

Short-Term Rectal Enema Probiotic Treatment with Intestinal Microbiota Analysis in Cats with Chronic Enteropathy

Kerem URAL¹, Hasan ERDOĞAN¹, Songül ERDOĞAN¹, Serdar PAŞA¹, Tuğba ASLAN¹, Cansu BALIKÇI^{1*}, Gamze GÖKÇAY¹

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Türkiye

ABSTRACT

An imbalance in gut microbiota detected to serve as a predisposing factor for existence of chronic inflammation of the gastrointestinal tract, such as chronic enteropathy among cats. Given the postulation that probiotic administration might mitigate gastrointestinal disorders, its effects via rectal route have never been explored in our country among cats with chronic enteropathy. Thus the purpose of the present study was to evaluate the therapeutical efficacy of an multiple chain probiotic treatment involving *Bifidobacterium* combination [*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*], *Lactobacillus* strains [*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*], *Bacillus* strains [*Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*] and a next generation probiotic *Akkermansia muciniphilia* via rectal route (enema) in cats with cEnT. Diagnosis was based on a) clinical, b) hematological and serum biochemical analysis along with scoring to those of Feline Chronic Enteropathy Activity Index (FCEAI). Each cat was inspected and analyzed/reevaluated and assigned a FCEAI score at the start and end of treatment for 10 day induction period. Rectal enema probiotic treatment resulted with significantly decreased composite FCEAI score ($p<0.01$) and laboratory parameters re-evaluation values ($p<0.01$) subjected to interpretation. This treatment modality without any side effects, should be substitute other relevant treatment modalities with relapsing and degenerative effects.

Keywords: Dysbiosis, GI inflammation, Microbiome analysis, Probioteraphy

Kronik Enteropatili Kedilerde Bağırsak Mikrobiyota Analizleri İle Kısa Dönem Rektal Enema Probiyotik Sağaltımı

ÖZ

Bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizliklerin kedilerdeki kronik enteropatilerde olduğu gibi gastrointestinal sistemdeki kronik inflamasyon oluşumu için de hazırlayıcı bir faktör olarak hizmet ettiği tespit edilmiştir. Probiyotik uygulamasının gastrointestinal rahatsızlıkları azaltabileceği varsayımı göz önüne alındığında, ülkemizde kronik enteropatili kedilerde rektal yoldan probiyotik uygulaması sonucu oluşabilecek olası etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu bilgiler nedeniyle sunulan bu çalışmanın amacı, kedilerde *Bifidobacterium* kombinasyonu [*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*], *Lactobacillus* suşları [*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*], *Bacillus* suşları [*Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*] ve yeni nesil bir probiyotik olan *Akkermansia muciniphilia*'yi içeren çok zincirli bir probiyotik tedavisinin terapötik etkinliğini, kedilerde rektal yoldan (enema) değerlendirmektir. Teşhiste a) klinik, b) hematolojik ve serum biyokimyasal analizlerin yanında Feline Kronik Enteropati Aktivite İndeksi'ne (FCEAI) göre puanlamalar yapılarak gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında değerlendirilen her kedi sağaltım öncesi ve sağaltım sonrasını kapsayan 10 günlük sürede analiz edilerek yeniden değerlendirildi. Rektal enema yolu ile uygulanan probiyotik tedavisi sonucu, "yorumlamaya tabi tutulmuş kompozit FCEAI skoru" ($p<0.01$) ve laboratuvar parametreleri yeniden değerlendirmede ($p<0.01$) anlamlı derecede azalmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında herhangi bir yan etkisi olmayan bu tedavi yönteminin, tekrarlayan ve dejeneratif etkileri olan diğer ilgili tedavi yöntemlerinin yerini alabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Disbiyoz, Gİ inflamasyon, Mikrobiyom analizi, Probiyoterapi

To cite this article: Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Paşa S, Aslan T, Balıkcı C, Gökçay G. Short-Term Rectal Enema Probiotic Treatment with Intestinal Microbiota Analysis in Cats with Chronic Enteropathy. . Kocatepe Vet J. (2023):16(1): 16-30

Submission: 19.09.2022 Accepted: 03.01.2023 Published Online: 24.02.2023

ORCID ID; KU: 0000-0003-1867-7143, HE: 0000-0001-5141-5108, SE: 0000-0002-7833-5519, SP: 0000-0003-4957-9263, TA: 0000-0001-7337-9769, CB: 0000-0002-6261-162X, GG: 0000-0002-7421-1543

*Corresponding author e-mail: balikcicansu98@gmail.com

Kedilerde, kronik enteropatinin (kEnt) çeşitli sebepleri olsa da hastalık genel itibarı ile, idiopatik inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH) ve gıda eliminasyonuna cevap veren enteropati (GcE) olarak iki sendromu içerebilmektedir (Jergens ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1993; Hart ve ark., 1994). Her iki hastalıkta da persiste ya da nüks edici karakterde (ki bu çalışmanın yazarlarına göre de kliniklere getirilen kedilerde en sıklıkla verilen anamnezdir) farklı patojenik mekanizmalarla şekillenen gastrointestinal belirtiler mevcut olup, her iki formda da spesifik sağaltıma alınan cevaba ilişkin retrospektif tanıya gidilmektedir (Hall ve German, 2004). Kedilerde meydana gelen klinik bulgular çok değişken olup hastalığın şiddeti kediden kediyeye farklılaşmakta, bunu belirleyen unsurlar arasında enteropatinin i) tipi, ii) lokalizasyonu ile iii) gastrointestinal (gi) kanalda etkilenen bölgedeki yaygınlığı rol almaktadır (Jergens ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1993).

Üniversite klinik pratiğimizde giderek artan sayıda kronik enteropati ve buna ilişkin klinik bulgularla getirilen kedilerle karşılaşmaktayız. Bu kedilerin çok önemli bir kısmında farklı beslenme rejimleri deneme/yanılma ile hasta sahipleri nezdinde uygulanmakta, olgular kliniğe getirildikten sonra da hastalığa özgü diyet seçimleri yapılmakta, gıda eliminasyon diyeti de denenmektedir. Olgularda başarılı sağaltım uygulamalarının kısa vadede gerçekleşmemesi ve çoğunluğunda nüks görülmesi sebebi ile “besinsel unsurlar-alerji-gastrointestinal lezyonların” ilişkisinin araştırılması ve probiyotiklerin (yararlı minicanlıların) sağaltımdaki öneminin değerlendirilmesi gerektiği, bu çalışmayı dizayn eden araştırmacılar tarafından düşünülmüştür.

Geniş kitlelerde ve sağlık sektöründe ‘dost bakteriler’ olarak bilinen probiyotikler, henüz pet hayvanlarının sağlığı ve refahına yönelik hak ettiği değeri bulamamıştır. Kanıta dayalı veri havuzunda ise halen önemli (özellikle ulusal düzeyde daha da önemlidir) eksiklikler mevcuttur. Tüm bu unsurlar literatür araştırması yapan veteriner hekimlerin klasik kaynaklara yönelmesine ve immunsupresif sağaltım ölçekli uygulamalarda bulunmasına neden olmaktadır. Benzer olarak, klinik uygulamamızda intestinal permeabiliteye ve/veya geçirgenlik artışına yönelik sağaltımın başarı getireceğine dair ciddi veriler probiyotik uygulamalarının önemine işaret etmektedir (Marsilio, 2021). Bu çalışmada klasik sağaltım uygulamalarına karşın öncü bir araştırma bakış açısı ile kısa dönem çoklu suş probiyotik rektal enemasının kronik enteropatili kedilerde sağaltım etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Olguların Tanımlanması

Felin Kronik Enteropati Aktivite İndeksinde (FkEaİ) kullanılan gastrointestinal bulgular (Şekil 1) 0 ila 3 arasında değişkenler olarak skorlanmaktadır (Tablo 1) (Jergens ve ark., 2010). Hastaların seçiminde anamnez bulguları ve klinik muayene kriterleri göz önüne alınarak çalışmaya alındı. Bu çalışmada söz konusu aktivite indeksi modifiye edilerek [endoskopik verilerin ve fosfor analizlerinin eksikliği (teknik ve idari sorun) sebebiyle] saha şartlarına uygun olarak sadece aşağıda gösterilen parametreler ve ilgili skorlar saptanmıştır. Orijinal halinden (Jergens ve ark., 2010) sapılmayarak, sadece yukarıda bahis konusu olduğu üzere bakılmayan parametreler zaruriyet içerisinde çıkarılarak modifiye eksiltilmiş FkEaİ [meFkEaİ] uygulanmıştır. Araştırmamız kapsamında toplamda 10 Felin Kronik Enteropatili kedi değerlendirilmeye alınmıştır.

Bağırsak Mikrobiyom Analizleri

Örnekleme Prosedürü

Kısıtlı bütçe ve iktisadi koşullar (kur dalgalanması) göz önünde bulundurularak sadece sağaltım öncesi verilere yönelik mikrobiyom analizleri (8/10 olguda) hizmet alımı şeklinde, yurt dışında gerçekleştirildi. Kısaca rektumdan 5 cm civarında ilerisi steril koton svap aracılığıyla (dışkı değil, lümen hedeflenerek) lümen örneklerinin alınmasını sağladı. Hazır olarak evvelden temin edilen test materyalleri kullanıldı. Kutu içeriğinde rektal örnekleme için kullanıma hazır steril svaplar, numune aktarma kapları (hazır buffer solüsyonu içeren) mevcuttu. Örnekler hizmet alımı ile Amerika Birleşik Devletleri’ne Midog Merkezine (Center) ulaştırıldı.

Mikrobiyota Analiz Metodolojisi

Toplamda çalışmaya dahil edilen 10 kediden 8’inde mikrobiyom analizleri gerçekleştirilebildi. MiDOG® (All-in-One Microbial Test) kullanılarak hedefli yeni jenerasyon DNA sekanslama testi uygulandı. Bu test ile spesifik mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik moleküler imzaların belirlenmesi amaçlandı. Son sözü edilen test elde edilen örneklerin muhafazalı korunma ile nakil sonrası Midog Merkezinde DNA ekstraksiyonu (örnekleme açığa çıkabilen mikropların tamamına yönelik) mikrobiyel DNA’nın seçici amplifikasyonu ile yeni jenerasyon DNA sekanslama (Illumina, Inc., San Diego, CA) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Akan veri analizi, toplanan örneklerde mevcut bakterilerin kesin ve doğru (tür düzeyinde) tanımlamalarına olanak sağlamak adına, DNA dizilerini harici hizalamak için küratörlü mikrobiyel veritabanı aracılığıyla gerçekleştirildi.

Sağaltım Modellemesi

Sağaltım modellemesinde Prof. Dr. Kerem Ural'ın bilimsel literatüre kattığı şekli ile “değişmeli takvim probiyoterapi” (Ural ve ark., 2020a, 2020b) çoklu suş hali uygulandı. Çalışmamızda kullanılan (günlük) rektal enema probiyotik sağaltımında metodolojik yaklaşımda probiyotik enema olarak kullanılan *Cocobiotic* (*Akkermansia muciniphilia*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*) (Art de Huille, Hülya Kayhan) farmasötik takdim şekli usulüne uygun şekilde hazırlanarak, rektumdan 15 cm ileriye tatbik edildi (Şekil 2). Çalışmamızda sağaltım modellememizin tüm olgularda herhangi bir yan etkiye neden olmaksızın ilgili protokol titizlikle, aksatılmadan uygulanması sağlandı.

BULGULAR

Klinik olgu resimleri şekiller 3-14 arası sunuldu. Olgulara ait bireysel (tablo 2 ve şekil 2) FkEaİ skorlamaları ile skora ait ortanca değerler şekil 3 ve 4'te gösterildi. Klinik bulgularda (şekil 3) ve serum biyokimyasal bulgularında meydana gelen değişimler (şekil 4) ayrı ayrı bar grafik olarak sunuldu. Terapötik sağaltım modellememiz eşliğinde gerek klinik bulgularda gerekse laboratuvar analizlerinde ortanca değerlere ait değişim (azalma) klinik iyileşmeyi de

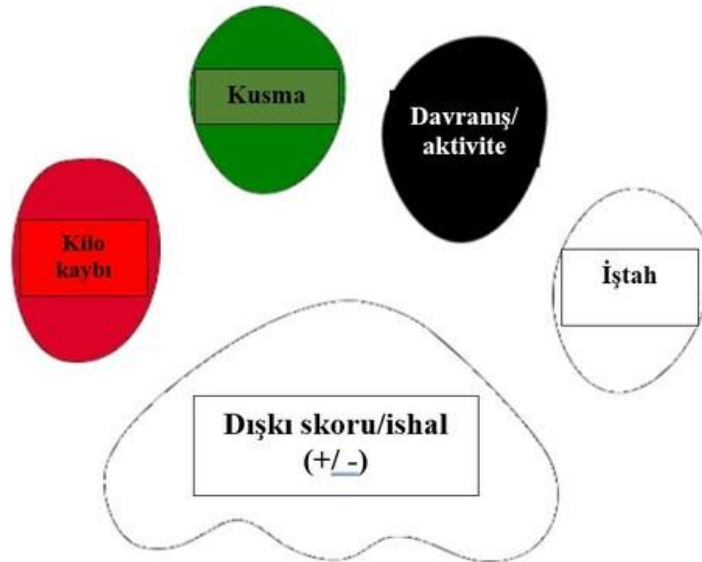
beraberinde getirdi. On günlük rektal enema protokolünde herhangi bir yan etki saptanmadı.

Olgulara Ait Klinik ve Makroskobik Değerlendirme

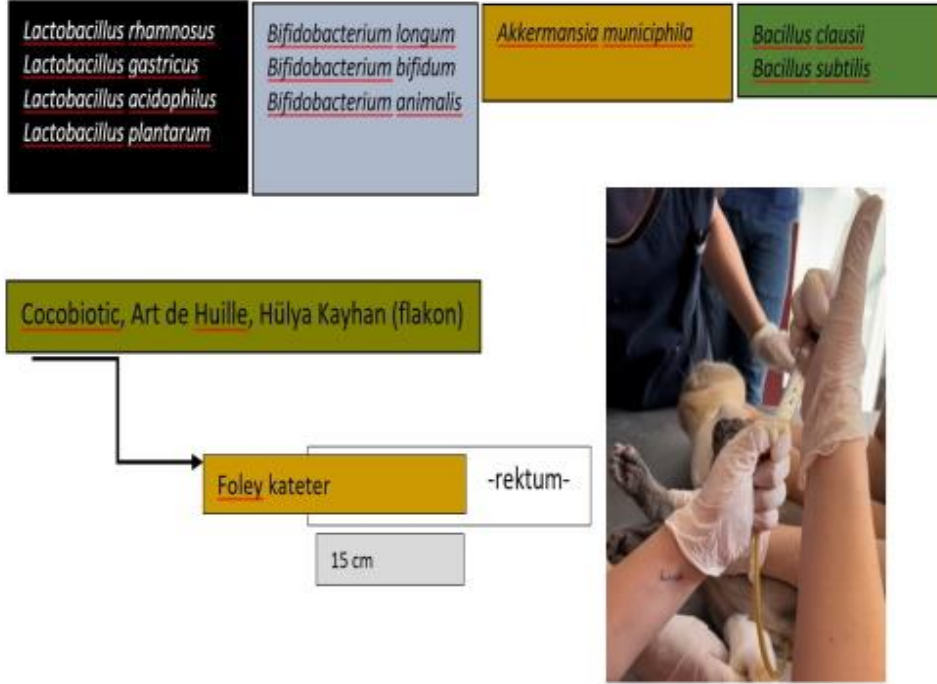
Olgulardan bazılarında ait demografik verileri de kısaca içeren açıklamalar görseller eşliğinde aşağıda kısıtlı ve kısa olgu atlası şeklinde sunuldu (Şekil 7-14).

Mikrobiyota Analizleri


Mikrobiyotanın sınıf seviyesinde dağılımı Şekil 15 ile 16 ve Tablo 2' de gösterildi. Mikrobiyel toplulukların filum, sınıf, sıra, aile, genus ve tür düzeylerinde genel dağılımına ait veri havuzu Temel (asıl) koordinat analizleri, α dağılım sonuçları ile de desteklendi. İlâveten oldukça az sayıda literatürle karşılaştırmalı olarak bağırsak mikrobiyel aile (toplulukları) düzeyinde bu çalışma kapsamında özellikle verildi. Tek değişkenli ve operasyonel taksonomik ünite (OTU) analizleri doğrultusunda kEnt bulunan kedilerde fakültatif anaerobik taksa alt değerlendirmesinde *Firmicutes* filumunda [*Ruminococcaceae* (bağıl bolluk 10 olgudan 8'inde minimum-maksimum %0-2,7) ve *Turicibacteraceae* (-) aileleri] daha düşük zenginlikle saptanırken; yine fakültatif anaerobik taksa altında *Enterobacteriaceae* (minimum-maksimum %0,2-8,2) ile *Streptococcaceae* (minimum-maksimum %0-28,8) ailelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 15 ve 16).



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen klinik parametreleri



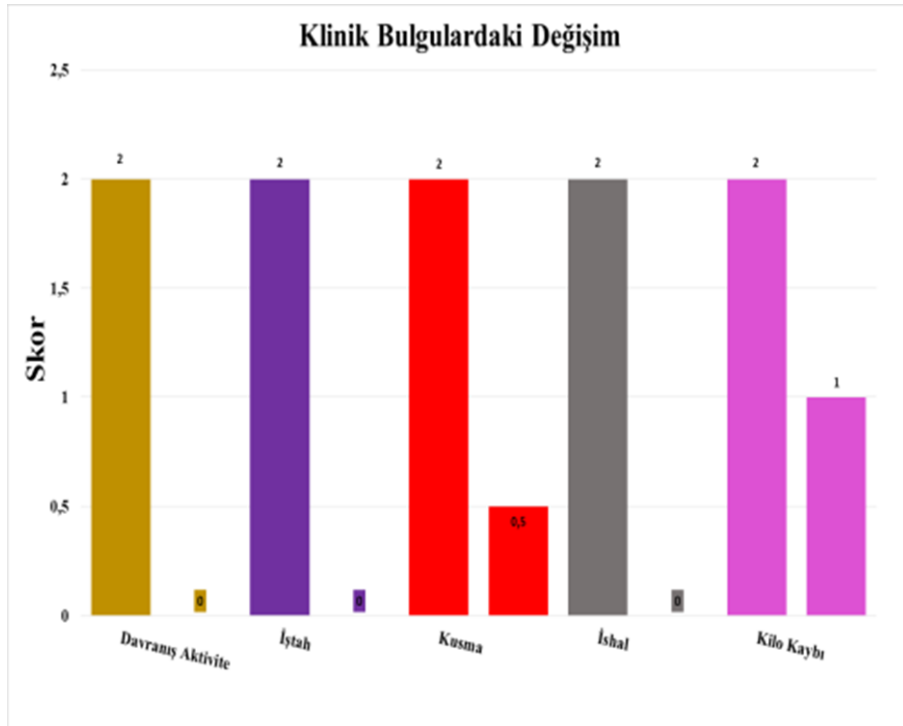
Şekil 2. Çalışmada rektal enema ile uygulanan probiyotik (çoklu suş içeren) kombinasyonunun şematik ve aktif uygulama prosedürleri (Olgu I).

	Faktör skor/puantaj			Ara toplam
<u>Gi belirtiler</u>	1 <u>hafif</u>	2 <u>orta</u>	3 <u>şiddetli</u>	
Tutum/aktivite		<u>x</u>		= 2
İştah			<u>x</u>	= 3
Kusma		<u>x</u>		= 2
<u>ishal</u>			<u>x</u>	= 3
<u>Kilo kaybı</u>			<u>x</u>	= 3
Toplam puan				13

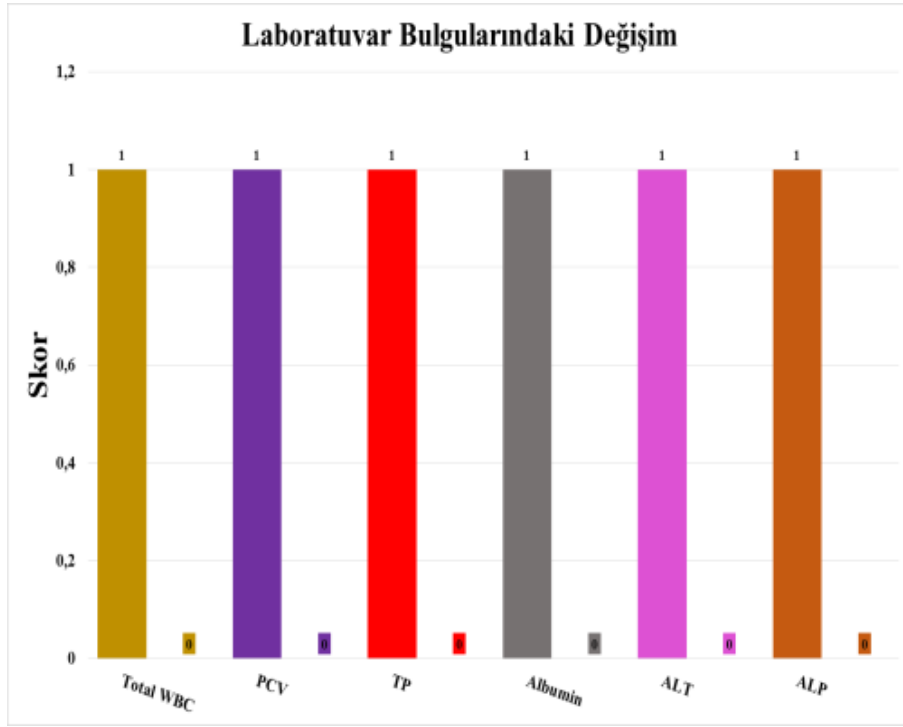
Şekil 3. II nolu olguda modifiye eksiltilmiş FkEaİ skoru örnekleme. Olgularda klinik skorlama önceki literatür eşliğinde (Jergens ve ark., 2010) modifiye edilerek hesaplandı.

Gİ BELİRTİ	Faktör			Ara toplam	
Tutum/aktivite	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	1
	hafif	orta	şiddetli		
İştah	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	=	0
	hafif	orta	şiddetli		
Kusma	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	2
	hafif	orta	şiddetli		
İshal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	0
	hafif	orta	şiddetli		
Kilo kaybı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	2
	hafif	orta	şiddetli		
Endoskopik lezyonlar	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	hayır		evet		
Toplam protein	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	normal		artış		
ALT/ALP	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	-	0
	normal		artış		
Fosfor	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	normal		azalış		
bileşik FCEAI skoru elde etmek için ara toplam ekleyin				→	8

Şekil 4. Orijinal hali ile (Jergens ve ark., 2010) FkEaİ kompozit skorunun olgu bazlı hesaplanması. Görsel orijinal halinden öz dilimize farklılaştırılarak bu çalışmada kapsamındaki bir olguya yorumlanmış ve hesaplanmıştır. Eksiltelen parametre (fosfor) hesaplamaya dahil edilemediğinden (idari ve mali iktisadi koşullar) meFkEaİ değerlendirmesi zaruri kılınmıştır.



Şekil 5. Kronik enteropati ve çalışmaya dahil edilen kEnt'li kedilerde rektal enema ile probiyotik yolla uygulanması öncesi 0. gün ile 10. gündeki değişim ile meFkEaİ skorları.



Şekil 6. Kronik enteropatili ve çalışmaya dahil edilen edilen kEnt'li kedilerde rektal enema ile probiyotik uygulanması öncesi 0. gün ile 10. gündeki laboratuvar bulgularında değişim ile meFkEaİ skorları.



Şekil 7. Olgu III. İki buçuk yıldır süregelen ve çözülmemiş kEnt'i mevcut kedide a) herhangi bir uygulamada bulunulmadan hemen önce, b) sağaltım protokolümüze eşlik eder şekilde 3. ve 11. günlerdeki dışkınn kompozisyonu. Olgunun meFkEaİ kompozit skorunda bariz ve belirgin derecede azalma mevcut.



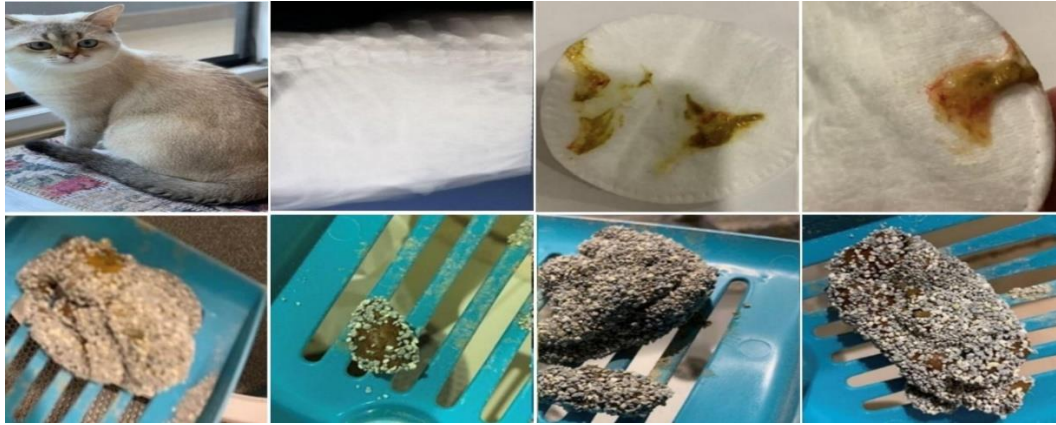
Şekil 8. Olgu IV. Yaklaşık 1 yıldır süregelen kronikleşmiş gi problemleri, dolayısıyla çözülmemeyen kEnt'i bulunan kedide (şahibi de ilgili bir Veteriner Hekim) daha sağaltımın hemen başlarında değişimin mimarı elbette çalışma protokolümü. Çalışma başlangıcındaki meFkEaİ skorunda meydana gelen değişime çalışma sonundaki klinik iyileşme, uzun dönem nüks görülmemesi de yerleşik mikrobiyomun düzenlediğinin, muhtemel disbiyozisin giderildiğinin ve bağırsaktaki enflamasyonun çözümlendiğinin emareleri



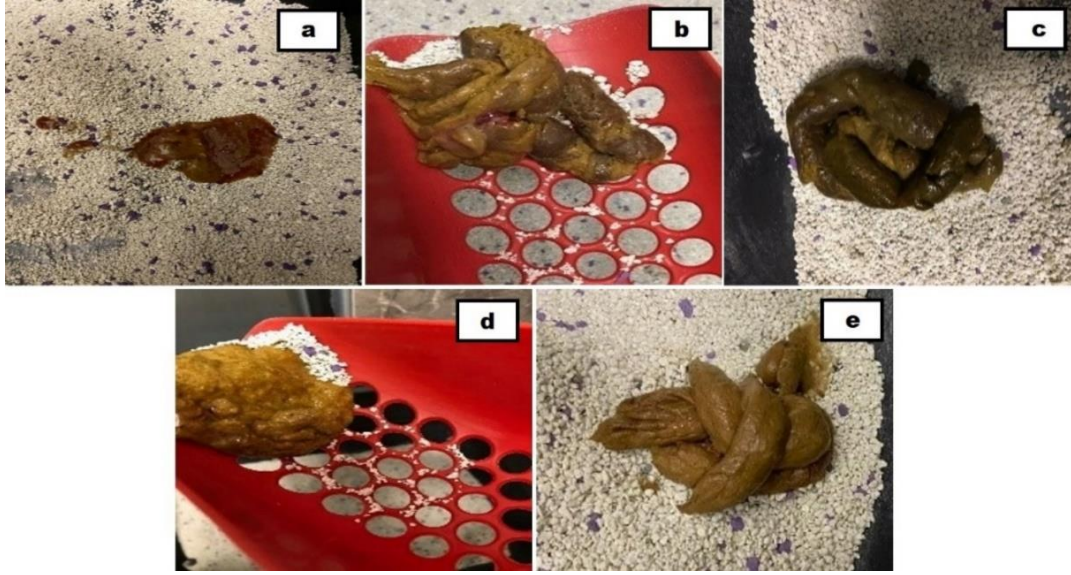
Şekil 9. a) Olgu V. Glutenli ve soyalı mama devam ederken çalışma takvimine geçilmeden hemen önce-3. gün, b)-2. gün, c) çalışma takvimi ile doğru orantılı probiyotik uygulamasından sonraki 7. saat, d) 31. saat, e)55. saat, f) 79. saat.



Şekil 10. Olgu VI. Mukoid kıvamdaki dışkıda değişim ve dönüşüm çalışma protokolünün başarılı olduğunun kanıta dayalı verisi. Dışkı kompozit skorunda ve meFkEaİ kompozit skorunda bariz ve belirgin derecede azalma mevcut.



Şekil 11. Olgu VII. Çok uzun yıllardır kEnt'i bulunan kedide mukoid kıvamdaki dışkılama, çalışma protokolümüzün devreye girmesi ile meFkEaİ kompozit skorunda değişimle kanıta dayalı hale dönüşüyor.



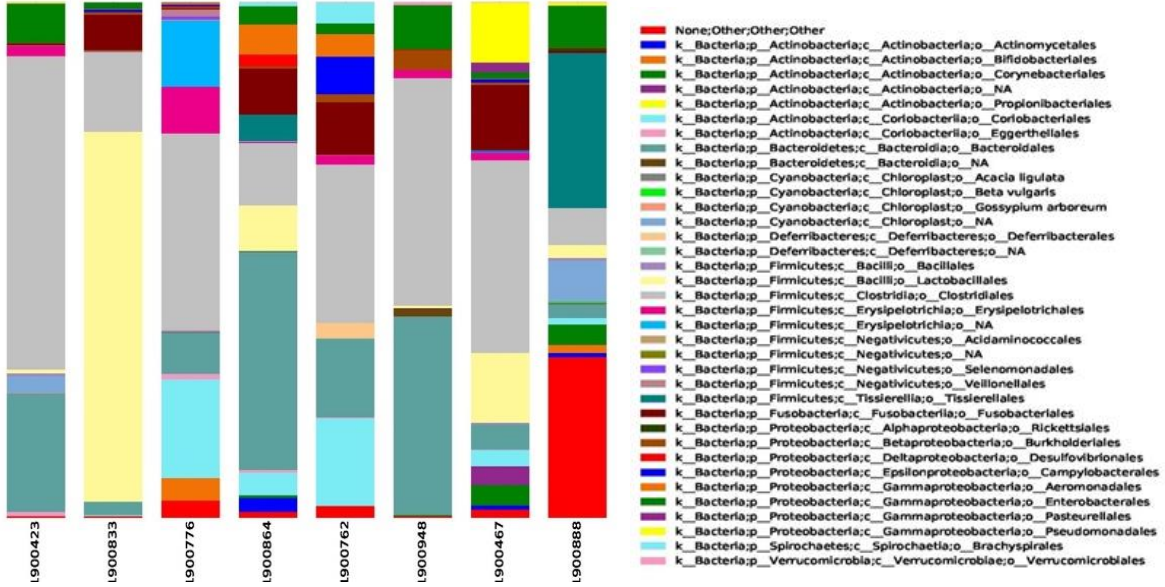
Şekil 12. Olgu VIII. Sırası ile a) sağaltım öncesi, b)18.06.2021, c)24.06.2021, d) 06.07.2021, e)10.07.2021 tarihlerinde değişim ve dönüşümü ispatlar nitelikte.



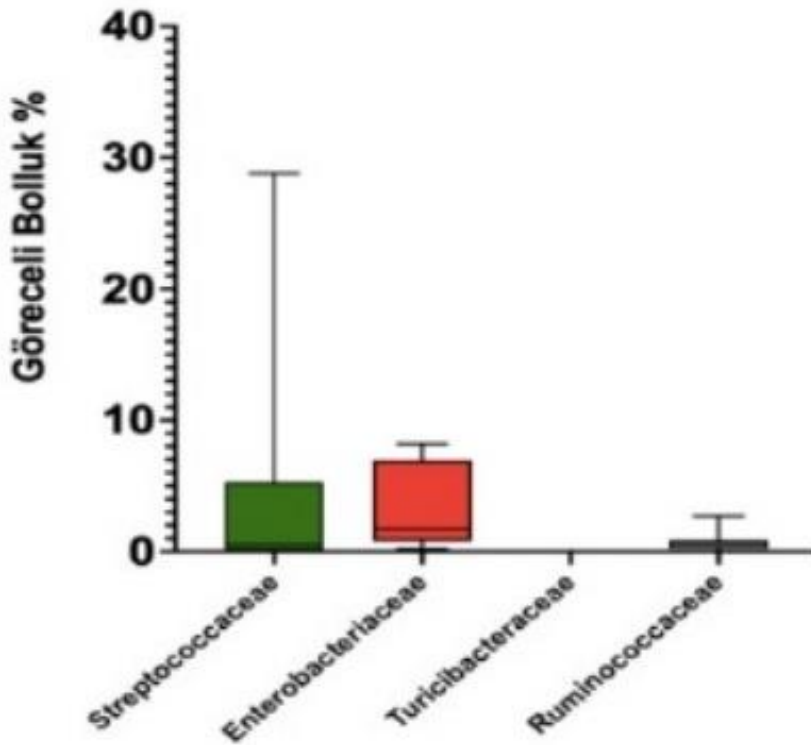
Şekil 13. Ardışık 10 dışkıda makroskopik görünüm. Hasta sahibinden alınan bilgi ve kayıt altına alınan sayısız görsel arasından yaptığımız seçimlerde ardışık 6 dışkının yalnızca 1'inde kan görülmesi oldukça sevindirici. Olgunun kronikleşen kE tablosunun olumlu yönde seyri hasta sahibi memnuniyetini de beraberinde getiriyor.



Şekil 14. Aktif takibi oldukça düzenli şekilde hem tarafımızca hem de hasta sahibince yapılan olgumuzda değişim ile dönüşüm oldukça tatmin edici.



Şekil 15. Çalışmamıza dahil edilen kEnt’li kedilerden 8’inde bağırsak mikrobiyotasının sınıf seviyesinde bağıllı bollağına ait topluluk (community) barplot analizleri. Renkli kutucuklar farklı bakteriyel biyoçeşitliliğe ait verileri sunmaktadır. Mikrobiyom akan veri analizi sadece sağıltım öncesine aittir.



Şekil 16. Bağıllı (göreceli) bollağı oranları aile düzeyinde gösterimi

Tablo 1. Klinik parametrelerin skorlandırılması (Jergens ve ark., 2010).

Değişken	Birim / Kod
Tutum / aktivite	<ul style="list-style-type: none">0 normal1 hafif azalma2 ılımlı artış3 ciddi azalma
İştah	<ul style="list-style-type: none">0 normal1 hafif azalma2 ılımlı azalma3 ciddi azalma
Kusma	<ul style="list-style-type: none">0 hiçbiri1 hafif (1 kez / hafta)2 orta (2-3 kez / hafta)3 şiddetli (4 kez > / hafta)
İshal	<ul style="list-style-type: none">0 iyi şekillendirilmiş dışkı1 hafif yumuşak dışkı, dışkı kanı, mukus veya hafif artmış frekans (2-3 kez / gün)2 çok yumuşak dışkı veya nispeten artmış frekans (4-5 kez / gün)3 sulu ishal veya ciddi oranda artmış frekans (> 5 kez / gün)
Kilo kaybı	<ul style="list-style-type: none">0 yok1 hafif (% < 5 kayıp)2 orta (% 5-10 kayıp)3 ciddi (% >10 kayıp)

Tablo 2. OTU analizleri dahilinde taksonomik verilerle destekli aile düzeyinde (öne çıkan ve seçilmiş) bağlı bolluk (ortanca, min. ve maks. değerleri)

Seviye	Taksonomi	Ortalama	Ortanca	Min-mak
Aile	Streptococcaceae	%5.01	%0.05	%0- %28.8
Aile	Enterobacteriaceae	%3.3	%1.7	%0.2- %8.2
Aile	Turicibacteraceae	%0	%0	%0
Aile	Ruminococcaceae	%0.08	%0.7	%0- %2.7

TARTIŞMA

Gastrointestinal kanalda komensal mikrobiyota düzenli olarak intestinal epiteliyal hücrelerle etkileşimde olup, bu durum sağlıklı bir gi kanalın inşasında (Ley ve ark., 2006) ve immun sistemin fonksiyonlarında elzemdir (Artis, 2008). Gi kanalı çevreleyen epiteliyal hücreler; enterik mikrobiyotayı ve konakçı dokuları birbirlerinden ayıran bir bariyer olarak anahtar rolde gi homeostazisi sağlayarak patojenik bakterilere karşı ilk adım defans mekanizmalarında rol almaktadır. Şayet

disfonksiyonel intestinal bariyer mevcut ise intestinal lümen

mezenterik lenf nodüllerine ve sistemik sirkülasyona bakteriyel translokasyon şekillenebilmektedir. Müteakip karaciğer, dalak vb. organlarda infiltrasyon ile muhtemel sepsis ve çoklu organ yetmezlikleri şekillenebilir (Turner, 2006). Yine de inflamatuvar bağırsak hastalığında intestinal bariyer fonksiyonunun rolü tam açıklığa kavuşturulmasa da, iyi birer fitokimyasal [fenolik asit, flavonoidler, mineraller ve vitaminler] kaynağı olan meyve ve sebzelerin, kolonik

mikrobiyota tarafından açığa çıkarılan metabolitleri anti-inflamatuvar etkinlik göstermektedir (Larrosa ve ark., 2009). Bu yönüyle değerlendirildiğinde beslenmenin düzenlenmesi ve fitokimyasal nitelikte yem katkı maddeleri ile nutrasötiklerin, ilaveten bu çalışmaya konu olduğu üzere probiyotiklerin kullanımının ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir. Biz de bu çalışmada enema ile 'değişmeli takvim probiyoterapi' (Ural ve ark., 2020a; Ural, 2020b) uygulamasının yeni evrilmiş hali ile çoklu suş probiyoterapide rektal enema ile kısa vadede kEnt sağaltımındaki etkinliği değerlendirildi.

İnsanlarda inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) patogenezi irdelendiğinde oluşagelen disbiyozis, metabolitlerin üretimindeki bozulma ile ilişkilendirilmektedir. Asetat, propionat ve bütirat formlarında kısa zincirli yağ asitleri üretiminde *Faecalibacterium prausnitzii* vb. bakteriler yer almaktadır. Asetat formları bütirat için substrat olmakla beraber; bağırsak epiteliyal hücreleri için ana enerji kaynağı da bütirattır. IBD'den muzdarip insanlara ait dışkı örneklerinde bütirat üreten bakterilerin sayısında azalma tespit edilmiştir (Li ve ark., 2015; Machiels ve ark., 2014; Mahowald ve ark., 2009; Wong ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda *Firmicutes*;c__*Clostridia*;o__*Clostridiales*;f__*Ruminococcaceae*;g__*Faecalibacterium* [sırası ile filum, sınıf, sıra, aile ve genus] düzeylerinde 8 olguda [yine sırası ile %0.0, %0.3, %0.4, %0.1, %0.0, %0.0, %0.5 ve %0.0] bağıl bollukta *Faecalibacterium* tespit edilmiş, her ne kadar karşılaştırmalı mikrobiyom analizi yapılamasa da bunun bütirat üreten bakterilerin sayısında azalmaya işaret edebileceği düşünülmüştür.

Yukarıdaki paragraf ile bilimsel manada etkileşim içerisinde rol model hastalıklar denkleminde IBD ile kEnt'i de eşleştirmek yerinde olacaktır. İntestinal mikrobiyomun üniversal aktivitesi karbonhidratların metabolize edilmesi ve fermentasyonu vasıtası ile asetat, propionat ve bütirat formlarında kısa zincirli yağ asitleri üretimine dönüşümüdür. *Firmicutes* filumunda çoğunlukla anaerobik unsurlar yer almaktadır ki, indirekt anti-inflamatuvar ve immun-modülatör etkinliklerini kısmen bütirat olma üzere, kısa zincirli yağ asitlerini üreterek gösterdikleri bilinmektedir (Walker ve Lawley, 2013). Kolonositlerin ana enerji kaynağının bütirat olduğu (Roeddiger, 1980) göz önünde bulundurulursa, epiteliyal hücre proliferasyonu ile tamir ve intestinal bariyer bütünlüğünün sağlanmasındaki önemi daha net anlaşılabilir (Ashida ve ark., 2012). Tüm bunların yanı sıra bütirat, anti-inflamatuvar ve anti-karsinojenik özellikleri (Canani ve ark., Siavoshian ve ark., 2000) ile öne çıkabilmektedir. İnsanlarda kolonda bütirat üreten bakterilerin ana üyeleri *Firmicutes* filumuna ait *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* ailesi olmakla birlikte, dışkıdaki miktarları değişken olup, ülseratif kolitiste dahil disbiyotik durumlarda sıklıkla azalmaktadır (Halfvarson ve ark., 2017; Nagao-Kitamoto ve Kamada, 2017). Benzer olarak yine kEnt'li kedilerde bütirat üreten bakterilerin sayılarında azalma tespit

edilmiştir (Marsilio ve ark., 2019). İnflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan kedilerde fekal mikrobiyom analizleri, tek değişkenli ve de LEfSE analizleri ile incelendiğinde, inflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan kedilerde fakültatif anaerobik taksa altında, *Firmicutes* filumunda [*Ruminococcaceae* ve *Turicibacteraceae* aileleri], *Actinobacteria* [*Bifidobacterium* genusu] ve *Bacteroidetes* filumlarında azalma belirlenirken; yine fakültatif anaerobik taksa altında *Enterobacteriaceae* ile *Streptococcaceae* ailelerinde artış tespit edilmiştir (Marsilio ve ark., 2019). Özellikle kEnt'li kedilerde *Ruminococcaceae* ailesine mensup türlerin dışkıdaki kümesel yoğunluğu ile bütirat konsantrasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi, bu taksona ait bakterilerin fonksiyonlarının daha net değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır (Marsilio ve ark., 2019). Çalışmamızda yaptığımız OTU analizleri doğrultusunda kEnt mevcut kedilerde *Ruminococcaceae* [Analizi gerçekleştirilen 8 olguda bağıl bolluk minimum-maksimum %0-2.7, ortalama %0.08 ve medyan %0.7] ve *Turicibacteraceae* (-) aileleri], daha düşük miktarda saptanırken; *Enterobacteriaceae* (minimum-maksimum % 0.2-8.2, ortalama %3.3, ortanca %1.7) ile *Streptococcaceae* (minimum-maksimum % 0-28.8, ortalama %5.01, ortanca %0.05) ailelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 15 – 16, Tablo 2).

İnülün tipinde fruktanların kolon fermantasyonu esnasında en önemli etkilerinden birisi bifidobakteriyel sayılarda artış, diğer bilinen ismi ile 'bifidojenik etkidir ki (Gibson ve Roberfroid, 1995; Roberfroid ve ark., 1995), aynı zamanda kolon bütirat üretimi de uyarılarak, bu kez de 'bütirojenik etki' (Falony ve De Vuyst, 2009; Morrison ve ark., 2006; Tsukahara ve ark., 2003) sağlanır. Bu 'bifidojenik etki' ile 'bütirojenik etki' konakçı sağlığı açısından son derece önem arz etmekte ve bifidobakterilerin bütirat üretmedikleri bilinmektedir (Falony ve De Vuyst, 2009; Falony ve ark., 2006; Makras ve ark., 2006; Van der Meulen ve ark., 2004). Bağırsak mikrobiyomunun dengelenmesinde katkısı bulunan bifidobakteri türlerinin yanı sıra kolon epiteliyal hücrelerinin önemli enerji kaynağı konumundaki bütiratın intestinal hücrelerde gelişim ile gen ekspresyonlarında rol alması ile gerek kolitisten gerekse kolorektal kanserden korunma sağlanmaktadır (Falony ve De Vuyst, 2009; Hamer ve ark., 2008; Macfarlane, 1991; Scheppach ve Weiler, 2004). Çalışmamızda kEnt'li kedilerde çoklu suş içeren değişmeli takvim probiyoterapi kapsamında rektal yolla kullanılan bifidobakteri suşlarının da benzer etkiyi göstermiş olması muhtemeldir. Yine çalışmamızda değerlendirdiğimiz, bütirat üretmediği ve genomlarında bütirat üretimine ait yolları bulunmadığı bilinen 4'lü bifidobakteri (Klijn ve ark., 2005; Makras ve ark., 2005) suşlarının besinsel öğelerle karşılanan inülün tipinde fruktanlara ilişkin gelişiminde ve bütirat üretiminde artışa, dolayısıyla da 'bifidojenik etki'ye eşlik edebilecek 'bütirojenik etki'yi kısa sürede gösterebileceği düşünülmüştür (Falony ve De Vuyst, 2009; Morrison ve ark., 2006; Tsukahara ve ark., 2003). Elde ettiğimiz bulgular, çalışma

protokolümüz içerisinde yer alan 3'lü bifidobakteri suşlarının sağaltımda diğer suşlara ilave olumlu yönde katkı sunması yönünden değerlidir. Şöyle ki klinik ve laboratuvar bulgularındaki değişim ve meFkEaI skorundaki (Jergens ve ark., 2010) azalma diğer probiyotik suşlarının yanı sıra bifidobakterlerle de ilişkide olabilir. İlaveten çalışma sonuçlarının olumlu yönde teşkilinde (meFkEaI dahilinde gastrointestinal bulgular 0-3 arasında değişkenlerin iz düşümü) yine çoklu suş probiyoterapi uygulamasına bağlı olarak (her ne kadar ölçülemez de), bütirik asit konsantrasyonunun yükselebileceği (Paturi ve ark., 2012) öne sürülebilir. Bununla birlikte çalışmamızda seçilen suşlar; bağırsak duvarının savunmasını güçlendirmek üzere sıkı/ara bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırmış (Cresci ve ark., 2014; Peng ve ark., 2009), böylelikle dolaşıma salınan bakteriyel komponentler olan lipopolisakkaridlerin translokasyonu sonrası şekillenen proinflamatuvar cevapta azalmaya (Cani ve ark., 2008; de La Serre ve ark., 2010) sebep olmuş da olabilir.

Bifidobacterium spp. ve *Lactobacillus spp.* genusuna dahil olan mikrobiyota üyeleri genel olarak güvenli ve gi kanalda artışları ile birlikte konakçı yararına olan unsurlardır. Yapılan bir çalışmada uygulanan *L. plantarum* ZLP001 suşu, enterotoksijenik *Escherichia coli*'nin bağırsak geçirgenliğinde artışı azaltmış, TJ proteinleri olan claudin-1, occludin ile ZO-1 seviyelerindeki azalmayı da hafifleterek proinflamatuvar sitokinlerden IL-6, IL-8 ve TNF α ekspresyonunu aşağı yönde regüle etmiştir (Wang ve ark., 2018). Aynı çalışmada ayrıca *L. plantarum* ZLP001 suşunun intestinal bariyer fonksiyonlarını olumlu yönde değiştirerek bağırsak epitelyumunu güçlendirmiş ve bağırsak mikrobiyotasını modüle etmiştir. Domuz yavrularında yapılan bu çalışmada elde edilen bütirat üreten bakterilerden *Anaerotruncus* ve *Faecalibacterium* sayılarındaki artış ve buna karşın epiteliyal inflamasyona yol açan *Clostridium sensu stricto* 1 hücresel yoğunluğunda azalmanın, *L. plantarum* ZLP001 suşunun etkinliğine bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2018). İnsanlarda yapılan bir çalışmada benzer şekilde *L. plantarum* IS 10506 takviyesinin kısa zincirli yağ asit profilinin tamamına (asetat, propiyonat ve butirat) etki ettiği görülmüştür (Kusumo ve ark., 2019). *L. plantarum* 299v suşunun, antibiyotiklerin kolonik fermentasyon üzerinde oluşturduğu negatif etkileri azaltarak tersine çevirebildiği, *Clostridium difficile* ile ilişkili nüks edici karakterde ishallerde yararlı etki sağlayabileceği de bildirilmiştir (Wult ve ark., 2007). Çalışmamızda uyguladığımız çoklu probiyotik sağaltımında da kullanılan ve sağaltım protokolümüzde (Ural, 2019a; Ural, 2020b) yer alan *L. plantarum* diğer araştırmacıların bahsettiği gibi kolonik fermentasyon üzerine etki ederek, antiinflamatuvar aktivitede bir artış sağlamış ve bu olgularımızda yarar göstermiş olabilir.

Çalışmamızın temel sağaltım moleküllerinden olan (mikrobiyom odaklı) *A. muciniphila* [bağırsak

mikrobiyotasının anaerobik üyesi] güncel olarak, yeni-jenerasyon probiyotik (Ashrafiyan ve ark., 2021) ya da 'Bağırsak Mikrobiyomu Rönesansı' olan medikal bir probiyotik (Pendulum Therapeutics) olarak adlandırılmaktadır. İlk olarak 2004'te izole edilen *A. muciniphila*, i) enerji depolanması, ii) insülin duyarlılığının artırılması, iii) insülineminin ve plazma total kolesterolünün azaltılması, iv) inflamasyonu kontrol altına alan endokanabinoidlerin intestinal seviyelerinin, bağırsak bariyer fonksiyonlarının ve bağırsak peptid sekresyonunun (insanda ve fare modelinde) artırılması gibi etkileri ile tüm vücutta metabolik faaliyetlerle etkileşimde bulunmaktadır (Everard ve ark., 2013; Depommier ve ark., 2019). Köpeklerde antibiyotik uygulamaları sonrası *A. muciniphila*'nın gi kanal ilişkili sistematik biyobelirteçler ve epiteliyal hasarlanma üzerine etkilerine yönelik olarak araştırmalar da mevcuttur (Jugan ve ark., 2018). Çalışmamız, oldukça güncel ve önemli olan *A. muciniphila*'nın, halen ülkemizde ve hatta şu an için dünyada rektal enema şeklinde kullanıldığı, ilk veya öncü çalışmalardan biri durumundadır.

Akkermansia-benzeri bakterilerin memeli bağırsak mikrobiyomu alemi içerisinde alfa- ve beta-dağılımına yönelik [sekans derinliğindeki kısıtlılıklar veya incelenen/örneklemi yapılan hayvanlarda varlığının tespit edilemeyişi] yeterince araştırma belirememektedir. Bunun yanı sıra *Akkermansia*'nın oldukça düşük prevalansa sahip olması ve kedi ile köpeklerin ince bağırsak mikrobiyomunda baskın üye olmayışı yapılan analizlerde tespit edilemeyişi açıklayan bir durum olabilir. Bu durum kedi ile köpeklerin ince bağırsak mukozal katmanının ince ve daha düşük ekojentiye sahip oluşuyla ilgili olabilir. Anılan faktörler biyokimyasal koşullar (safra mevcudiyeti vb.) gi kanalda mikrobiyel yaşamı kısıtlayıcı faktörlerdir. Özellikle köpekler ve kısmen de kedilerde yüksek oranda soy içi üreme söz konusu olduğundan, mikrobiyotaları yetiştiricilik faktörü ile içi içe geçmiş olabilir (Garcia-Mazcorro ve ark., 2020). Değişik üreticilerden temin edilen laboratuvar farelerinde oldukça farklı mikrobiyom ile karşılaşılmış, *Akkermansia spp.* mevcudiyetinde belirgin farklılar görülmüştür (Xiao ve ark., 2015). Kedi ile köpeklerde gerçekleştirilen fekal mikrobiyota analizlerinin pek çoğunda *Verrucomicrobia* belirlenemese de 12 sağlıklı kediden 1'inde çok düşük kümesel yoğunlukta (%0.01) *Akkermansia* saptanan araştırmalar mevcuttur (Handl ve ark., 2011). Yine güncel bir çalışmada evde bakılan 46 kediden %0.11'inde fekal *Verrucomicrobia* kümelenmesi tespit edilmiştir (Jha ve ark., 2020). Çalışmamızda analizi gerçekleştirilen 8 olgudan birisinde (6 nolu olgumuz), %0.5 oranında fekal *Verrucomicrobia* filumuna ait tespit yapılmış olup, diğer örneklerimizde ise %0 oranında belirlenmiştir. Çalışmamızda, *Verrucomicrobia*, c__*Verrucomicrobiae*, o__*Verrucomicrobiales*; f__*Akkermansia* nin [sırası ile filum, sınıf, sıra, aile ve genus düzeylerinde] 6 no'lu olguda %0.5 bağlı bollukta tespit edilmesi, *Akkermansia* nin kedilerde yapılacak mikrobiyom

analizlerinde doğal olarak bulunabileceğinin önemli bir işareti olabileceği kanaatine varılmıştır.

SONUÇ

İnsanlarda İBH'ye benzer şekilde kedilerde de bağırsak disbiozisin patojenik rol alabileceği ve çözümün bir parçasının öbiyotik dengenin sağlanması olabileceği, bu çalışmada ortaya koyduğumuz güçlü verilere [i] 8/10 olguda sağaltım öncesi bağırsak mikrobiyom analizleri, ii) klinik skorlarda belirgin gerilemeye eşlik edecek şekilde dışkı kompozisyonunun gözle görülür şekilde düzelmesi, iii) rektal enema ile uygulanan probiyotik süşunun *Akkermansia muciniphila* dahil çoklu süş içermesi ve bu içeriğe karşı iyi yanıt alınması, iv) çalışmaya dahil edilen olguların 6-9 ay süren takip/monitörizasyon süreçlerinde olumsuz değişiklik, geriye dönüş ya da nüks gözlemlenmemesi, vb. sebeplerle] bağlı olarak ileri sürülmüştür. Kanaatimizce hastalığın kontrolünün kedilerde mikrobiyom odaklı sağaltım prensipleri ile de mümkün olabileceği, rektal enema ile başka, farklı ve yeni sağaltım modellemesinin (en azından bu çalışma kapsamına alınan) çalışmamızdaki kedilerde uyguladığımız hali ile büyük yarar sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Non-patojenik minicanlıları içeren probiyotiklerin doğru süş tercihleri dahilinde bağırsakta öbiyotik dengenin tesisinde yararlı minicanlılar lehine pozitif etki ile dengeyi değiştirebileceği, mikrobeseysel unsurların emilimini geliştirebileceği ve tüm bu yönleri ile insanlarda İBH'da olduğu gibi (Bernstein, 2015; Hajela ve ark., 2015), kanatimiz ve öngörülerimizin yanı sıra elde ettiğimiz bulgularla kEnt'li kedilerde de hastalık aktivitesini olumlu yönde değiştirebileceği öne sürülebilir. Probiyotik enema ile yaptığımız önceki çalışmalarımızda (Ural ve ark., 2021; Ural ve ark., 2021) probiyotiklerin benzer şekilde hedef noktaya en yakın yerden bırakılmasının, mide asidi ile ve/veya safra asitleri ile temas riskini by pass etmesinin yanı sıra protokolda yer alan, *A. muciniphila* gibi yeni jenerasyon, obligat kemoorganotrofik ve mukus degrade eden yararlı bir bakteri için kolon'da ihtiyaç duyduğu optimum gelişim pH'sındaki ortama olanak sağlayacağı (6.5) (Geerlings ve ark., 2018), oldukça yakın kedi kolonu pH'sı [beslenmeye bağlı değişimle birlikte (6.2)], (Williams, 1965) ve bu yöntemin benzer tüm yararlı probiyotik minicanlıların maksimum etki göstermesine sebep olabileceği de düşünülmüştür.

Çıkar çatışması: Bu çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 64583101/2021/150 numara ile bu çalışmanın izni alınmıştır.

Finansal destek: Bu çalışmada finansal destek bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Artis D.** Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews immunology*, 2008;8(6):411-420.
- Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C.** Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature chemical biology*, 2012;8(1):36-45.
- Ashrafian F, Keshavarz Azizi Raftar, Shahryari, A, Behrouzi A, Yaghoubfar R, Lari A, Siadat SD.** Comparative effects of alive and pasteurized *Akkermansia muciniphila* on normal diet-fed mice. *Scientific reports*, 2021;11(1):1-13.
- Bernstein CN.** Treatment of IBD: where we are and where we are going. *Official journal of the American College of Gastroenterology*. ACG. 2015;110(1):114-126.
- Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A.** Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011;17(12):1519.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R.** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-1481.
- Cresci GA, Bush K, Nagy LE.** Tributyrin supplementation protects mice from acute ethanol-induced gut injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2014;38(6): 1489-1501.
- de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartma AL, Rutledge JC, Raybould HE.** Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;299(2):G440-G448.
- Dennis JS, Kruger JM, Mullaney TP.** Lymphocytic/plasmacytic colitis in cats: 14 cases (1985-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993;202(2): 313-318.
- Dennis JS, Kruger JM, Mullaney TP.** Lymphocytic/plasmacytic gastroenteritis in cats: 14 cases (1985-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;200(11):1712-1718.
- Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, Cani PD.** Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine*. 2019;25(7):1096-1103.
- Everard A, Belzer C, Geurts, L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Cani PD.** Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2013;110(22):9066-9071.
- Falony G, De Vuyst L.** Ecological interactions of bacteria in the human gut. *Prebiotics and probiotics science and technology*. 2009;639.
- Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, Vuyst LD.** Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(12):7835-7841.
- Garcia-Mazcorro JF, Minamoto Y, Kawas JR, Suchodolski JS, de Vos WM.** *Akkermansia* and microbial degradation of mucus in cats and dogs: implications to the growing

- worldwide epidemic of pet obesity. *Veterinary sciences*. 2020;7(2):44.
- Geerlings SY, Kostopoulos I, De Vos WM, Belzer C.** *Akkermansia* muciniphila in the human gastrointestinal tract: when, where, and how?. *Microorganisms*. 2018;6(3):75.
- Gibson GR, Roberfroid MB.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 1995;125(6):1401-1412.
- Hajela N, Ramakrishna BS, Nair GB, Abraham P, Gopalan S, Ganguly NK.** Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2015;34(2):93-107.
- Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, Jansson JK.** Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature microbiology*. 2017;2(5):1-7.
- Hall EJ, German AJ.** Diseases of the small intestine. In: Ettinger SJ, Feldman EC., eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders. 2004; pp.1332–1378.
- Hamer HM, Jonkers DMAE, Venema K, Vanhoutvin SALW, Troost FJ, Brummer RJ.** The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2008;27(2):104-119.
- Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS.** Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology*. 2011;76(2):301-310.
- Hart JR, Shaker E, Patnaik AK, Garvey MS.** Lymphocytic-plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988-1990). *American Animal Hospital Association (USA)*. 1994.
- Jergens AE, Crandell JM, Evans R, Ackermann M, Miles KG, Wang C.** A clinical index for disease activity in cats with chronic enteropathy. *Journal of veterinary internal medicine*. 2010;24(5):1027-1033.
- Jergens AE, Moore FM, Haynes JS, Miles KG.** Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;201(10):1603-1608.
- Jha PN, Gomaa AB, Yanni YG, El-Saadany AEY, Stedtfeld, TM, Stedtfeld RD, Dazzo FB.** Alterations in the endophyte-enriched root-associated microbiome of rice receiving growth-promoting treatments of urea fertilizer and *Rhizobium* biofertilizer. *Microbial ecology*. 2020;79(2):367-382.
- Jugan MC, Rudinsky AJ, Gordon A, Kramer DL, Daniels JB, Paliy O, Gilor C.** Effects of oral *Akkermansia* muciniphila supplementation in healthy dogs following antimicrobial administration. *American journal of veterinary research*. 2018;79(8):884-892.
- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F.** Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29(3):491-509.
- Kusumo PD, Maulahela H, Utari AP, Surono IS, Soebandrio A, Abdullah M.** Probiotic *Lactobacillus plantarum* IS 10506 supplementation increase SCFA of women with functional constipation. *Iranian Journal of Microbiology*. 2019;11(5):389.
- Larrosa M, Luceri C, Vivoli E, Pagliuca C, Lodovici M, Moneti G, Dolara P.** Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(8):1044-1054.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI.** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-848.
- Li J, Butcher J, Mack D, Stintzi A.** Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(1):139-153.
- Macfarlane GT.** The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. 1991;51-92.
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, Vermeire S.** A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-1283.
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Gordon JI.** Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(14):5859-5864.
- Makras L, Falony G, Van der Meulen R, De Vuyst L.** Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of applied microbiology*. 2006;100(6):1388-1390.
- Makras L, Van Acker G, De Vuyst L.** *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700: 2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):6531-6537.
- Marsilio S.** Feline chronic enteropathy. *Journal of Small Animal Practice*, 2021;62(6):409-419.
- Marsilio S, Pilla R, Sarawichitr B, Chow B, Hill SL, Ackermann MR, Suchodolski JS.** Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-11.
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT.** Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?. *British Journal of Nutrition*. 2006;96(3):570-577.
- Nagao-Kitamoto H, Kamada N.** Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. *Immune network*. 2017;17(1):1-12.
- Paturi G, Mandimika T, Butts CA, Zhu S, Roy NC, McNabb WC, Ansell J.** Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in *mdr1a*^{-/-} mice, a model of inflammatory bowel diseases. *Nutrition*. 2012;28(3):324-330.
- Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J.** Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1619-1625.
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR.** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of nutrition*. 1998;128(1):11-19.
- Scheppach W, Weiler F.** The butyrate story: old wine in new bottles?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2004;7(5):563-567.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M.** Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000;47:397-403.
- Tsukahara T, Iwasaki Y, Nakayama K, Ushida K.** Stimulation of butyrate production in the large intestine

of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2003;49(6):414-421.

- Turner JR.** Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American journal of pathology*. 2006;169(6):1901-1909.
- Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Camkerten İ, Şahin N.** Circulating Serum Zonulin Levels Before and After Probiotic Enema Treatment in Dogs with Atopic Dermatitis: Randomized Clinical Study *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2021a;12(2):70-8
- Ural K, Erdoğan S, Balıkçı C, Erdoğan H.** İnovatif Gastroentero-Dermatoloji Kapsamında Muhtelif Yöntem Geliştirme I: *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* ile Probiyotik Eneması Atopik Dermatitli Köpeklerde Anti-Pruritik Etkinlik Sağlar Mı? *Van Vet J*. 2021b;32(2):74-81
- Ural K, Gültekin M, Erdoğan H, Erdoğan S, Gul G, Türk E.** Kısa Dönem Değişmeli Takvim Probiyotik Sağaltımıyla Atopik Dermatitli Köpeklerde Kaşıntı Giderilebilir mi? *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2020a;11(1):1-8
- Ural K.** Küçük hayvan hekimliğinde dermatoloji alanında yeni dönem: bağırsak-beyin-deri eksen-i ve II. Uluslararası Vetexpo Veteriner Bilimleri Kongresi Sözlü sunumları. 20-22.09.2019. İstanbul. 2019a.
- Ural K.** Veteriner İç Hastalıklarında Probiyotikler: Probiyotik Kullanımı rehber Kitabı ve Olgu Atlası. Atalay konf. ve Matb., Ankara. 2020b; pp. 200.
- Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L.** Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(4):1923-1930.
- Walker AW, Lawley TD.** Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research*. 2013;69(1):75-86.
- Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, Wang Y.** Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1953.
- Williams S.** Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1965;89(1):95-122.
- Wong JM, De Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins, DJ.** Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):235-243.
- Wult M, Hagslatt MLJ, Odenholt I, Berggren A.** *Lactobacillus plantarum* 299v enhances the concentrations of fecal short chain fatty acids in patients with recurrent *clostridium difficile* associated diarrhea. *Dig Dis Sci*. 2007;52:2082-2086.
- Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne S B, Xia Z, Qiu X, Kristiansen K.** A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature biotechnology*. 2015;33(10):1103-1108.