

Ratlarda Barsak Mikroflorası Gelişimi Üzerine Diyet Kısıtlaması ile Beslenmenin Etkisi

Tülay ELAL MUŞ¹ Füsün AK SONAT²

Geliş Tarihi: 18-06-2015

Kabul Tarihi: 27-08-2015

Özet: Bu çalışma ratlara uygulanan uzun süreli diyet kısıtlamasının barsak mikroflorası üyesi olan laktobasil, koliform bakteri, enterokok ve Enterobacteriaceae sayıları üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla ratlar iki gruba ayrıldı. Birinci gruba 150 gün süresince diyet kısıtlaması uygulanırken ikinci grup ratlar kontrol grubuydu ve ad libitum olarak beslendi. Her iki grup rata ait feçes örnekleri 1., 30., 60., 90., 120. ve 150. günlerde toplanarak mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarına göre; diyet kısıtlaması uygulanan ratların feçesindeki laktobasil, koliform bakteri ve Enterobacteriaceae sayıları 150. günün sonunda yaklaşık 1 log artış gösterirken, enterokok sayısı aynı düzeyde belirlendi. Diyet kısıtlaması grubunda sadece probiyotik özelliğe sahip bir bakteri olan laktobasil sayısında istatistiksel anlamlılık ($p=0.02$) ortaya çıktı. Kontrol grubunda ise yalnız enterokok sayısında 2 log₁₀ düşme gözlenirken diğer bakteri gruplarının sayılarında değişiklik gözlenmedi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada koliform bakteri ve Enterobacteriaceae sayılarında anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunurken laktobasil ve enterokok sayılarında anlamlılık belirlenmedi ($p>0.05$). Sonuç olarak, uzun süreli diyet kısıtlamasının rat örneğinde barsak mikroflorasını değiştirme potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Diyet kısıtlaması, rat, feçes, mikroflora.

Effect of Fed by Dietary Restriction on Evolution (Growth) of Intestinal Microflora in Rat

Abstract: This study was conducted to evaluate the effect of the long-term dietary restriction applied to rat on counts of lactobacilli, coliform bacteria, enterococci and Enterobacteriaceae which are intestinal microflora members. For this purpose, rats were divided to two groups. While the first group of rats were administered dietary restrictions during 150 days, second group rats were control group and were fed by ad libitum. For both group, faeces samples of rats were collected at 1st, 30th, 60th, 90th, 120th and 150th days and microbiological analysis were performed. According to analysis results, lactobacillus, coliform bacteria enterococci and Enterobacteriaceae counts in the faeces of rats who was applied dietary restriction showed the a 1 log₁₀ increase in the end of the 150th day while enterococci counts were determined in the same level. A statistically significant difference ($p=0.02$) was only observed in the counts of lactobacillus having probiotic properties in dietary restricted group. While a 2 log₁₀ decrease in only enterococci counts in control group was observed, any change in counts of other bacterial groups was not detected. Statistical comparison between groups showed that coliform bacteria and Enterobacteriaceae counts were statistically different ($p<0.05$), while lactobacillus and enterococci counts were not statistically significant ($p>0.05$). As a result of this study, it was determined that the long-term dietary restriction in rat model has potential to change intestinal microflora.

Key Words: Dietary restriction, rat, faeces, microflora.

¹ Uludağ Üniversitesi, Keles Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Programı, Keles, Bursa.

² Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Görükle, Bursa, fusunak@uludag.edu.tr

Giriş

Sağlıklı kişilerin barsaklarında yaklaşık 500 farklı türde bakteri bulunur. Bu bakterilerin sayısı 10^4 kob/g'a kadar çıkabilir (Coşkun 2006). Diyet, yaşam biçiminin düzenlenmesi, antibiyotik, probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin kullanımı barsak mikroflorasının düzenlenmesinde rol oynayan faktörlerdir (Koca 2015). İnsanların yanı sıra kanatlı hayvanlarda da rasyon değişikliği ile sindirim sistemi mikroflorasının değiştirilebildiği kabul edilmektedir (Tüzün 2010).

Diyet kısıtlaması (DK) beslenme yetersizliğine (malnütrisyon) sebep olmaksızın normalden daha az beslenmek, diğer bir ifadeyle günlük kalori alımını kısıtlamak olarak tanımlanmaktadır (Robertson 2013, Aydın 2007). DK'nın maya (*Saccharomyces cerevisiae*), sinekler (*Drosophila melanogaster*), solucanlar (*Caenorhabditis elegans*) ve laboratuvar kemirgenleri (rodent) gibi çok çeşitli canlılarda yaşlanmayı geciktirici ve yaşam süresini uzatıcı etki meydana getirdiği ortaya konmuştur (Giller 2013, Aydın 2009). Bu olumlu etkiler arasında diyetle kısıtlamanın yaşam süresini uzatıcı (maksimum etki kaloride % 55-60 kısıtlama sonucu) etkisi üzerinde en fazla çalışılan konulardan biridir. Uzun süreli diyet kısıtlamasının kanser hücrelerinin gelişimini yavaşlatıcı ve kanserin başlamasını geciktirici; insülin direnci ve metabolik sendromu % 30'a kadar iyileştirici etkisi olduğu bildirilmiştir. DK'nın hastalıklar, yaşlanma ve yaşam süresini uzatmadaki bu olumlu etkileri meydana getiriyor olmadaki temel mekanizmanın, vücutta oluşan reaktif oksijen türlerinin miktarını azaltmasına bağlı olarak oksidatif stresi baskılamasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Shimokawa, 2010). Yine diyet kısıtlaması uygulanan hayvanlarda açlık hissine bağlı olarak fiziksel aktivitenin ve çiftleşme isteğinin arttığı, fakat dişi hayvanlarda fertilitenin azaldığı da belirlenmiştir. Uzun süreli diyet kısıtlamasının serum total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid seviyesini düşürmekle birlikte sistolik ve diyastolik kan basıncını azalttığı tespit edilmiştir. Hücre içerisinde oksidatif stresi azaltıcı, beyin, kalp, karaciğer gibi çeşitli organlarda % 30'a varan mitokondrial biyogenez oluşturma gibi metabolik etkiler gözlenmiştir (Speakman 2011). Olumlu etkilerinin yanı sıra DK'nın ratlarda öğrenme ve hatırlama kabiliyetini düşürdüğü (Rajab 2014), bilişsel fonksiyonları olumsuz etkilediği (Yanai 2004) bildirilmiştir. Diyet kısıtlamasının mey-

dana getirdiği tüm bu etkileri oluşturan moleküler mekanizmalar halen açıklığa kavuşturulmuş değildir (Giller 2013).

DK her gün ya da haftada üç gün alınan gıda miktarını kısıtlayarak yapılabildiği gibi gün aşırı besleme (1 gün besleme, 1 gün yem vermemeye) yoluyla da gerçekleştirilebilir. Diyet kısıtlaması kalori kısıtlaması olarakta adlandırılır ve kısa süreli (3gün ile birkaç ay arası) ve uzun süreli (en az 6 ay, 1 yıl veya daha uzun) olarak ikiye ayrılır (Robertson 2013).

Mevcut çalışmanın amacı diyet kısıtlaması uygulanan sağlıklı ratlarda gastrointestinal sistem mikroorganizmaları sayılarında ortaya çıkabilecek muhtemel değişiklikleri ortaya koymaktır. Bu amaçla koliform, enterokok, *Enterobacteriaceae* gibi barsaklarda rutin olarak bulunan bakteriler yanı sıra probiyotik özellikteki laktobasil sayıları belirlendi. Mevcut araştırma aynı zamanda diyet kısıtlamasının barsak mikroflorası üzerine etkilerini belirlemek için alanında gerçekleştirilen ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Materyal ve Metot

Mevcut çalışmada U.Ü. Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 20 adet 3 aylık Sprague-Dawley ırkı erkek rat kullanıldı. Tüm ratlar kontrollü olarak %50-60 rutubet, 20-23°C sıcaklığa ve 12 saat aydınlık (06:00, 18:00), 12 saat karanlık olarak ayarlanmış odada her bir kafeste 2-3 hayvan olacak şekilde tutuldu. Ratlara su ad libitum olarak verilirken, beslenmelerinde % 18 protein (min), % 2.5 yağ (min), % 4 lif (max), % 5.5 kül (max), % 57.0 azotsuz madde (max), metabolik enerji 2650 kcal/kg (min), % 13 su (max) ve amino asit, vitamin, mineral içeriğine sahip pelet yem kullanıldı (İçerik bilgileri üretici firmadan alınmıştır). Ratlar her biri 10 hayvandan oluşacak şekilde 2 gruba ayrıldı, birinci gruba diyet kısıtlaması uygulanırken ve ikinci grup kontrol grubu hayvanlarından oluştu. Kontrol grubuna ad libitum yem verilirken; diyet kısıtlaması uygulanan ratlara protein, yağ, mineral madde eksikliği çekmeyecek şekilde sadece Pazartesi, Çarşamba ve Cuma günleri aç bırakıldı. Haftanın diğer günleri ad libitum yem verildi. Her iki grupta suyu ad libitum olarak tüketti (Elal Muş ve Ak Sonat 2015).

Her iki grup rattan 0., 30., 60., 90., 120., 150'nci günlerde dışkı numunesi alındı. Aseptik

koşullarda elde edilen her bir örnek +4°C'de muhafaza edildi ve en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizleri gerçekleştirildi.

Dışkı örneklerinden bakterilerin izolasyonu için, her bir numuneden 5 g alınarak 45 ml, % 0.1'lik peptonlu su içerisinde 2 dakika süreyle stomacherde (Seward stomacher, model 400 circulator) homojenize edildi. Hazırlanan homojenat kullanılmak suretiyle örneklerin seri dilüsyonları hazırlandı ve uygun dilüsyonlardan agar plaklarına ekimleri gerçekleştirildi. Laktobasillerin izolasyonunda De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Agar plaklarına dökme plak tekniği ile ekimler gerçekleştirildi. Plaklar 37°C'de 72 saat süreyle anaerobik koşullarda inkübe edildi. 72 saat sonunda agarda gelişim gösteren sarı-krem renkli koloniler *Lactobacillus* olarak tanımlandı (Jackson 2002). Örneklerde enterokok sayısını belirlemede Slanetz and Bartley Agar plaklarına yayma plak tekniğiyle ekimler yapıldı. Plaklar 35°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda Slanetz and Bartley Agar'da üreyen pembe veya koyu kırmızı renkli koloniler enterokok olarak değerlendirildi. Violet Red Bile Agar dışkı örneklerinde koliform bakterilerin belirlenmesinde kullanıldı. Ekimler dökme plak tekniği ile gerçekleştirildi ve 37°C'de 24-48 saat süreyle fakültatif anaerobik koşullarda inkübe edildi. Agar plaklarında gelişen pembe koloniler koliform olarak kabul edildi ve sayımları yapıldı. *Enterobacteriaceae* grubu bakterilerin tespitinde Violet Red Bile Glucose Agar'a dökme plak tekniği ile numuneler ekildi. 37°C'de 24-48 saat süreyle bekletildi ve pembe-kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* olarak tanımlanarak sayımları gerçekleştirildi (Roberts 2003).

İstatistiksel analizler BM SPSS Statistics 22 programı kullanılarak Kruskal Wallis testi ile gerçekleştirildi. Farklılık ortaya çıkan gruplarda, iki grubun karşılaştırılmasında ve aynı zaman grubunun, diyet kısıtlaması-kontrol arasındaki farklılığın belirlenmesinde ise Mann-Whitney U testi yapıldı. Gruplar arasında farklılık, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre belirlendi.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2012-14/05 sayılı izin yazısı alındıktan sonra yapılmıştır.

Bulgular

Gerçekleştirilen çalışmada diyet kısıtlaması uygulanan ratların dışkısında laktobasil sayısı ortalaması 1-150. günler arasında 1 log₁₀

artarken kontrol grubunda aynı seviyede kaldı. Diyet kısıtlaması grubunda gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.02$) bulunurken kontrol grubunda istatistiksel bir anlam ($p=0.32$) yoktu. İki grubun laktobasil sayılarına ait veriler arasında karşılaştırma yapıldığında bir anlamlılık ($p=0.222$) bulunmadı. Ayrıca diyet kısıtlaması uygulanan grupta 1-60. ($p=0.01$), 1-120. ($p=0.01$) ve 30-120. ($p=0.03$) günler arası laktobasil sayılarında anlamlılık belirlendi. Kontrol grubunda ise 1-90. ($p=0.03$), 30-90. ($p=0.01$), 60-90. ($p=0.01$) ve 90-120. ($p=0.03$) günler arasında farklılık tespit edildi. 1. -150. günlere göre laktobasil sayılarına ait veriler tablo 1'de özetlendi.

Tablo 1: 1.-150. günlere göre laktobasil sayıları (log₁₀ kob/g)

Table 1: *Lactobacillus* spp. counts (log₁₀ kob/g) according to days 1.-150.

Günler	Laktobasil sayıları					
	Diyet Kısıtlaması			Kontrol		
	Min.	Ortalama ±SEM	Mak.	Min.	Ortalama ±SEM	Maks.
1.	7.49	7.88±0.16	8.41	8.04	8.45±0.14	8.90
30.	8.23	8.38±0.08	8.67	8.11	8.43±0.11	8.77
60.	8.14	8.66±0.16	9.10	8.55	8.60±0.02	8.68
90.	7.69	8.47±0.21	8.95	8.61	8.92±0.09	9.14
120.	8.36	8.80±0.12	9.03	8.56	8.65±0.04	8.77
150.	7.69	8.84±0.30	9.34	8.50	8.62±0.04	8.64

Koliform bakteri sayısı diyet kısıtlaması grubunda yaklaşık 1 log₁₀'luk artış gösterirken, kontrol grubunda bir değişiklik tespit edilmedi. Gruplar arası karşılaştırmada koliform bakteri sayısında anlamlılık ($p=0.01$) gözlemlendi. Benzer şekilde *Enterobacteriaceae* sayısı diyet kısıtlaması grubunda artarken, kontrol grubunda değişmedi ve diyet kısıtlaması ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0.00$) bulundu. Enterokok sayısında 30. günde anlamlılık ($p=0.00$) belirlenirken, diğer bakteri gruplarının aksine 150 günlük diyet kısıtlaması sonrası enterokok sayısı değişiklik göstermedi. Enterokok sayısı kontrol grubunda 1 log₁₀ düştü ve grup içinde anlamlı bir farklılık ($p=0.00$) tespit edildi. İki grup arasında enterokok sayıları karşılaştırıldığında anlamlılık ($p=0.15$) ortaya çıkmadı. Gruplara ve günlere göre koliform bakteri, enterokok ve *Enterobacteriaceae* sayıları tablo 2'de özetlendi.

Tablo 2: Gruplara ve 1.-150. günlere göre koliform bakteri, enterokok ve *Enterobacteriaceae* sayıları (\log_{10} kob/g)

Table 2: Coliform bacteria, *Enterococci* and *Enterobacteriaceae* counts (\log_{10} kob/g) according to days 1.-150.

Günlük	Mikroorganizma					
	Koliform		Enterokok		<i>Enterobacteriaceae</i>	
	Diyet Kısıtlaması	Kontrol	Diyet Kısıtlaması	Kontrol	Diyet Kısıtlaması	Kontrol
	Ortalama±SEM		Ortalama±SEM		Ortalama±SEM	
1.	3.98±0.41	3.80±0.26	5.14±0.27	6.20±0.13	3.54±0.34	3.91±0.26
30.	4.24±0.27	3.37±0.29	4.96±0.24	6.24±0.19	4.28±0.21	3.42±0.55
60.	4.53±0.35	3.74±0.30	5.88±0.37	5.35±0.13	4.47±0.24	3.66±0.17
90.	4.07±0.24	4.27±0.28	5.99±0.32	6.06±0.18	4.22±0.18	4.48±0.38
120.	4.24±0.11	3.92±0.45	5.49±0.36	4.95±0.19	4.45±0.14	4.22±0.41
150.	5.04±0.48	3.07±0.22	5.04±0.15	4.31±0.36	4.96±0.32	3.11±0.16

Tartışma ve Sonuç

Diyet kısıtlamasının barsak mikroflorası üzerine etkisi üzerine gerçekleştirilen çalışma sayısı çok yetersizdir. Mevcut çalışma diyet kısıtlamasının tek başına barsak mikroflorası üzerine etkisini ortaya koyan ilk araştırma özelliğini taşımaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan akademik çalışmalar çeşitli veritabanlarında tarandığında sadece Elal Muş ve Ak Sonat (E Muş 2015) tarafından gerçekleştirilen diyet kısıtlaması ile birlikte oral yolla β -glukan kullanımının ratların dışkısında bulunan bazı bakterilerin gelişimine etkisinin araştırıldığı makale bulunmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmaya ait mikrobiyolojik analiz sonuçları ile Elal Muş ve Ak Sonat'ın makale sonuçları karşılaştırıldığında; Mevcut çalışmada diyet kısıtlaması uygulanan ratların feçesindeki laktobasillerin sayısında anlamlı bir artış gözlenirken, diğer çalışmada (E Muş 2015) laktobasil sayısı 6 aylık diyet kısıtlaması sonrasında aynı düzeyde (başlangıç 9.02, bitiş 9.11 \log_{10} kob/g) kalmış ve bundan dolayı istatistiksel olarak bir anlam tespit edilmemiştir. Koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayıları gerçekleştirilen çalışmada yaklaşık 1 log artış gösterirken, diğer çalışmada (E Muş 2015) bir değişiklik göstermemiştir (sırasıyla başlangıç ve bitiş düzeyleri 5.13-5.36, 5.27-5.44 \log_{10} kob/g). Enterokok sayıları ise yalnızca diyet kısıtlaması uygulanan ratlar ile diyet kısıtlamasıyla beraber β -glukan verilen ratların (E Muş 2015) feçesinde benzer sayılarda tespit edilmiştir.

Probiyotik bakteri olan laktobasiller anti-diyareik, hipokolesterolemik, antienflamatuvar,

diyabeti geciktirici, kanseri önleyici etki gibi birçok sağlığa faydalı özelliğe sahiptir (Rajkumar 2015). Bu bağlamda rat örneğinde 150 günlük diyet kısıtlaması barsak mikroflorasında olması istenilen probiyotik laktobasiller üzerine olumlu etki meydana getirmiştir. Diğer bir taraftan yine barsak kaynaklı mikroorganizmalar olan koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayılarını arttırmıştır. Enterokok sayısını ise etkilememiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda diyet kısıtlamasının ratların barsak mikroflorasını değiştirme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. Aydın 2007. Aydın C., Ince E., Koparan S., Cangul I.T., Naziroglu M., Ak F., 2007. protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stres in the liver, heart and kidney of rat. Cell. Biochem. Funct., 25, 129-137.
2. Aydın 2009. Aydın C., Sonat F., Sahin S.K., Cangul I.T., Ozkaya G., 2009. Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stres in brain and lung of middle-aged rat. Indian J. Exp. Biol., 47, 24-31.
3. Coşkun 2006. Coşkun T., 2006. Pro-, pre- ve sinbiyotikler. Çocuk Sağlığı Hast. Derg., 49, 128-148.
4. E Muş 2015. Elal Muş T., Ak Sonat F., 2015. The Effect of Orally Administrated β -glucan and Dietary Restriction on Faecal Microflora in Rats. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 21, 27-30.
5. Giller 2013. Giller K., Huebbe P., Hennig S., Dose J., Pallauf K., Doering F., Rimbach G., 2013. Beneficial effects of a6-month dietary restriction are time- dependently abolished within 2 weeks or 6months of refeeding genome-wide transcriptome analysis in mouseliver. Free Radic. Biol. Med., 61, 170-178.
6. Jackson 2002. Jackson M.S., Bird A.R., McOrist A.L., 2002. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. J. Microbiol. Methods, 51, 313-321.
7. Koca 2015. Koca T.T., 2015. Barsak mikroflorasının imflamatuvar hastalık patogenezindeki yeri. ARŞIV, 24, 78-91.
8. Rajab 2014. Rajab E., Alqanbar B., Naiser M.J., Abdulla H.A., Al-Momen M.M., Kamal A., 2014. Sex differences in learning and memory following short-term dietary restriction in the rat. Int. J. Devl. Neuroscience, 36, 74-80.
9. Rajkumar 2015. Rajkumar H., Kumar M., Das N., Kumar S.N., Challa H.R., Nagpal R., 2015. Effect of Probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL

- S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers: A Randomized Controlled Single-Blind Pilot Study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 20, 289-298.
10. Roberts 2003. Roberts D., Greenwood M., 2003. *Practical Food Microbiology*, 3th edition, Blackwell Publishing, Massachusetts, USA.
11. Robertson 2013. Robertson L.T., Mitchell J.R., 2013. Benefits of short-term dietary restriction in mammals. *Exp. Gerontol.*, 48, 1043-1048.
12. Shimokawa 2010. Shimokawa I., Trindade L., S., 2010. Dietary Restriction and Aging in Rodents: a Current View on its Molecular Mechanisms. *Aging and Disease*, 1, 89-104.
13. Speakman 2011. Speakman J.R., Mitchell S.E., 2011. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.*, 32, 159-221.
14. Tüzün 2010. Tüzün C.G., Çiftçi İ., 2010. Kanatlılarda sağlıklı bağırsak mikrobiyotası gelişimi üzerine beslenmenin etkileri. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 9, 48-55.
15. Yanai 2004. Yanai S., Okaichi Y., Okaichi H., 2004. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol. Aging*, 25, 325-332.

