lik bir başlangıç konsantrasyonunda 6 kuyucuklu plakalarda konflüansa kadar büyütüldü. Hücreler %70 konflüansa eriştiği zaman şu şekilde dört kere işleme tabi tutuldu: (i) negatif kontrol, (ii) TNF- α veya IL1 β veya
- 25

flagellin (10 ng/mL) pozitif kontrol ve (iii) TNF- α veya IL1 β veya flagellin (10 ng/mL) ile B-GOS (5 g/L). 18 saat sonra toplam hücresel RNA Trizol-kloroform ekstraksiyonu vasıtasıyla izole edildi. SuperScript III Platinyum SYBR Green Tek Adım qRT-PCR kiti kullanılarak IL-8, MIP-3 α ve MCP-1'in mRNA ekspresyonu bir MJ Opticon 2'de ölçüldü ve GAPDH'nin mRNA ekspresyonuna standardize edildi.

B-GOS'nin NF- κ B translokasyonu üzerindeki etkisi. NCM-460 hücreleri lameller üzerinde %70 konflüansa kadar büyütüldü ve 10 veya 30 dakika boyunca şu şekilde dört kere işleme tabi tutuldu: (i) negatif kontrol, (ii) TNF- α (10 ng/mL) pozitif kontrol, (iii) ve (iv) TNF- α (10 ng/mL) ile B-GOS (5 g/L). Ortam uzaklaştırıldı ve hücreler %4 paraformaldehitte sabitlendi. Metanol ile geçirgen hale getirildikten ve TBS içinde %0,25 BSA'da %10 keçi serumunda bloke edildikten sonra hücreler tavşan anti-insan NF- κ B p65 antikor ile problandı. Yıkamadan sonra hücreler CyTM 3-konjuge edilmiş keçi anti-tavşan antikoruyla inkübe edildi. Lameller daha sonra yıkandı ve mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-S) altında görüntülenmek üzere lam üzerine yerleştirildi.

20 ***Malzemeler***

NF- α sitokin, IL1 β , flagellin, streptavidin-HRP ve insan CCL20-MIP-3 α ELİZA gelişim kiti (Quantikin) R&D Systems'den (Minneapolis, MN, ABD) sağlandı. Anti-insan IL-8 ve fare anti-insan IL-8 antikorları Pierce Endogen'den (Woburn, MA, ABD) sağlandı. O-fenilendiamin tabletleri Pierce'dan (Rockford, IL, ABD) sağlandı. Trizol, SuperScript III Platinyum SYBR Green Tek Adım qRT-PCR kitleri ve qRT-PCR için gerekli diğer ayırıcılar Invitrogen'den

(Carlsbad, CA, ABD) sağlandı. DMEM/F12 ortamı, CMRL ortamı, penisilin, streptomisin ve HEPES tamponu Gibco-Invitrogen'den (Carlsbad, CA, ABD) sağlandı. Sığır cenin serumu Atlanta Biologicals'dan (Lawrenceville, GA, ABD) sağlandı. M3D Incell Corp.'dan (San Antonio, TX, ABD) sağlandı. Tavşan anti-insan NF- κ B (p65) poliklonal antikor Calbiochem'den (Gibbstown, NJ, ABD) sağlandı. CyTM 3-konjuge edilmiş F(ab')₂ fragmanı keçi anti-tavşan IgG Jackson ImmunoResearch'ten (West Grove, PA, ABD) sağlandı. İmmünofloresana yönelik bütün diğer ayıraçlar Vector Lab'dan (Burlingame, CA, ABD) sağlandı. Bütün diğer ayıraçlar Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) analitik veya moleküler biyoloji sınıfındandı.

B-Galakto-oligosakkarit B-GOS. Bimuno® Clasado Ltd., Milton Keynes, BK tarafından sağlandı.

Bağırsak Epitelyal Hücresiz dizinleri. Bu çalışmalarda iki yetişkin insan bağırsak epitelyal kültür modeli kullanıldı: T84 ve NCM-460 hücreleri sırasıyla dönüştürölmüş ve dönüştürölmemiş kolon epitelyal hücrelerdir. Hücreler su buharı ile doygun hale getirilmiş %95 O₂ ve %5 CO₂ ile 37 °C'de Falcon kültür tabaklarında kültürlendi. T84 kültür ortamı BS (%5), HEPES tamponu, glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, penisilin ve streptomisin (12) eklenmiş DMEM/F12'den oluştu. NCM-460 kültür ortamı önceden açıklandığı gibi (13) FBS (%10), penisilin ve streptomisin eklenmiş M3D ortamından oluştu.

İstatistiksel Analiz. Sitokinlerin indüksiyonu standart hataları (SE) gösteren hata çubukları ile pozitif kontrole standardize edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar iki kuyruklu bir Student t testi kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR vasıtasıyla elde edilen gen ekspresyonu

SE'li ortalama olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar logaritmik transformasyondan sonra Student iki kuyruklu bir t testi kullanılarak gerçekleştirildi. Bir p değeri $<0,05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi ve bir yıldız işaretiyle (*) belirtildi, bir p değeri $<0,01$ iki yıldız işaretiyle (**) belirtildi ve bir p değeri $<0,001$ üç yıldız işaretiyle (***) belirtildi.

Sonuçlar

Galaktooligosakkaritlerin T84 hücrelerinde sitokin sekresyonu üzerindeki etkisi (Şekil 1).

- 10 T84 hücrelerinde TNF- α -indüklü IL-8 sekresyonu 4 bağımsız deney arasında karşılaştırmaya olanak sağlamak üzere %100'e normalleştirildi. İşleme tabi tutulmamış T84 hücreleri %20,5'te bir bazal IL-8 sekresyonuna sahipti. TNF- α stimülasyonu üzerine IL-8 sekresyonu anlamlı bir şekilde 4,9 kat ($p < 0,001$) arttı.
- 15 B-GOS'un etkisini belirlemek için T84 hücreleri galakto-oligosakkarit B-GOS (5 g/L) mevcudiyetinde TNF- α ile veya bu olmadan stimüle edildi. B-GOS işlenmiş T84 hücreleri IL-8'i %16,4'te sekrete etti. Bu işleme tabi tutulmamış T84 hücrelerinin bazal seviyesinden önemli ölçüde farklı değildi. TNF- α ile stimülasyon üzerine B-GOS IL-8
- 20 sekresyonunu anlamlı bir şekilde %38,5 ($p < 0,001$) oranında arttırdı.

Galaktooligosakkaritlerin NCM-460 hücrelerinde sitokin sekresyonu üzerindeki etkisi (Şekil 2, Şekil 5, Şekil 6).

- NCM-460 hücrelerinde TNF- α -indüklü IL-8 ve MIP-3 α sekresyonu 4 bağımsız deney arasında karşılaştırmaya olanak sağlamak üzere
- 25 %100'e normalleştirildi. İşleme tabi tutulmamış NCM-460 hücreleri sırasıyla %1,7 ve %4,0'da bir bazal IL-8 ve MIP-3 α sekresyonuna sahipti. TNF- α stimülasyonu üzerine IL-8 ve MIP-3 α sekresyonu

anlamalı bir şekilde sırasıyla 58,8 kat ($p < 0,001$) (Şekil 2A) ve 25,0 kat ($p < 0,001$) (Şekil 2B) arttı.

B-GOS'un etkisini belirlemek için NCM-460 hücreleri galakto-oligosakkarit B-GOS (5 g/L) mevcudiyetinde TNF- α ile veya bu
5 olmadan stimüle edildi. B-GOS-işlenmiş NCM-460 hücreleri %1,1 ve %3,9'da sırasıyla IL-8'i ve MIP-3 α 'yı sekrete etti; bu işleme tabi tutulmamış NCM-460 hücrelerinin bazal seviyesinden önemli ölçüde farklı değildi. TNF- α ile stimülasyon üzerine B-GOS IL-8 ve MIP-3 α sekresyonunu anlamalı bir şekilde sırasıyla %43,5 ($p < 0,001$) (Şekil
10 2A) ve %52,1 ($p < 0,05$) (Şekil 2B) oranında arttırdı. Aynı şekilde NCM-460 hücreleri TNF- α stimülasyonundan önce B-GOS ile önceden yıkandığı zaman IL8'in sekresyonu B-GOS olmaması durumunda bile anlamalı bir şekilde %32 ($p < 0,001$) azaldı (Şekil 6). Bu B-GOS karışımının bileşenlerinin toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi
15 epitelyal reseptörlerle hücrenin enflamatuar stimülasyonunu engellemek için etkileşime girdiğini önermektedir.

Benzer şekilde flagellin ile stimülasyon üzerine B-GOS IL-8 sekresyonunu anlamalı bir şekilde %21,5 ($p < 0,05$) (Şekil 5) azalttı. IL1 β ile stimülasyon üzerine etki gözlemlenemedi.

20 B-GOS'un sitotoksik olup olmadığını belirlemek için NCM-460 hücreleri 16 saat boyunca B-GOS ile veya bu olmadan inkübe edildi. B-GOS yöntemlerde açıklandığı şekilde bir tripan mavisi dışlanım analizi vasıtasıyla belirlendiği gibi hücre canlılığını etkilemedi.

Galaktooligosakkarit B-GOS'un sitokin ekspresyonu üzerindeki etkisi (Şekil 3).
25

TNF- α işlenmiş NCM-460 hücrelerinin toplam RNA'sı izole edildi ve qRT-PCR vasıtasıyla IL-8, MIP-3 α ve MCP-1 mRNA ekspresyonuna

yönelik analiz edildi. TNF- α ile stimölasyonu üzerine IL-8 ve MIP-3 α mRNA ekspresyonu anlamlı bir şekilde sırasıyla 12,2 kat ($p < 0,001$) (Şekil 3A) ve 99,4 kat ($p < 0,001$) (Şekil 3B) arttı. İşlemlerin herhangi biri arasında MCP-1 mRNA ekspresyonunda değışiklik gözlemlenmedi ($p = 0,19$) (veriler gösterilmemektedir). B-GOS'un etkisini belirlemek için NCM-460 hücreleri B-GOS (5 g/L) mevcudiyetinde TNF- α ile stimöl edildi. Galakto-oligosakkarit B-GOS TNF- α -indüklü IL-8 ve MIP-3 α mRNA ekspresyonu anlamlı bir şekilde sırasıyla 5,7 kat ($p < 0,05$) (Şekil 3A) ve 58,9 kat ($p < 0,05$) (Şekil 3B) azalttı. MCP-1 mRNA ekspresyonu B-GOS ile düşürüldü fakat anlamlılığa erişemedi ($p = 0,06$) (veriler gösterilmemektedir).

Galaktooligosakkarit B-GOS'un NF- κ B translokasyonu üzerindeki etkisi (Şekil 4)

Yetişkin kolon NCM-460 hücreleri TNF- α (10 ng/mL) ile işleme tabi tutuldu ve NF- κ B p65 proteininin nükleer translokasyonuna yönelik analiz edildi. Araç işlenmiş kontrol hücrelerinde (Şekil 4A) NF- κ B p65'e yönelik boyama baskın olarak sitoplazmadaydı ve nükleus p65 proteininden muaftı. NF- κ B p65 TNF- α ile stimölasyondan 30 dakika sonra çekirdeklere doğru açıkça yer değıştirdi (Şekil 4B). Ancak B-GOS mevcudiyetinde TNF- α -indüklü NF- κ B translokasyonu 30 dakikada kısmen inhibe edildi (Şekil 4C).

ÖRNEK 2

Dekstran Sülfat Sodyum indüklü kolit fare modelinde B-GOS'un etkisine ilişkin in vivo çalışma

Malzeme yöntemleri

Yetişkin C57BL/6 farelerden (Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, ABD) iki grup (her biri için $n=24$) konvansiyonel olarak

yetiştirildi (CR) ve bakteri olmayan (BD) fareler koliti indüklemek için kullanıldı. Bütün hayvanlar 12 saatlik bir ışık/karanlık döngüsü içinde muhafaza edildi ve fare yemeğine ve suya istenildiği kadar erişime sahipti.

- 5 6 haftalıkken konvansiyonel olarak koloni haline getirilen fareler işlenmemiş suyla konvansiyonel koşullar altında muhafaza edilirken (CR grubu) BD grubundaki fareler 2 hafta boyunca kendi içme suları içinde bir antibiyotik kokteyliyle beslendi. Kanamisin (8 mg/ml), Gentamisin (0,7 mg/ml), Kolistin (34,000 U/ml), Metronidazol (4,3
10 mg/ml) ve Vanakomisin (0,9 mg/ml) antibiyotik kokteyli oluşturdu. Sudaki antibiyotiklerin konsantrasyonu yaş grubu tarafından tüketilen ortalama suya bağlı olarak hesaplandı.

- 8 haftalıkken 5 gün boyunca içme suyunda %3,5 DSS (Dekstran Sülfat Sodyum) (MP Biomedicals, Aurora, OH, ABD) ile beslenerek
15 her iki grubun (CR ve BD) bütün farelerinde bağırsak koliti indüklendi. 10 haftalıkken her bir grubun farelerinin yarısı 7 gün boyunca Bimuno (5 g/L) almaya başladı. 10 haftanın sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı ve bunların bağırsakları analiz için çıkartıldı.

20 ***Sitokin ölçümleri***

- Murin IL-6 ve MIP-2 sitokinleri üreticinin talimatlarına göre kolon dokusu homojenatları üzerinde ELİZA (Quantikine, R&D Systems, MN, ABD) vasıtasıyla analiz edildi. Kısaca her bir grup için proksimal kolonlar toplandı ve bir proteaz inhibitörü kokteyli eklenen
25 %1 Triton X-100 içeren PBS homojenize edici tampon ile homojen hale getirildi. Homojen hale getirilen solüsyonlar 10 dakika boyunca

12,000 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatantlar sıvı bölüntülere ayrıldı ve -70 °C’de depolandı.

Sonuçlar

5 Bimunonun kontrol farelerine (Bimuno uygulaması yok) nazaran her iki fare grubunda (CR ve BD) DSS kolite ilişkin hasarı ve enflamasyonu azaltma kapasitesi belirlendi.

Konvansiyonel DSS-işlenmiş farelerde IL-6 ve MIP-2 sekresyonu anlamlı bir şekilde sırasıyla 2,2 (p <0,0001) ve 8,3 kat (p <0,0001) indüklendi. Bimuno IL-6 ve MIP-2 sekresyonunu anlamlı bir şekilde
10 6,6 (p <0,0001) ve 5,5 kat (p <0,0001) azalttı.

BD DSS-işlenmiş farelerde IL-6 ve IP-2 sekresyonu anlamlı bir şekilde sırasıyla 6,2 (p <0,0001) ve 27,2 kat (p <0,0005) indüklendi. Bimuno IL-6 sekresyonunu anlamlı bir biçimde 3,6 kat (p <0,0001) azalttı. MIP-2 sekresyonu 1,3 kat azaltıldı ancak bu anlamlı
15 bulunmadı (p = 0,126).

Özetle konvansiyonel DSS-işlenmiş fareler işleme tabi tutulmamış gruba nazaran kolit geliştirdi. Bimuno eklenmiş DSS-işlenmiş konvansiyonel fareler önemli ölçüde azalmış enflamasyon markörlerine (IL-6 ve MIP-2) ve azalmış kolit semptomlarına sahipti.
20 Aynı etki bakteri olmayan DSS-işlenmiş farelerde de gözlemlendi. Bu Bimunodan dolayı enflamasyonda gözlemlenen azalmanın sadece mikroflora aracılıklı olmadığını belirtmektedir. Bimuno DSS kolitte bağırsak epitelyumu üzerinde doğrudan bağışıklık-modüle eden bir etkiye sahiptir.

ÖRNEK 3

Bimuno galaktooligosakkarit karışımının enflamatuar sitokin TNF- α mevcudiyetindeki MIP-3 α ve IL-8 sitokinlerinin üretimi üzerindeki etkisi

Malzemeler ve yöntemler

5 Bimuno karışımından GOS fraksiyonlarını toplama

Galaktooligosakkaritlerin farklı fraksiyonlarını (laktozdan yoksun DP2, DP3 ve DP>3) ayırmak ve toplamak için oda sıcaklığında korunan bir Biogel P2 kolon (100 cm x 5 cm) (Pharmacia, BK) ile büyüklük dışlanımlı kromatografi kullanıldı. Bütün örnekler deiyonize su ile 2 ml/dk'lık bir hızda ayrıştırıldı ve 132RI detektör (Gilson) ile gözlemlendi. Laktoz TENNOJI-KU (Osaka, Japonya) tarafından sağlanan β -galaktosidaz BIOLACTA FNS aracılığıyla fraksiyon DP2'den uzaklaştırıldı. Hidroliz tampon olarak 100mM sodyum fosfat solüsyonu ve kofaktörü olarak 1mM MgCL₂ kullanılarak pH 6.4'te 40 °C'de gerçekleştirildi. Her bir fraksiyonun karbonhidrat içeriği iyon dışlanımı ve iyon değişim kromatografisi vasıtasıyla LaChrom RI Detektör L-7490 MERCK ile donatılan bir RCM-MONOSACCHARIDES Rezex HPLC kolonda analiz edildi. Oligosakkaritler 84,4 °C'de 0,5 ml/dakikada deiyonize suda ayrıştırıldı.

Hücre kültürü

Normal insan kolon mukozal epitelyumundan türetilen NCM460 hücre dizini INCELL CORPORATION LLC tarafından sağlandı ve %95 hava, %5 CO₂ nemlendirilmiş ortamda 37 °C'de %10 [v/v] sığır cenin serumu eklenmiş M3Base ortamında (INCELL CORPORATION LLC) korundu.

NCM460 kültürleri vasıtasıyla sitokin üretiminin ölçümü

5 x 10⁵ hücre/ml konsantrasyondaki NCM460 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve %95 hava ve %5 CO₂ ile 37 °C’de inkübe edildi. %70 konflüansa karşılık gelen 24 saat inkübasyondan sonra hücreler TNF- α (10ng/ml) (Rekombinant İnsan TNF-α/TNFSF1A - R&D Systems), galaktooligosakkarit fraksiyonları (0,138 g/ml DP2; 0,049 g/ml DP3; 0,041 g/ml DP>3) ve TNF-α ve her bir fraksiyonun karışımı ile üç kere işleme tabi tutuldu. Kontrol ortamda büyüyen hücrelerden oluştu. Hücreler daha sonra 16 saat boyunca 37 °C’de %95 hava, %5 CO₂’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından süpernatant toplandı ve 200µl’lik sıvı bölüntüler şeklinde donduruldu ve test etmeden önce 5 dakika boyunca 400 x g’de santrifüjlendi. Sitokinlerin (MIP-3α ve IL-8) konsantrasyonu R&D Systems (MN, ABD) tarafından sağlanan QUANTIKINE kiti kullanılarak ELİZA vasıtasıyla ölçüldü.

15 **Sonuçlar ve irdeleme**

Büyüklik dışlanımlı kromatografi kullanılarak toplanan 3 farklı fraksiyon aşağıdaki miktarlarda galaktooligosakkarite sahipti:

- a) %90 galaktooligosakkarit içeren fraksiyon DP2 ve geriye kalan %10 monosakkaritlerden (%1), laktozdan (%6), trisakkaritlerden (%2) ve pentaoligosakkaritlerden (%1) oluştu;
- b) %97 galaktooligosakkarit içeren fraksiyon DP3 ve %3 DP4 oligosakkarit;
- c) DP4 ve DP5 ile %96 galaktooligosakkaritten oluşan fraksiyon DP>3 ve DP3 ile %4 galaktooligosakkarit.

25 Fraksiyonların IL-8 ve MIP-3α üzerindeki etkisi sırasıyla Şekil 8(A) ve (B)’de gösterilmektedir.

Her iki deney için fraksiyon DP3 ve DP>3 sitokinlerin sekresyonunu azalttı:

- a) tek başına TNF- α ile karşılaştırıldığında DP3 IL-8 üretimini %34 ve MIP-3 α üretimini %25 azalttı;
- 5 b) DP>3 fraksiyonuna yönelik olarak azalma IL-8 ve MIP-3 α için sırasıyla %35 ve %51 idi.

Fraksiyon DP2 için sonuçlar açık değildi. IL-8 sekresyonu için azalma %49 idi ancak bu fraksiyon MIP-3 α üretimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildi.

10 **ÖRNEK 4**

Bimuno ile karşılaştırıldığında enflamatuar sitokin TNF- α mevcudiyetinde Bimuno galaktooligosakkarit karışımının fraksiyonlarının IL-8 ve MIP-3 α sitokinleri üzerindeki etkisi

Malzemeler ve yöntemler

- 15 GOS fraksiyonları Örnek 3'te açıklandığı gibi Bimunodan hazırlandı.

Hücre kültürleri

NCM460 hücre dizininin hücre kültürleri Örnek 3 ile aynı kaynaktan elde edildi ve aynı şekilde korundu.

NCM460 kültürleri vasıtasıyla sitokin üretiminin ölçümü

- 20 5 x 10⁵ hücre/ml konsantrasyondaki NCM460 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve %95 hava ve %5 CO₂ ile 37 °C'de inkübe edildi. %70 konflüansa karşılık gelen 24 saat inkübasyondan sonra hücreler TNF- α (10ng/ml) (Rekombinant İnsan TNF- α /TNFSF1A - R&D Systems) ve TNF- α ve Bimuno (0,1 g/ml), TNF- α ve
- 25 Bimonunun DP=3 fraksiyonu (0,1 g/ml) veya TNF- α ve Bimonunun DP>3 fraksiyonu (0,1 g/ml) karışımı ile üç kere işleme tabi tutuldu. Kontrol ortamda büyüyen hücrelerden oluştu. Hücreler daha sonra 16

saat boyunca 37 °C'de %95 hava, %5 CO₂'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından süpernatant toplandı ve 200µl'lik sıvı bölüntüler şeklinde donduruldu ve test etmeden önce 5 dakika boyunca 400 x g'de santrifüjlendi. Sitokinlerin (MIP-3 ve IL-8) konsantrasyonu R&D Systems tarafından sağlanan QUANTIKINE kiti kullanılarak ELİZA vasıtasıyla ölçüldü.

Sonuçlar

Büyüklik dışlanımlı kromatografi kullanılarak toplanan 2 farklı fraksiyon aşağıdaki miktarlarda galaktooligosakkarite sahipti:

10 a) Fraksiyon DP3 kapsanan

b) Fraksiyon DP>3 kapsanan

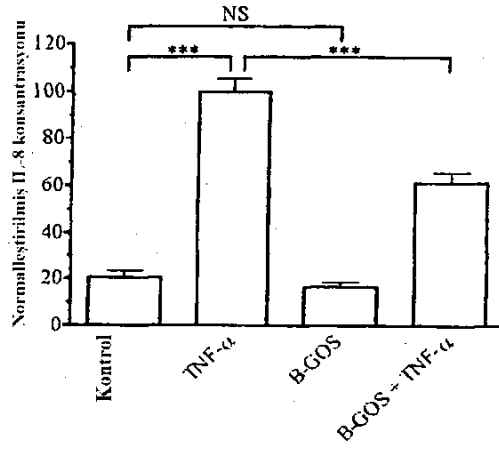
Galaktooligosakkarit fraksiyonlarının ve Bimunonun IL-8 ve MIP-3α üzerindeki etkisi sırasıyla Şekil 9(A) ve (B)'de gösterilmektedir. Şekiller 9(A) ve (B)'den fraksiyon DP3'ün Bimuno ile karşılaştırıldığı zaman IL-8 üretimini %35 azalttığı görülebilmektedir. MIP-3α üretimindeki azalma DP3 fraksiyonu kullanılarak Bimuno ile karşılaştırıldığı zaman %37'den daha fazla olmuştur.

Bimuno ile karşılaştırıldığında fraksiyon DP>3 ile IL-8 üretimi %40 fazla olmuştur ve MIP-3α üretimindeki azalma %55 fazla olmuştur.

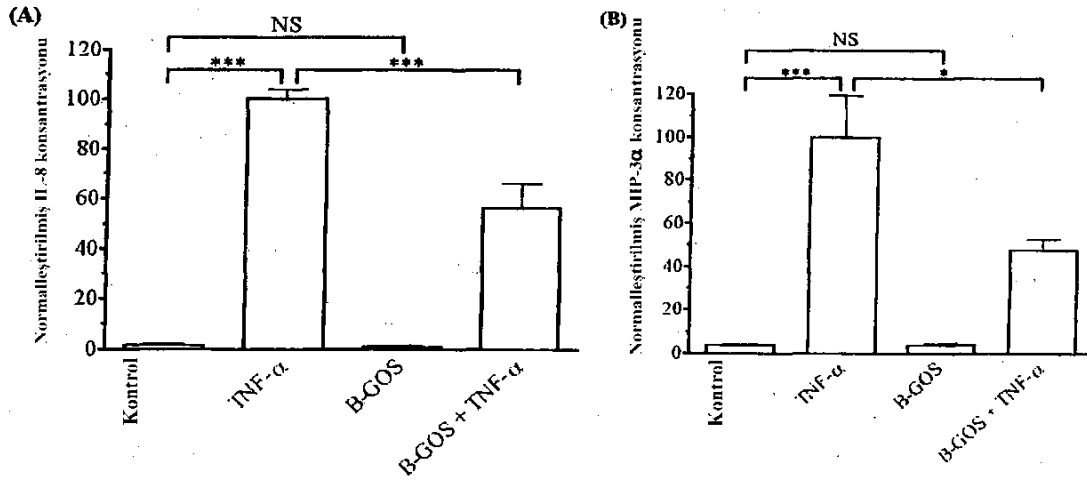
20 **Sonuç**

Fraksiyonlar DP3 ve DP>3 toplam galaktooligosakkarit karışımına (Bimuno) eşit miktarda olduğu zaman enflamasyona karşı koruyucu etkiler belirgin şekilde daha yüksektir.

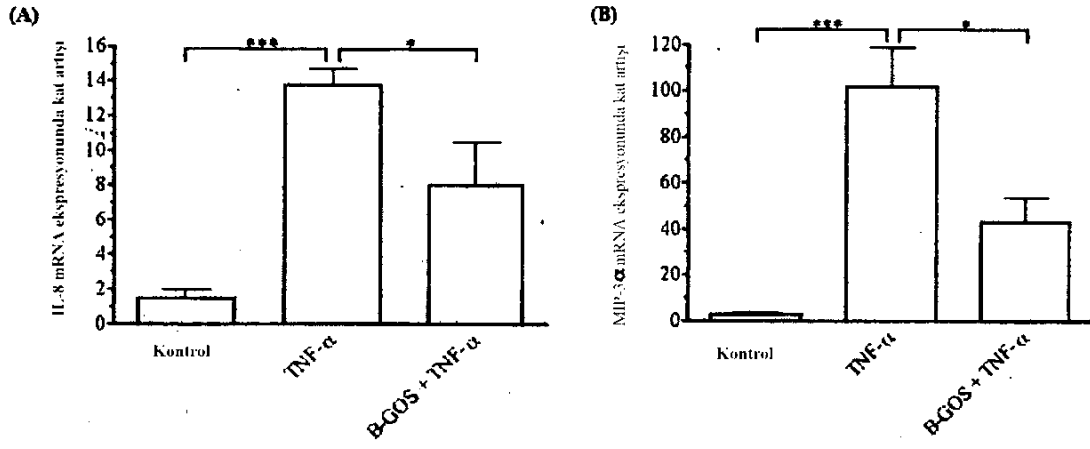
Şekil 1



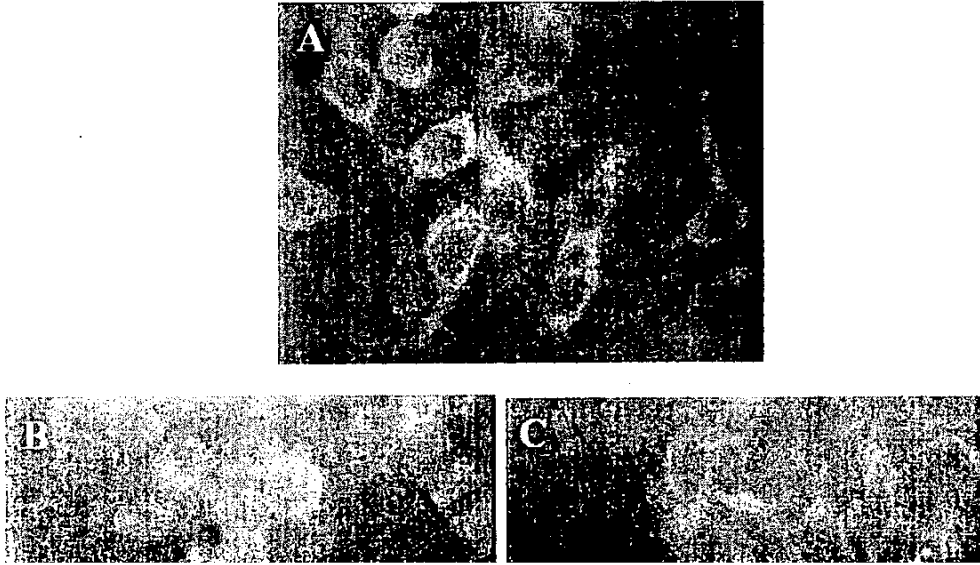
Şekil 2



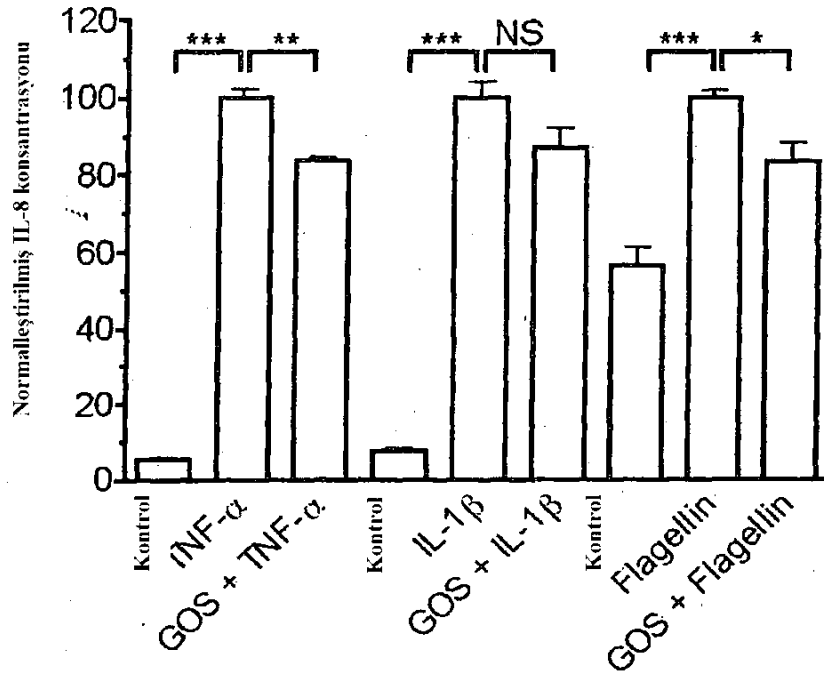
Şekil 3



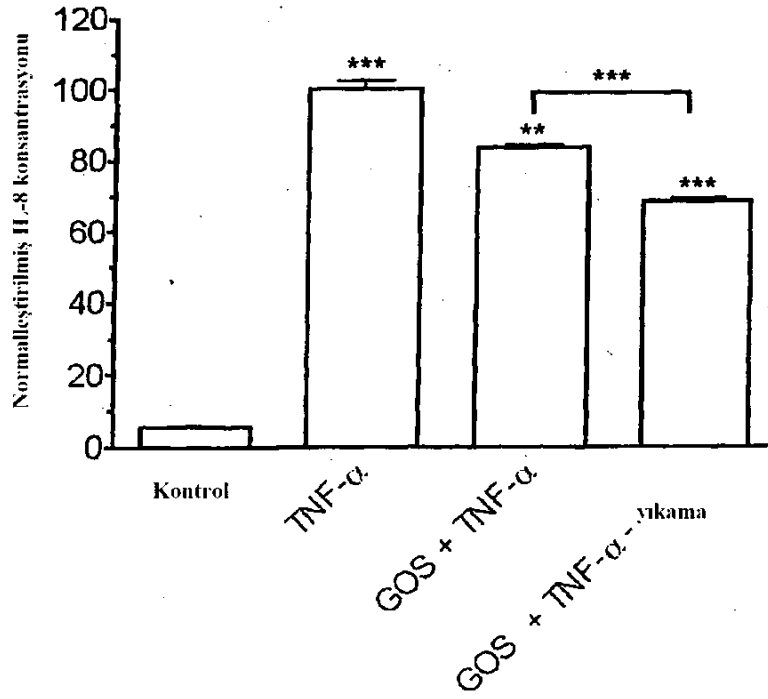
Şekil 4



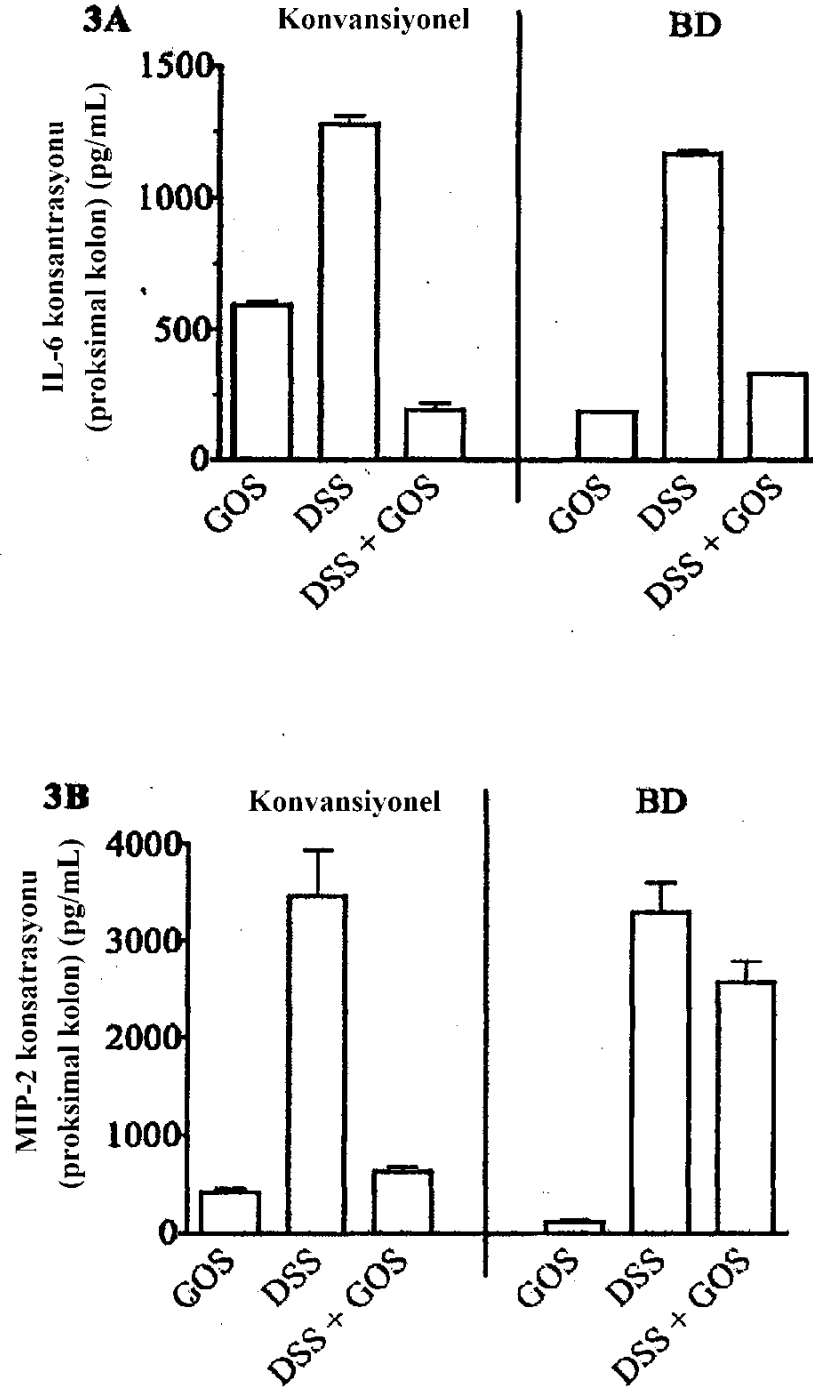
Şekil 5



Şekil 6

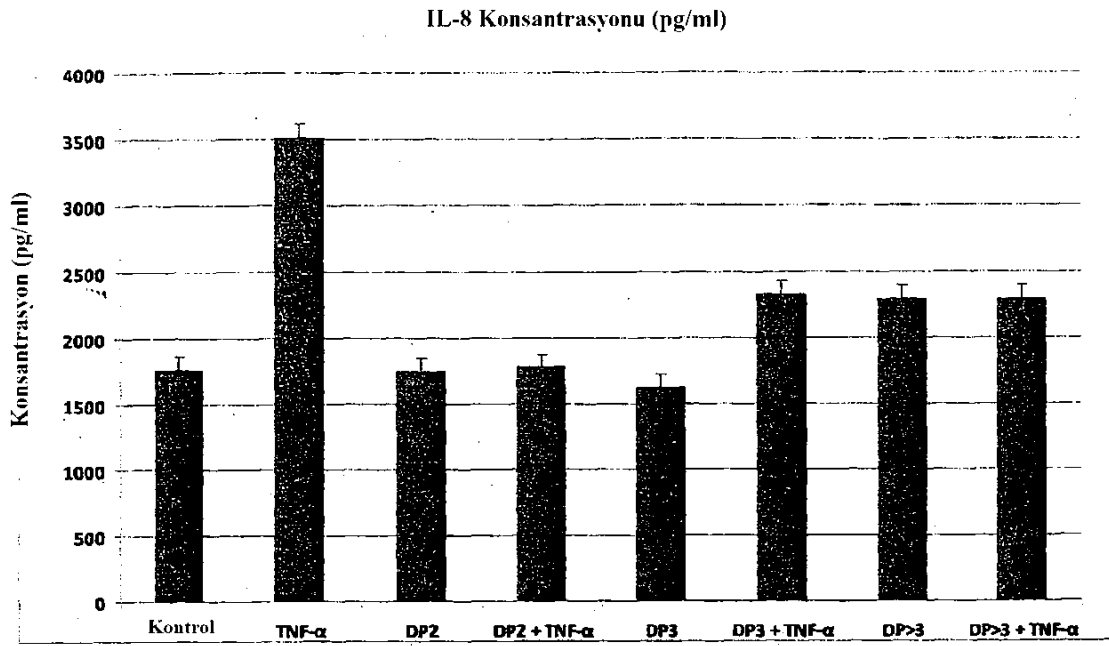


Şekil 7A

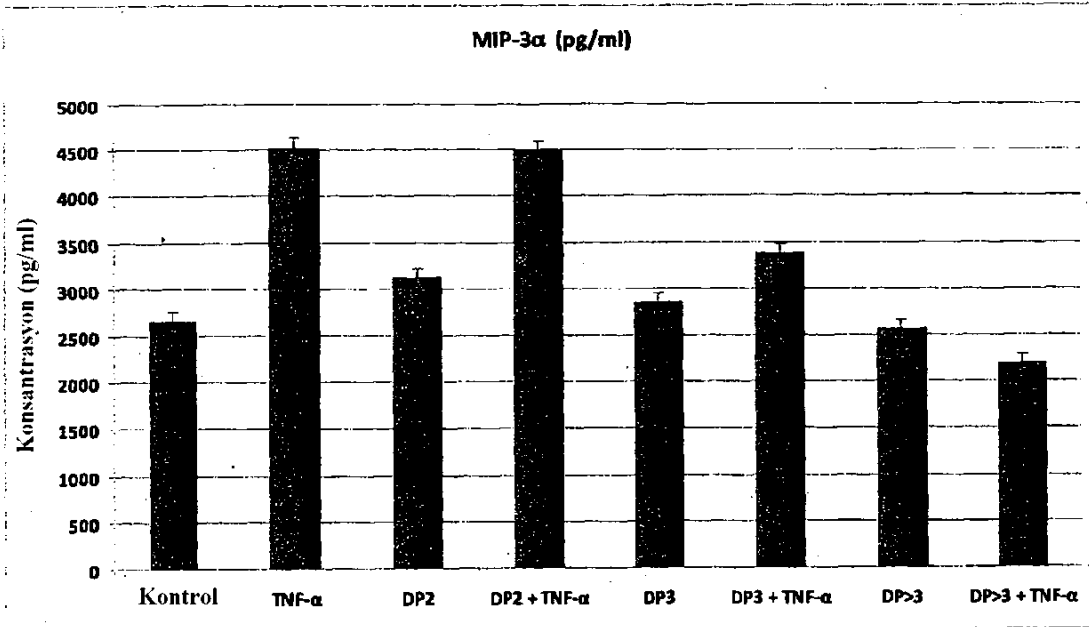


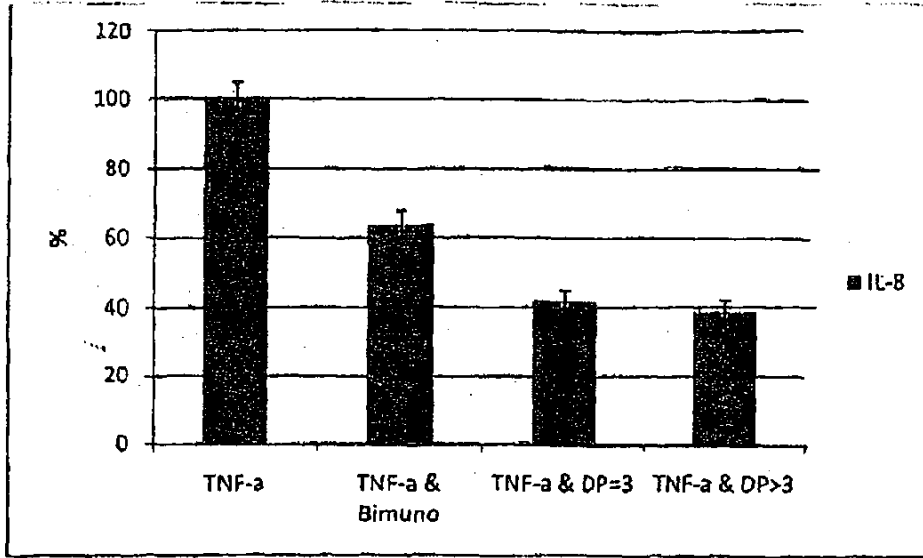
Şekil 7B

Şekil 8A

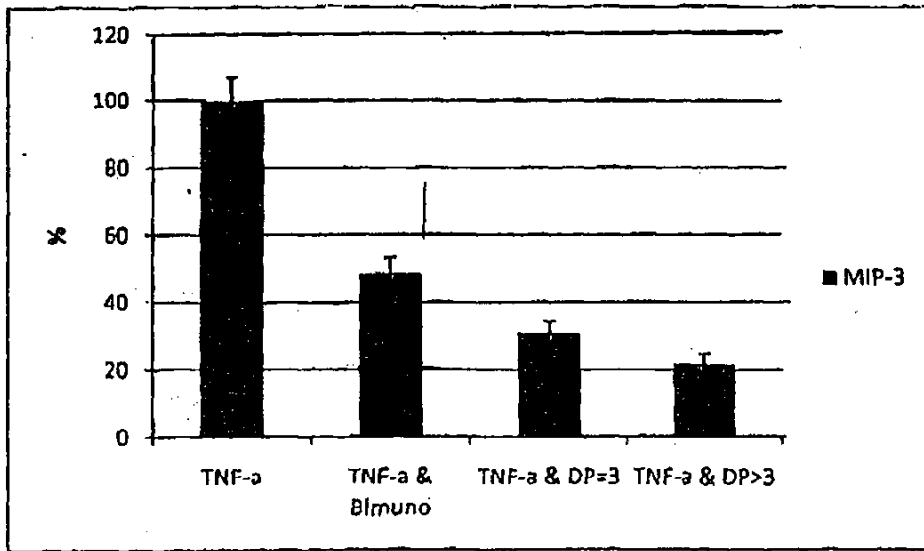


Şekil 8B





Şekil 9A



Şekil 9B