



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Borik Asit ve *Bacillus clausii* Probiyotiğinin İnflamatuar Bağırsak
Hastalığı Modeli Oluşturulmuş Sıçanlar Üzerindeki Etkinliklerinin
Araştırılması**

Mete ÖZKOÇ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Güngör KANBAK

Eskişehir

2021





T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Borik Asit ve *Bacillus clausii* Probiyotiğinin İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Modeli Oluşturulmuş Sıçanlar Üzerindeki Etkinliklerinin Araştırılması

Mete ÖZKOÇ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Güngör KANBAK

Eskişehir

2021



TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda almış olduğum eğitimim süresince derin bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutmuş olan başta danışmanım Prof. Dr. Güngör KANBAK olmak üzere, Prof. Dr. Sema USLU, Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ ve Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ hocalarıma ve tüm biyokimya ailesine;

Lisans eğitimimden itibaren bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK'e;

Çok kıymetli ablam Fatma ÖVENLER'e;

Tüm yardımları için, ailemden bir parça gibi olan kadim dostum Songül GÖNEL'e;

Eğitimim boyunca üzerimde olan emekleri yadsınamayacak kadar çok olan Arş. Gör. Betül CAN'a;

Ve ilk adımdan itibaren bu günlere gelmemde sabrı ve emekleri çok büyük olan, başta annem Emine KURUOVALI olmak üzere, dedem Münür KURUOVALI ve tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Mete ÖZKOÇ

11.03.2021

ÖZET

Borik Asit ve *Bacillus clausii* Probiyotiğinin İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Modeli Oluşturulmuş Sıçanlar Üzerindeki Etkinliklerinin Araştırılması

Kapsam ve Amaç: Crohn ve Ülseratif kolit olmak üzere iki alt sınıfı olan inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (İBH) günden güne insidansı artmaktadır. Hem Crohn hem Ülseratif kolit hastalarının bağırsaklarında yoğun bir inflamasyon söz konusudur. Borik asidin, oksidatif stresi modüle ettiği ve bazı proinflamatuvar sitokinleri inhibe ederek inflamasyonu azalttığı belirlenmiştir. Araştırmalar *Bacillus clausii* probiyotiğinin antioksidan sistemler üzerinde pozitif bir etki göstererek oksidatif stresi azalttığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında İBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda, oral yolla uygulanan borik asit ve *Bacillus clausii* probiyotiğinin antioksidatif ve anti-inflamatuvar etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu tez çalışmasında borik asit ve *Bacillus clausii* probiyotiği, İBH modeli oluşturulan sıçanlara oral yolla uygulandıktan sonra etkinlikleri çeşitli biyobelirteçler aracılığı ile belirlenmiştir. Kontrol (sham) (n=9), İBH (n=9), İBH+Borik Asit (BA) (n=9), İBH+Probiyotik (PB) (n=9) ve İBH+Kombine (KOM) (n=9) olmak üzere toplamda 5 grup için 45 adet Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Hayvanların, serum örneklerinde ALT, AST, ALP, BUN, kreatinin, TNF- α , İnterlökin-35 seviyeleri ölçüldü. Tam kan örneklerinde, eritrosit, hemoglobin, monosit, lenfosit, nötrofil ve beyaz kan hücrelerinin sayımı gerçekleştirildi. Kalın bağırsağın inen (descending) kolon kısmından doku örnekleri alınıp, malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), miyeloperoksidaz (MPO) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) analizleriyle birlikte histolojik incelemeler için Hematoksilen-Eosin boyaması ve skorlama yapıldı.

Bulgular ve Sonuç: Bulgularda, 2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asidin (TNBS) intrarektal uygulanması ile kolonda yoğun bir inflamatuvar sürecin ve oksidatif stresin başladığı tespit edildi. Sonuç olarak, borik asit ve probiyotik uygulanmasının, özellikle BA grubunda çok daha yüksek olmakla birlikte KOM ve PB gruplarının da İBH'ye karşı iyileştirici özelliğe sahip olabileceği hem biyokimyasal hem de histolojik analizlerle ortaya koyuldu.

Anahtar Kelimeler: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları, Borik Asit, *Bacillus clausii*, Probiyotik, IL-35.

SUMMARY

Investigation of the Effects of Boric Acid and *Bacillus clausii* Probiotics on Inflammatory Bowel Diseases Rat Model

Objectives: The incidence of inflammatory bowel diseases (IBD), which has two subclasses, Crohn's Diseases (CD) and Ulcerative Colitis (UC), is increasing day by day. There is intense inflammation in the intestines of both CD and UC patients. It has been determined that boric acid modulates oxidative stress and reduces inflammation by inhibiting some proinflammatory cytokines. Studies have shown that *Bacillus clausii* has a positive effect on antioxidant systems. In this thesis study, it was aimed to investigate the antioxidative and anti-inflammatory effects of oral administration of boric acid and *Bacillus clausii* probiotics in rats with an IBD model.

Materials and Methods: In this thesis study, after oral administration of boric acid and *Bacillus clausii* probiotics to rats with IBD model, their efficacy was determined by various biomarkers. 45 Sprague Dawley rats were used to form 5 groups; Control (sham) (n = 9), IBD (n = 9), IBD+Boric Acid (BA) (n = 9), IBD+Probiotic (PB) (n = 9) and IBD+Combined (COM) (n = 9). ALT, AST, ALP, BUN, creatinine, TNF- α , Interleukin-35 levels were measured in serum samples of animals. Erythrocytes, hemoglobin, monocytes, lymphocytes, neutrophils and white blood cells countings were performed in the whole blood samples. Tissue samples were taken from the descending colon part of the large intestine and malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), catalase, glutathione peroxidase (GPx), myeloperoxidase (MPO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) analyzes were performed. In addition, Hematoxylin-Eosin staining and scoring were performed for histological examinations in the intestinal tissue.

Findings and Conclusion: In the findings, it was determined that an intense inflammatory process and oxidative stress started in the colon with the intrarectal administration of 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS). As a result, it was seen that the administration of boric acid and probiotics could have healing properties against the damage in IBD.

Key Words: Inflammatory Bowel Diseases, Boric Acid, *Bacillus clausii*, Probiotics, IL-35.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
SUMMARY	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO DİZİNİ.....	xii
ŞEKİL DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları	3
2.1.1. Ülseratif kolit.....	4
2.1.2. Crohn hastalığı.....	4
2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında İnflamatuvar Süreçler.....	5
2.2.1. İnflamasyon.....	5
2.2.2. İnflamasyonun inflamatuvar bağırsak hastalıklarındaki rolü	6
2.2.3. Miyeloperoksidaz.....	9
2.2.4. Nitrik oksit sentezi ve nitrik oksit sentaz	10
2.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Oksidatif Stresin Rolü.....	11
2.3.1. Oksidatif stres	11
2.3.1.1. Serbest radikaller.....	11
2.3.1.1.1. Serbest radikallerin tanımı	11
2.3.1.1.2. Reaktif oksijen türleri	12
2.3.1.1.3. Reaktif azot türleri.....	13
2.3.1.2. Lipit peroksidasyonu	14
2.3.2. Antioksidan savunma.....	16
2.3.2.1. Antioksidan enzimler.....	16
2.3.2.1.1. Katalaz	16
2.3.2.1.2. Glutasyon peroksidaz.....	17

2.3.3. Oksidatif stresin inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi	18
2.4. Bağırsak Mikrobiyotası	19
2.4.1. Probiyotikler ve <i>Bacillus clausii</i> probiyotiği	21
2.5. Borik Asit	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
3.1. Kullanılan Maddeler ve Cihazlar.....	25
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	25
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	26
3.2. Deney Hayvanlarının Temin ve Bakımı	27
3.3. Deney Planı, Deney Modelinin Oluşturulması, Deney Grupları ve Madde Uygulanması, Diseksiyon İşlemi.....	27
3.3.1. Deney planı.....	27
3.3.2. Deney modelinin oluşturulması.....	28
3.3.3. Deney grupları ve madde uygulanması.....	28
3.3.4. Borik asit ve <i>Bacillus clausii</i> dozlarının belirlenmesi.....	29
3.4. Diseksiyon İşlemi	29
3.5. Biyokimyasal Analizler	30
3.5.1. Rutin biyokimya ve tam kan sayımı (CBC) analizleri.....	30
3.5.2. İnflamatuvar biyobelirteçlerin analizleri	30
3.5.2.1. Serum TNF- α düzeylerinin analiz edilmesi	30
3.5.2.2. Serum IL-35 düzeylerinin analiz edilmesi.....	30
3.5.2.3. Bağırsak dokusunda MPO aktivitesinin analiz edilmesi.....	31
3.5.2.4. Bağırsak dokusunda NO düzeylerinin analiz edilmesi.....	33
3.5.2.5. Bağırsak dokusunda Western Blot yöntemi ile iNOS ve β -aktin analizi.....	37
3.5.3. Oksidatif stres biyobelirteci ve antioksidan enzim aktivitesi analizleri.....	38
3.5.3.1. Bağırsak dokusunda MDA düzeylerinin analiz edilmesi.....	38
3.5.3.2. Bağırsak dokusunda katalaz aktivitesinin analizi.....	41
3.5.3.3. Bağırsak dokusunda GPx aktivitesinin analizi	43

3.5.4. <i>Doku total protein ölçümü</i>	45
3.6. <i>Bağırsak Dokularında Yapılan Histolojik İşlemler</i>	46
3.7. <i>İstatistiksel Analiz</i>	47
4. BULGULAR	48
4.1. Biyokimyasal Bulgular	48
4.1.1. <i>Rutin biyokimya ve tam kan sayımı bulguları</i>	48
4.1.1.1. <i>Serum AST aktiviteleri</i>	48
4.1.1.2. <i>Serum ALT aktiviteleri</i>	49
4.1.1.3. <i>Serum ALP aktiviteleri</i>	51
4.1.1.4. <i>Serum BUN düzeyleri</i>	52
4.1.1.5. <i>Serum kreatinin düzeyleri</i>	53
4.1.1.6. <i>Kan hemoglobin düzeyleri</i>	55
4.1.1.7. <i>Kırmızı kan hücresi (RBC) sayımı</i>	56
4.1.1.8. <i>Beyaz kan hücresi (WBC) sayımı</i>	58
4.1.1.9. <i>Kandaki nötrofil sayısı</i>	59
4.1.1.10. <i>Kandaki lenfosit sayısı</i>	61
4.1.1.11. <i>Kandaki monosit sayısı</i>	62
4.1.1.12. <i>Nötrofil/Lenfosit Oranı</i>	63
4.1.2. <i>İnflamatuvar süreçlerle ilgili bulgular</i>	64
4.1.2.1. <i>Serum TNF-α düzeyleri</i>	64
4.1.2.2. <i>Serum IL-35 düzeyleri</i>	65
4.1.2.3. <i>Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri</i>	67
4.1.2.4. <i>Bağırsak dokusu NO düzeyleri</i>	68
4.1.2.5. <i>Bağırsak dokusu iNOS'un göreceli protein ekspresyonu (iNOS/β-aktin Oranı)</i>	69
4.1.3. <i>Oksidatif stres biyobelirteci ve antioksidan enzim aktivitesi bulguları</i>	70
4.1.3.1. <i>Bağırsak dokusu MDA düzeyleri</i>	70
4.1.3.2. <i>Bağırsak dokusu katalaz aktiviteleri</i>	72
4.1.3.3. <i>Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri</i>	73
4.2. Histolojik Bulgular	75

4.2.1. <i>Bağırsak dokusu Hematoksilen-Eosin incelemeleri</i>	75
4.2.2. <i>Bağırsak dokusu histolojik skrolama bulguları</i>	79
5. TARTIŞMA	81
5.1. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi.....	82
5.2. Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi	83
5.3. Kan Hücre Sayımının (CBC) Değerlendirmesi	84
5.4. Serum TNF- α Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	86
5.5. Serum IL-35 Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	89
5.6. Bağırsak Dokusu MPO Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	90
5.7. Bağırsak Dokusu NO Düzeyleri ile iNOS'un Göreceli Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	93
5.8. Bağırsak Dokusu MDA Düzeylerinin Değerlendirilmesi	95
5.9. Bağırsak Dokusu Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	97
5.10. Bağırsak Dokusu GPx Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	99
5.11. Bağırsak Dokusu Histolojik İncelemeleri ve Skrolamaların Değerlendirilmesi...	101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR DİZİNİ	104

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Deney grupları ve gruplardaki sıçanlara uygulanan maddeler.....	28
Tablo 3.2. MPO aktivitesi analiz prosedürü.....	32
Tablo 3.3. NO ölçüm prosedürü.....	35
Tablo 3.4. MDA ölçüm prosedürü.....	40
Tablo 3.5. Katalaz aktivitesi analiz prosedürü.....	42
Tablo 3.6. GPx aktivitesi analiz prosedürü.....	44
Tablo 4.1. Serum AST aktiviteleri.....	48
Tablo 4.10. Kandaki lenfosit sayısı.....	61
Tablo 4.11. Kandaki monosit sayısı.....	62
Tablo 4.12. Nötrofil/Lenfosit oranı.....	63
Tablo 4.13. Serum TNF- α düzeyleri.....	64
Tablo 4.14. Serum IL-35 düzeyleri.....	66
Tablo 4.15. Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri.....	67
Tablo 4.16. Bağırsak dokusu NO düzeyleri.....	68
Tablo 4.17. Bağırsak dokusu iNOS/ β -aktin Oranı.....	69
Tablo 4.18. Bağırsak dokusu MDA seviyeleri.....	71
Tablo 4.19. Bağırsak dokusu Katalaz aktiviteleri.....	72
Tablo 4.2. Serum ALT aktiviteleri.....	50
Tablo 4.20. Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri.....	74
Tablo 4.3. Serum ALP aktiviteleri.....	51
Tablo 4.4. Serum BUN düzeyleri.....	52
Tablo 4.5. Serum kreatinin düzeyleri.....	54
Tablo 4.6. Kan hemoglobin düzeyleri.....	55
Tablo 4.7. Kırmızı kan hücresi sayımı.....	57
Tablo 4.8. Kandaki beyaz kan hücresi sayısı.....	58
Tablo 4.9. Kandaki nötrofil sayısı.....	60

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. İnflamatuvar sürecin tetiklenmesi ve patolojik sonuçları.....	6
Şekil 2.2. Lezyon bölgesinde, makrofaj kaynaklı birtakım sitokinlerin salınması.....	8
Şekil 2.3. Hipokloröz asit oluşumu ve miyeloperoksidaz enzim döngüsü	9
Şekil 2.4. Nitrik oksitin NADPH, O ₂ ve BH ₄ varlığında, L-Arjinin'den üretilmesi.....	10
Şekil 2.5. Lipit peroksidasyonu sürecinin gösterimi.....	15
Şekil 2.6. İki mol TBA ile bir mol MDA'nın oluşturduğu pembe renkli bileşik	15
Şekil 2.7. Glutasyon peroksidaz enziminin katalitik döngüsü	17
Şekil 2.8. Bağırsak mikrobiyotasının zamansal ve bölgesel yönlerinin bir gösterimi.....	20
Şekil 2.9. Borik asidin olası antioksidatif etkinliğinin şematik gösterimi	23
Şekil 3.1. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen deney planı.	27
Şekil 3.2. NO standart grafiği.	37
Şekil 3.3. MDA standart grafiği.....	41
Şekil 3.4. Protein standart grafiği.	46
Şekil 4.1. Serum AST aktiviteleri.....	49
Şekil 4.2. Serum ALT aktiviteleri.....	50
Şekil 4.3. Serum ALP aktiviteleri.....	51
Şekil 4.4. Serum BUN düzeyleri.....	54
Şekil 4.5. Serum kreatinin düzeyleri.....	55
Şekil 4.6. Kan hemoglobin düzeyleri.....	57
Şekil 4.7. Kırmızı kan hücresi sayımı.....	58
Şekil 4.8. Beyaz kan hücresi sayısı.....	60
Şekil 4.9. Kandaki nötrofil sayısı.....	61
Şekil 4.10. Kandaki lenfosit sayısı.....	62
Şekil 4.11. Kandaki monosit sayısı.....	63
Şekil 4.12. Nötrofil/Lenfosit oranı.....	64
Şekil 4.13. Serum TNF- α düzeyleri.....	66
Şekil 4.14. Serum IL-35 düzeyleri.....	67
Şekil 4.15. Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri.	68
Şekil 4.16. Bağırsak dokusu NO düzeyleri.....	70
Şekil 4.17. iNOS ve β -aktin Western Blot analizi	71

Şekil 4.18. Bağırsak dokusu MDA düzeyleri.	72
Şekil 4.19. Bağırsak dokusu Katalaz aktiviteleri.	74
Şekil 4.20. Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri.	75
Şekil 4.21. Kontrol grubuna ait histolojik görüntü.	76
Şekil 4.22. İBH grubuna ait histolojik görüntü.	77
Şekil 4.23. Borik Asit (BA) grubuna ait histolojik görüntü.	78
Şekil 4.24. Probiyotik (PB) grubuna ait histolojik görüntü.	79
Şekil 4.25. Kombine grubuna ait histolojik inceleme.	80
Şekil 4.26. Bağırsak dokusuna ait epitel hasar, inflamasyon, ödem, damar dilatasyonu ve konjesyonuna ait skorlama analizleri.	81

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

İBH	: İnflamtuar bağırsak hastalığı
UC	: Ülseratif kolit
CD	: Crohn hastalığı
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RAT	: Reaktif azot türleri
NO	: Nitrik oksit
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
INF- γ	: İnterferon gama
IL-1	: İnterlökin-1
İnterlökin-1	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
IL-12	: İnterlökin-12
IL-17	: İnterlökin-17
IL-35	: İnterlökin-35
NOS	: Nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
GPx	: Glutatyon peroksidaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehit

TNBS	: 2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
HOCl	: Hipokloröz asit
ONOO [·]	: Peroksinitrit radikali
[·] OH	: Hidroksil radikali



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH), ince bağırsak distali ve kolon mukozasının kronik ve idiyopatik hastalıklar grubudur. Etiyolojisi henüz bilinmemekle birlikte, Ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığı (CD) olmak üzere iki klinik fenotip ile karakterizedir (Abad, ve diğerleri, 2003). İBH'nin iki alt sınıfı için de inflamasyon ortak nokta olsa da ağızdan başlayıp anüse kadar tutulum gösterebilen Crohn hastalığının kolonoskopik incelenmesinde, kaldırım taşı görünümü spesifik bir bulgu iken; tutulumun kolonda olduğu Ülseratif kolit hastalığında ise yoğun ülserasyonlar önemli bir bulgudur.

Ülkemizde insidansı gittikçe artan bu hastalıkların, bireylerin yaşam kalitesini arttırmak adına hali hazırda uygulanan tedavi yöntemleri mevcuttur, ancak kesin çözüm sunan etkili bir tedavi bulunmamaktadır. Ayrıca İBH'de kullanılan streoid ilaçların zorunlu uzun süre kullanımına bağlı olarak immün sistemin aşırı baskılanması, yüksek enfeksiyon riski, osteoporoz, osteonekroz, miyopati gibi olumsuz yan etkilerin gelişmesine neden olması önemli bir sorundur (de Mattos, ve diğerleri, 2015).

Birçok kapsamlı çalışmaya rağmen İBH'nin başlaması, gelişmesi ve yayılması ile ilgili kesin bir model ortaya konulamamıştır. Bağırsaklar mikrofloraya, yani aynı anda hem yararlı hem de zararlı bakterileri içeren bir ortama sahiptir. Bu nedenle bağırsaklarda sürekli devam eden bir immün işleyiş mevcuttur. Mikrofloranın yararlı/zararlı bakteri dengesinin bozulması, genetik yatkınlık ve çevre gibi etmenler nedeni ile bu immün mekanizmaların disregülasyonu, mukozaya yoğun bir immün hücre infiltrasyonu ile sonuçlanmakta ve geri dönüşümsüz bir immün yanıt süreci içerisine girilmektedir. Bu noktada hücresel hasara sebep olan spesifik yolaklar tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, oksidatif stresin önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Rezaie, Parker, & Abdollahi, 2007).

Günümüze kadar inflamatuvar bağırsak hastalıklarına neden olan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve ilişkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine temel oluşturulabilmesi amacıyla, çok sayıda kolit hayvan modeli geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu modeller arasında en yaygın kullanılan ve bizim de bu tez çalışmasında

kullandığımız 2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS)'in intrarektal uygulandığı sıçan kolit modelidir (Kankuri, ve diğerleri,1999).

Yapılan araştırmalar, borik asidin hem bir serbest radikal tutucusu hem de endojen antioksidan mekanizmaların etkinliğini arttırarak antioksidan etki gösteren bir molekül olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce yayınlamış olduğumuz çalışmalarımızda, borik asidin bazı pro-inflamatuar sitokinler üzerinde etkili olduğunu ve inflamasyonu önlediğini gösterdik (Kar, ve diğerleri, 2019; Karimkhani, ve diğerleri, 2020). Kar ve diğerleri (2019) yayınladıkları çalışmada borik asidin, proton donörü olarak görev aldığını ve oksidan moleküllerin aktivitelerini proton vererek etkisiz hale getirdiğini, ayrıca zincirleme devam eden reaksiyonları belirli yerlerden kırarak ya da serbest radikalleri kendi üzerlerine alarak antioksidan özellik gösterdiğini ileri sürmektedirler.

Probiyotikler, mukozanın ve bağırsak bariyer bütünlüğünün korunmasında görev alırken bir takım sekonder metabolitler salgılayarak konakçı ile mutualist bir ilişki içerisinde bulunmaktadır. *Bacillus clausii*, literatürde Enterogermina® ürünü adı altında reçetesiz satılan bir medikal destek ürünü olarak onaylanmıştır ve sadece *Bacillus clausii* türünün sporlarını içermektedir (Cutting, 2010). Dar, ve diğerlerinin (2018) yayınladıkları çalışmada *B. calusii* probiyotiğinin hasta grubuna kıyasla TNF- α , IL-6 ve IL-17 gibi sitokinlerin seviyelerinin azalmasını sağladığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızdaki amaç, İBH'ye sahip olan bireylerin düşen yaşam kalitelerini, yeni tedavi stratejileri geliştirerek, artırmaktır. İBH sıçan modelinde, borik asidin ve bir probiyotik olan *Bacillus clausii* türünün birlikte uygulanıp oksidatif stres ve inflamatuvar biyobelirteçlerinin analiz edildiği bu çalışma ile ilgili veriler ilk kez bu araştırmayla ortaya koyulmuştur. Literatürde, TNBS ile indüklenen İBH modelinde borik asidin uygulandığına dair hiçbir çalışmaya rastlanmamış olması bu çalışmanın özgün değerini belirlemektedir. Bunun yanında, ekonomimizde çok önemli bir yere sahip olan ve rezervlerin büyük çoğunluğunun Eskişehir'de olduğu bor mineralinin ham madde halinden işlenerek tıp alanında kullanılmasında, ülkemize yapacağı ekonomik katkı oldukça önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, ince bağırsak distali ve kolon mukozasının kronik ve idiyopatik hastalıklar grubudur. Etiyolojisi henüz bilinmemekle birlikte, Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki klinik fenotip ile karakterizedir. İBH hastalarının yaklaşık %36'sı ekstraintestinal belirtiler gösterse de hem Ülseratif kolit hem de Crohn hastalığı öncelikle sindirim sistemini etkileyen inflamatuvar durumlardır (Abad, ve diğerleri, 2003).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının diagnostik değerlendirilmeleri ile ilgili 2019 yılında yayınlanan ECCO-ESGAR Klavuzu'nda belirtildiği üzere, Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tanısının klinik, biyokimyasal, feçes, endoskopik, ultrasonografik, kesitsel görüntüleme ve histolojik incelemelerin bir kombinasyonuna dayandığı belirtilmektedir (Maaser, ve diğerleri, 2019). Yapılan bu tür incelemeler doğrultusunda hastalarda tutulum yerine ve şiddete bağlı olarak çeşitli tedavi planlamaları yapılmaktadır. Bu tedaviler arasında, cerrahi operasyonun öncelikli olmadığı vakalarda, kontrollü diyet, anti-inflamatuvar ilaçlar, antibiyotikler ve ayrıca glikokortikoid gibi steroid ilaçların uzun süreli ve bazı durumlarda ömür boyu kullanımı söz konusudur.

Amerika'da yetişkinlerle yapılan bir prevalans çalışmasında İBH'nin görülme sıklığının her 100,000 kişide 439 olduğu belirtilmiştir (Kappelman, ve diğerleri, 2007). Ülkemizde insidansı gittikçe artan bu hastalıkların hali hazırda uygulanan tedavi yöntemlerinin aksine kesin çözüm sunan etkili bir tedavi bulunmamaktadır. Ayrıca İBH'de kullanılan streoid ilaçların zorunlu uzun süre kullanımına bağlı olarak immün sistemin aşırı baskılanması, yüksek enfeksiyon riski, osteoporoz, osteonekroz, miyopati gibi olumsuz yan etkilerin gelişmesine neden olması önemli bir sorundur (de Mattos, ve diğerleri, 2015).

Günümüze kadar inflamatuvar bağırsak hastalıklarına neden olan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve ilişkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine temel oluşturulabilmesi amacıyla, çok sayıda kolit hayvan modeli geliştirilmiştir ve karakterize edilmiştir. Bu modeller arasında en yaygın kullanılan model TNBS'nin intrarektal

uygulandığı sıçan kolit modelidir (Kankuri, ve diğerleri, 1999). TNBS, kolonik mukozanın nötrofil ve makrofajlarla infiltrasyonu ile karakterize olan koliti indükleyen ve böylece inflamatuvar mediyatörlerin artışına yol açan bir hapten olarak etki göstermektedir ve insan İBH koşullarını taklit eden bir model oluşumunu sağlamaktadır (Kankuri, ve diğerleri, 1999).

2.1.1. Ülseratif kolit

Ülseratif kolit, kolon ve rektumun özellikle mukoza tabakasını etkileyen, segment oluşturmada normal doku üzerinde durmaksızın devam eden inflamasyon ve ülserasyon bölgeleri içeren bir bağırsak hastalığıdır (Head & Jurenka, 2003). Ülseratif kolit her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen genellikle 15-35 yaşları arasında daha çok ortaya çıktığı görülmekte ve iki cinsiyeti de eşit derecede etkilemektedir. Hastalık, Afrika-Amerikan ve doğu ülkelerine nazaran Kafkaslarda daha yaygın bir şekilde görülürken, Yahudi toplumunda bunun neredeyse 3-6 kat kadar daha fazla olduğu bildirilmektedir (Ardizzone, 2003; Kane, 2005).

Ülseratif kolit tutulum gösterdiği bölgeye göre üçe ayrılmıştır. Bunlar; (1) hastalık daha çok kolonun distal kısmını ve rektumu etkiliyorsa, ülseratif proktit; (2) descending (inen) kolon ile sınırlıysa, distal kolit ve (3) eğer hastalık tüm kolonu etkiliyorsa pankolitis adını almaktadır. Ülseratif kolitte belirtiler sinsi olabileceği gibi akut ataklarla da ortaya çıkabilir. Hastalık hafif şiddetteyken dışkıda yumuşama, abdominal kramplar ve dışkının ishale doğru dönüşümü söz konusu olabilirken, durum şiddetleştikçe, kilo kaybı, yorgunluk, iştahsızlık sonucu besin eksikliği, dışkıda mukus, şiddetli rektal kanama, ateş ve anemi yaşanabilir (Head & Jurenka, 2003).

2.1.2. Crohn hastalığı

Crohn hastalığı, ağız boşluğundan anüse kadar olan tüm gastrointestinal sistemi etkileyebilen ve devamlı tekrar eden sistemik inflamatuvar bir bağırsak hastalığıdır. Hastalık sıklıkla karın ağrısı, ateş, bağırsak daralmasının klinik belirtileri, kanlı ve/veya mukuslu ishal ile kendini gösterir (Baumgart & Sandborn, 2012). Crohn hastalığında inflamasyon tipik olarak segmental, asimetric ve transmuraldır. Hastalık şiddetini arttırdıkça komplikasyonlar (darlıklar, fistüller ve apseler) da artar ve sonucunda,

hastaların neredeyse yarısı kadarına cerrahi müdahale girişiminde bulunulması gerekir (Torres, Mehandru, Colombel, & Peyrin-Biroulet, 2016).

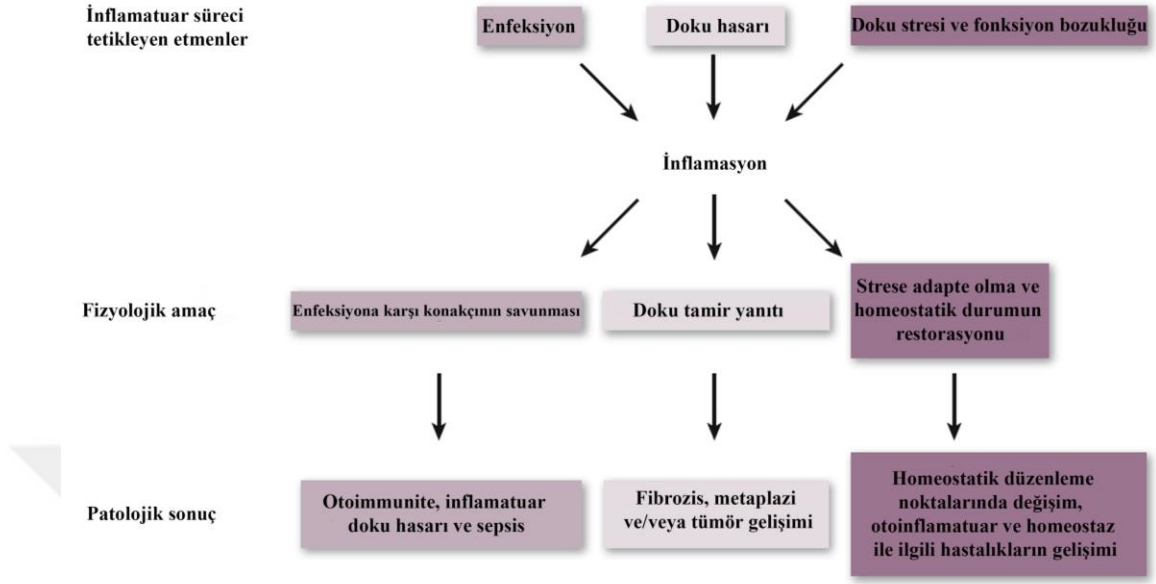
Ülseratif kolitte olduğu gibi Crohn hastalığının da tanısında, hastanın hikayesi ile birlikte radyoloji, endoskopi ve histolojik incelemelerin bir kombinasyonunu içeren yol izlenmektedir. Neredeyse üç hastadan birinde artışı gözlemlenmese de C-reaktif protein, trombositoz ve anemi de hastalığın izlenmesinde kullanılan parametrelerdendir (Torres, ve diğerleri, 2016).

Birçok gelişmiş ülkede yaklaşık % 0.1'lik bir prevalans gösteren CD'nin patogenezi karmaşıktır ve birbiri ile etkileşim içinde olan üç mekanizmayı içermektedir. Bunlar; genetik faktörler, mikrobiyota ve bağışıklık aracılı doku hasarıdır (Shanahan, 2002). Bununla birlikte çevresel faktörler de hastalığın gelişiminde önemli bir yere sahiptir.

2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında İnflamatuvar Süreçler

2.2.1. İnflamasyon

İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı ve dokudaki stres ya da fonksiyon bozukluğu gibi zararlı uyaranlar tarafından tetiklenen bir yanıttır (Şekil 2.1.) (Majno & Joris, 2004; Medzhitov, 2008). Enfeksiyon durumunda, dokuda yerleşik olarak bulunan makrofajların ve mast hücrelerinin; sitokinler, kemokinler, vazoaktif aminler, eikasonoidler ve proteolitik kaskat ürünleri gibi inflamatuvar medyatörlerin üretilmesine ve salınmasına neden olarak akut inflamatuvar süreci başlatırlar. Bu medyatörler, enfeksiyon veya doku hasarıyla tetiklenen akut inflamatuvar yanıtta, plazma ve lökositler gibi kan bileşenlerinin hasarlı bölgeye koordineli olarak göç etmesini sağlarlar (Medzhitov, 2008). Akut inflamatuvar yanıtın yetersiz kalması durumunda, inflamasyon devam eder ve yeni karakteristik özellikler kazanır. Bu aşamada, nötrofillerin ilgili dokuya infiltre olması söz konusudur. Eğer bu etkiler hala yetersiz kalmaya devam ederse granülomların ve üçüncül lenfoid dokuların oluşumunu içeren kronik bir inflamatuvar durum ortaya çıkar (Kumar, Cotran, & Robbins, 2003; Drayton, Liao, Mounzer, & Ruddle, 2006; Medzhitov, 2008).



Şekil 2.1. İnflammatuar sürecin tetiklenmesi ve patolojik sonuçları (Medzhitov, 2008).

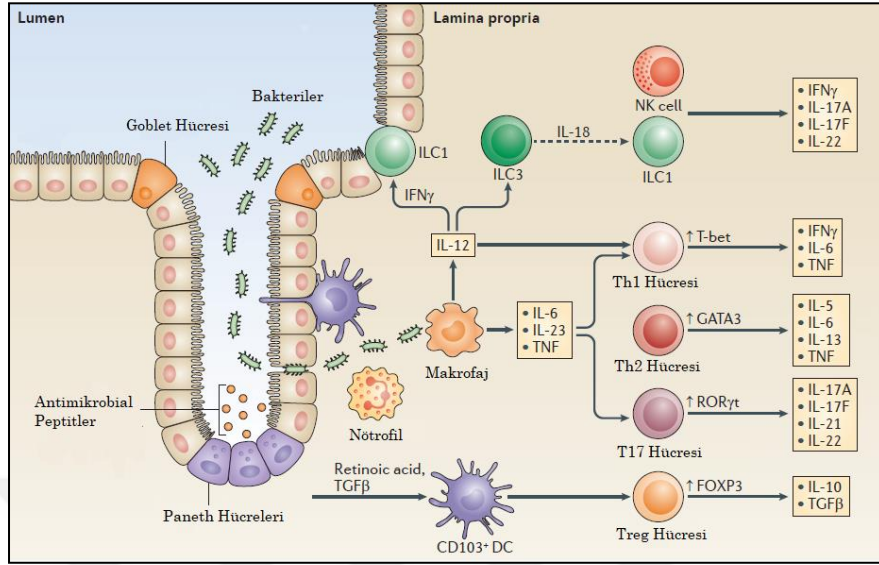
2.2.2. *İnflamasyonun inflammatuar bağırsak hastalıklarındaki rolü*

Belirli bir zaman aralığında alevlenip gerileyebilen inflammatuar bağırsak hastalıkları, mukozal iltihaplanma ile karakterizedir (Sands, 2015). Tipik bir inflammatuar sürecin başlamasında doku veya hücresel hasar, mikrobiyal atak, radyasyon ve doku homeostazının değişimi gibi faktörlerin uyarıya sebep olması söz konusu iken; inflammatuar bağırsak hastalıklarında inflamasyonun tetiklenmesi diğer inflammatuar süreçlerden farklılık göstermektedir. İnflammatuar bağırsak hastalıklarının başlamasındaki yaygın görüş, inflamasyonun başlamasında herhangi kesin bir mikrobiyal/enfeksiyöz tetikleyicisinin olmadığı yönündedir (Gerhard, 2017).

İnflammatuar bağırsak hastalıklarındaki yoğun inflamasyona, serum ve kanda saptanabilen akut faz yanıtı eşlik eder (Gerhard, 2017). Bu akut faz yanıtı; fibrinoliz ve koaglasyon ile ilgili proteinlerin, kompleman sistem bileşenlerinin, proteinaz inhibitörlerinin, transport proteinlerinin ve C-reaktif protein (CRP) gibi diğer proteinlerin artışı ile ilgiliyken; albumin gibi bazı serum proteinlerin de baskılanması ile karakterizedir (Vermeire, Van Assche, & Rutgeerts, 2006). Ayrıca akut faz yanıtında rol oynayan diğer önemli moleküller, inflammatuar süreçte serumda seviyeleri artan pro-inflammatuar sitokinlerdir (Cioffi, Rosa, Serao, Picone, & Vietri, 2015).

Yapılan alışmalar sitokinlerin İBH'de oldukça önemli bir yere sahip olduğunu ve hastalığın patogenezi ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmalarda sitokinlerin, intestinal inflamasyonun kontrolünde ve hastalığın klinik bulgularında kilit rol oynadıkları, ayrıca bazı fare modellerinde bu sitokinlerin modülasyonunun terapötik etki yaratabileceği vurgulanmaktadır. Bugün de İBH tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan TNF- α antikor tedavisi, TNF- α 'nın önemini ve kilit role sahip bir sitokin olduğunu kanıtlamaktadır (Neurath, 2014). Epitelyal kriptin aşırı düzeydeki hasarı, yüzey ülserasyonları, bozulmuş kript mimarisi, ishal ve kanama ile karakterize edilen İBH, mukozal dokuda TNF- α düzeylerinin artışı ile ilişkilidir. Anti TNF- α antikorları verildiğinde hastalığın prognozunda iyileşme saptanması, TNF- α 'nın İBH patogenezinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir (Goretsky, ve diğerleri, 2012). İnflamatuvar bağırsak hastalığında hem akut hem de kronik inflamasyonun kontrol altına alınması, doku hasarının azaltılmasını ve mukozal iyileşmeyi sağlamaktadır.

İBH'de, bağırsakta bulunan lezyonlarda CD4⁺ T hücreleri yoğunluktadır ve bu hücreler kan dolaşımındaki lenfositlerle benzer karakteristik özellikleri taşımaktadır. İBH'deki doku hasarının nedeni, lezyon bölgelerine göç eden ve yüksek miktarda sitokin sentezleyerek direkt veya indirekt olarak inflamasyonun amplifikasyonunu sağlayan aktive T hücreleridir. Bu hücreler, sitokinler aracılığı ile yardımcı T-1 hücrelerine (Thp1) polarize olmakta ve bu hücrelerden INF- γ , IL-6 ve TNF- α gibi birtakım mediyatörler salgılanması ile doku hasarına sebep olmaktadır. Buradaki kilit sitokinlerden biri de IL-12'dir. Aynı zamanda antijen sunan hücrelerden (makrofaj) de salgılanan TNF- α ile mukozadaki seviyeleri daha fazla yükselmektedir (şekil 2.2..) (Pallone & Monteleone, 2001).



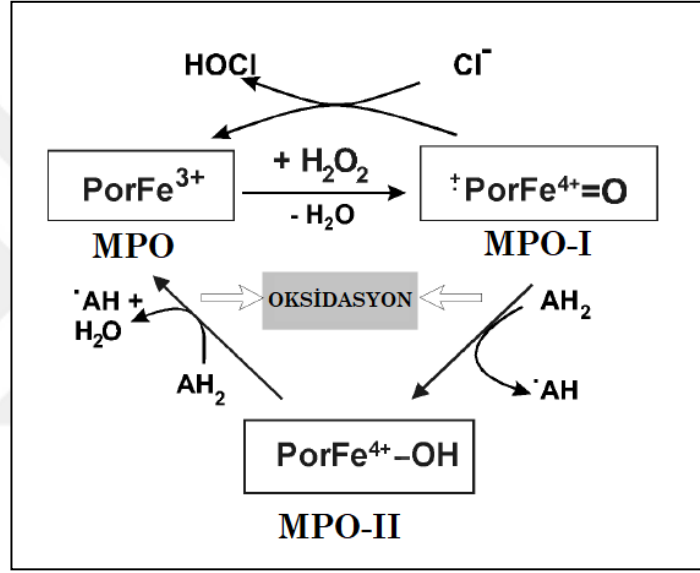
Şekil 2.2. Lezyon bölgesinde, makrofaj kaynaklı birtakım sitokinlerin salınması (Neurath, 2014).

Deneysel İBH modellerinde ve İBH hastalarında, lamina propria tabakasındaki makrofajlar ve CD4⁺ T hücrelerinden salınımı artan bir diğer sitokin ise IL-6'dır. Fare modelinde, IL-6 sinyal yolağının monoklonal IL-6 antikorları ile bloke edilmesi yoluyla kronik intestinal inflamasyonun bastırıldığı ve böylelikle IL-6 antikorlarının potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Ogino, ve diğerleri, 2013). Bu etkiyi özellikle, T hücrelerinin apoptozunu indükleyerek ve INF- γ , TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azaltarak göstermektedir.

IL-12 ailesinden heterodimerik glikoprotein yapısına sahip bir sitokin olan IL-35, disülfid bağıyla birbirine bağlanmış IL-12 α ve IL-27 b zincirlerinden oluşmaktadır (Tedder & Leonard, 2014). IL-35, Th1 ve Th17 hücrelerinin proliferasyonunu, T hücrelerinin bölünmesini G1 fazında tutarak önlemektedir. Th1 ve Th17 hücrelerinin proliferasyonunun IL-35 ile engellenmesi immun hücreler üzerindeki baskılayıcı etkisini ön plana çıkarmaktadır. Son yıllarda ilgi çekici bir sitokin haline gelen IL-35'in özellikle otoimmün hastalıklara karşı potansiyel terapötik etkinliği çeşitli hayvan modellerinde araştırılmaktadır (Catalan-Diebne, McIntyre, & Zlotnik, 2018). Yapılan bir çalışmada IL-35'in, T hücreleri üzerindeki sitokin yanıtını baskılayarak aktif koliti azalttığı ve kontrol altına aldığı gösterilmiştir (Wirtz, Billmeier, Mchedlidze, Blumberg, & Neurath, 2011).

2.2.3. Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz (MPO), aktive nötrofillerin intraselüler granüllerinden salgılanan ve bakterisidal özelliğe sahip, sistein köprüsü ile birbirine bağlı iki adet 73 kDA ağırlığında monomeri bulunan, yeşil renkli bir hem-enzimdir. Bu enzim, nötrofil hücresinin içinde en fazla miktarda (yaklaşık hücrenin kendi kuru ağırlığının %5'i kadar) bulunan proteindir ve az miktarda olsa da monositler içerisinde de MPO enzimi bulunmaktadır (Davies, 2011).



Şekil 2.3. Hipokloröz asit oluşumu ve miyeloperoksidaz enzim döngüsü. Por, porfirini; AH₂ ve AH ise sırasıyla substratları ve radikal formlarını temsil etmektedir (Arnold, 2004).

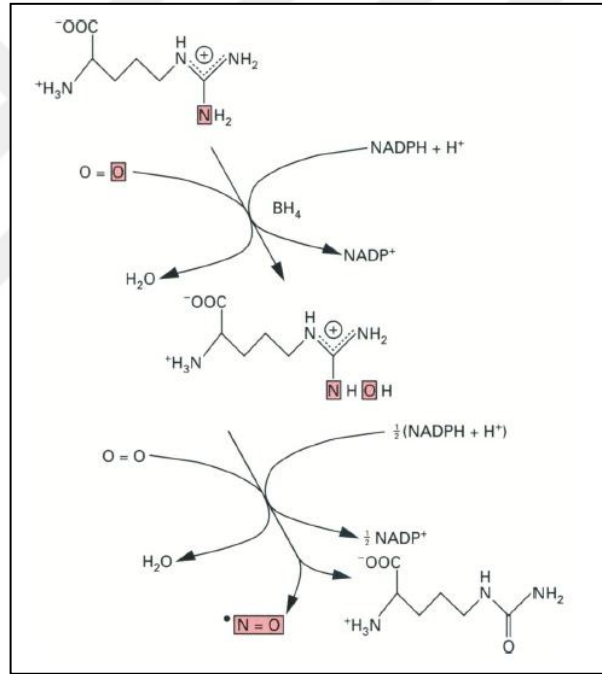
Genellikle ferrik ya da doğal MPO, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek MPO-I'i oluşturur. Burada hidrojen peroksit MPO tarafından suya indirgenirken oluşan MPO-I (bileşik-I), halojenlerin varlığında yeniden doğal formuna (MPO) dönüşebilir ve bu dönüşüm sırasında halojenler (Cl⁻, Br⁻ ve I⁻), hipohalöz aside okside olabilir (Burner, Furtmüller, Kettle, Koppenol, & Obinger, 2000) (Şekil 2.3.).

MPO, çeşitli oksidanlar oluşturma kapasitesine sahip bir enzimdir ve ayrıca aktif formları olan [büyük çoğunlukla MPO-I olmak üzere MPO-II'de (bileşik-II'de)] farklı substratları, elektron çalarak, okside edebilme yetisine sahiptir. Bu substratlara; tirozin, triptofan, sülfhidril grupları, fenoller, nitrit, hidrojen peroksit, ksenobiyotikler vd. örnek

olarak verilebilir. Bu substratlardan alınan elektronlarla, moleküller radikal formuna dönüştür (Şekil 2.3.). Bu radikal formlar ve hipohalöz asitler, makromoleküller ve dokuların hasarı ile doğrudan ilişkilidir (Arnold, 2004).

2.2.4. Nitrik oksit sentezi ve nitrik oksit sentaz

Nitrik oksit (NO), gaz formunda olan ve “N=O” şeklinde formülize edilen inorganik bir gazdır. NO, memeli hücrelerinde nitrik oksit sentazın (EC 1.14.13.39) katalizlediği, NADPH + H⁺, moleküler oksijen, tetrahidro biopterin (BH₄) ve L-Arjinin’in kullanıldığı reaksiyon aracılığı ile sentezlenmektedir (Şekil 2.4.) (Knowles & Moncada, 1994).



Şekil 2.4. Nitrik oksitin NADPH, O₂ ve BH₄ varlığında, L-Arjinin’den üretilmesi (Knowles & Moncada, 1994).

Yapılan araştırmalarda memelilerde NO sentezinin ilk olarak damar endoteli, beyin ve aktive makrofajlarda gerçekleştiği gösterilmiştir. Makrofajlarda NO sentezini katalizleyen enzimin Ca⁺²-bağımsız bir enzim olup diğer hücre ve dokulardakilerden farklı yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonraki çalışmalarda nitrik oksit sentazın üç farklı izoenzimi olduğu keşfedilmiştir. Bunlar; Tip I olarak da bilinen ve sinir hücrelerinde sentezlenen nöronal NOS (nNOS), tip II olarak bilinen ve sitokinler aracılığı ile makrofajlarda ve hepatositlerde uyarılabilen indüklenabilir NOS (iNOS) ve

tip III olarak bilinen, damar endotelinde bulunan endotelial NOS (eNOS)'tur (Knowles & Moncada, 1994; Nathan & Xie, 1994).

Literatürde NO ve NOS'un inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisinin incelendiği birçok deneysel ve klinik araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların birçoğu birbiri ile çatışıyor durumda olsa da genel kanı özellikle hastalığın aktif dönemlerinde, NOS ve dolayısı ile de NO artışı ile ilişkili olduğu yönündedir. Aynı zamanda birçok çalışmada NOS ve NO artışının Crohn hastalığından ziyade Ülseratif kolit hastalığında daha baskın olduğu belirtilmiştir (Cross & Wilson, 2003).

2.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Oksidatif Stresin Rolü

2.3.1. Oksidatif stres

Antioksidan-oksidan dengenin oksidan yönüne doğru değişmesi ve potansiyel bir hasara sebep olması durumu, oksidatif stres olarak tanımlanır; bir diğer ifadeyle çok fazla artmış serbest radikal oluşumuna karşılık, antioksidan savunma sisteminin yetersiz ve etkisiz kalması ile ilişkili artmış hasardır (Halliwell, 1994; Sies, 1997). Oksidanlar, aerobik metabolizmanın normal bir ürünü olarak üretiliyor olsa da bu üretilen oksidanların seviyesi, normal fizyolojik koşullarda kontrol altında tutulabilmektedir (Sies, 1997).

2.3.1.1. Serbest radikaller

2.3.1.1.1. Serbest radikallerin tanımı

Serbest radikaller, son yörüngelerinde eşleşmemiş elektrona sahip atom veya moleküller olarak tanımlanırlar. Eşleşmemiş elektronlar, bu atom veya molekülün kimyasal reaktivitesini arttırmaktadırlar. Serbest radikaller arasında, hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), $\text{NO}^{\cdot}$, peroksinitrit radikali ($\text{ONOO}^{\cdot}$) gibi moleküller yer almaktadır (Betteridge, 2000).

Bu eşleşmemiş elektronlara sahip moleküller oldukça reaktiftir ve bu özelliklerinden dolayı hücre içindeki lipitler, proteinler, karbohidratlar ve özellikle DNA gibi makromoleküllere bağlanarak hücre hasara sebep olmaktadır (Kuhn, 2003). Bu özelliklerinin yanı sıra, patojenlere saldırmak amacıyla nötrofiller gibi birçok hücre de

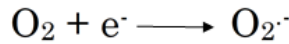
bir koruyucu mekanizma olarak bu serbest radikalleri üretmektedirler (Scheibmeir, ve diğerleri, 2005).

Vücutta serbest radikaller birkaç farklı biyokimyasal süreç ile üretilmektedir. Örneğin, süperoksit ve hidroksil radikali aerobik solunum sırasında oluşurken, güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl) aktive fagositler tarafından üretilmektedir. Reaktif azot türü olan nitrik oksit ise damar endoteli ve diğer hücreler tarafından üretilmektedir (Betteridge, 2000).

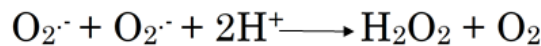
2.3.1.1.2. Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT) normal metabolizmanın (endojen kaynaklı) bir sonucu olarak üretilbileceği gibi; sigara, ozon maruziyeti, hiperoksi, iyonize radyasyon ve ağır metallerin sebep olduğu eksojen kaynaklı da olabilmektedir. O_2^- , $\cdot OH$ ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi moleküller üç ana ROT olarak örnek verilebilir. ROT, molekülde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurması ile (1) radikal olanlar ve iki radikalın eşleşmemiş elektronlarını paylaşması ile oluşan (2) radikal olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012).

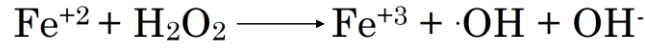
Süperoksit radikali, özellikle aerobik solunum sırasında, elektron transport zincirinin kompleksleri üzerinde taşınan bazı elektroların kazayla sızıntıya uğraması ve bu elektronların doğrudan moleküler oksijene bağlanıp oksijeni indirgemesiyle oluşur (Halliwell, 1989).



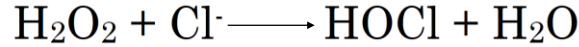
Oluşan O_2^- , hızlı bir şekilde SOD (süperoksit dismutaz) enziminin katalizlediği bir dismutasyon reaksiyonu ile ortamdan temizlenir ve son ürün olarak H_2O_2 oluşur (Halliwell, 1989).



Yukarıda belirtilen reaksiyonun son ürünü olan hidrojen peroksit, zayıf bir oksidandır ve kısmen stabil bir moleküldür. Ancak süperoksit anyonundan farklı olarak H₂O₂ hızlı bir şekilde hücre zarlarından diffüze olabilir ve böylelikle geçiş metallerinin ortamda bulunduğu durumda, Fenton reaksiyonları adı verilen tepkimelerle hidroksil radikaline dönüştürülebilir (Betteridge, 2000). Bu reaksiyon sonunda oluşan ·OH, oldukça reaktif ve toksik bir oksijen türüdür. Bu serbest radikal, özellikle lipitlere ve proteinlere bağlanarak bu moleküllerde oksidasyona sebep olur (Finaud, Lac, & Filaire, 2006).



Aktive nötrofillerde H₂O₂, miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığı ile Cl⁻ iyonunun varlığında substrat olarak kullanılarak HOCl'ye dönüştürülmektedir (Birben, ve diğerleri, 2012).



Oldukça reaktif bir molekül olan HOCl, patojenlerin öldürülmesinde görev almasının dışında, DNA ile de etkileşime girebilmektedir. Böylelikle, DNA-protein etkileşimini indükleyebilir, pirimidin oksidasyon ürünlerinin üretimine ve DNA bazlarına klorür eklenmesine neden olabilir (Birben, ve diğerleri, 2012).

2.3.1.1.3. Reaktif azot türleri

Reaktif oksijen türleri gibi reaktif azot türleri (RAT) de biyolojik olarak üretilen serbest radikallerin etkileşimleri sonucu oluşturulur. Biyolojik sistemde önemli fizyolojik görevler üstlenmiş olan NO, tüm RAT'ların üretilmesinde birincil kaynaktır. NO, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile oluşmaktadır (Patel, ve diğerleri, 1999). Oluşan NO hızlı bir şekilde süperoksit radikali ile reaksiyona girdiği zaman, fizyolojik

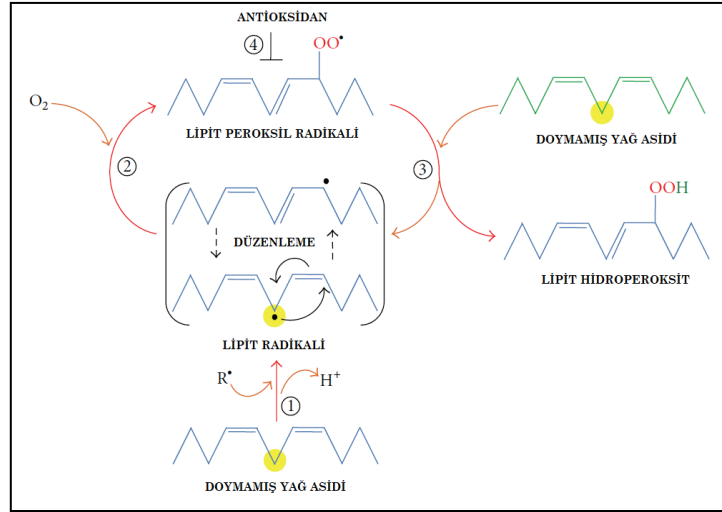
koşullarda stabil olmayan ve oldukça reaktif bir molekül olan ONOO⁻ radikalini oluşturur (Patel, ve diğerleri, 1999; Szabó, Ischiropoulos, & Radi, 2007).



2.3.1.2. Lipit peroksidasyonu

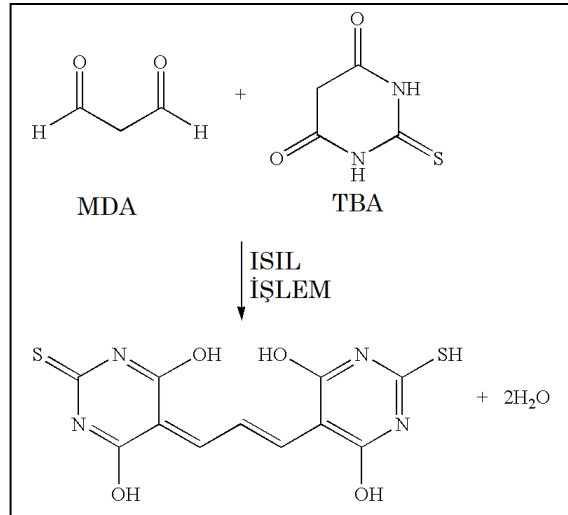
Biyolojik membranların oksidatif strese maruz kalmasının, ilerleyen bir dejenerasyon ve fonksiyon kaybı ile sonuçlandığı bilinmektedir. Bu oksidatif saldırının hedefleri arasında, özellikle doymamış yağ asidi zincirleri içeren fosfolipitler ve kolesteroler bulunmaktadır. Genel bir ifade ile bu moleküllerin oksidatif strese bağlı olarak degradasyonu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılmaktadır (Girotti, 1985).

Küçük, suda çözünebilen, oldukça mobil ve kimyasal olarak çok reaktif bir serbest radikal olan $\cdot\text{OH}$, lipitlere etki eden ve lipit peroksidasyonunu başlatan en yaygın reaktif oksijen türüdür. Lipit peroksidasyonu süreci üç aşamadan oluşur; başlangıç, yayılma ve sonlanma. İlk aşamada (1) hidroksil radikali gibi oksidanlar doymamış yağ asidi ile reaksiyona girer ve karbon merkezli lipit radikalini oluştururlar ($\text{L}\cdot$). Yayılma evresinde (2) ise $\text{L}\cdot$ hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini ($\text{LOO}\cdot$) oluşturur. Oluşan $\text{LOO}\cdot$ radikali bir başka lipit molekülünden hidrojen alarak yeni bir lipit radikalini oluşmasına sebebiyet verirken kendisi de lipit hidroperoksit (LOOH) dönüşür (3). Bir kere lipit peroksidasyonu başladığı zaman son ürünler oluşup sonlanma aşamasına gelene kadar zincirleme reaksiyonlar devam eder. Hidrojen donörü olacak olan bir antioksidanın hidrojenini, lipit radikaline vererek radikal olmayan bir ürün olan lipit hidroperoksit ürününe dönüştürülmesi sağlanarak reaksiyon zinciri bu noktada durdurulabilir (4) (Şekil 2.5.) (Ayala, Munoz, & Argüelles, 2014).



Şekil 2.5. Lipit peroksidasyonu sürecinin gösterimi (Ayala, Munoz, & Argüelles, 2014).

Lipid oksidasyonunun derecesi, (1) doymamış yağ asidi kayıpları, (2) birincil peroksidasyon ürünlerinin miktarları ve (3) karboniller ve hidrokarbon gazları gibi ikincil ürünlerin miktarları ölçülerek belirlenebilir. Bunlar arasında lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehitin (MDA), tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girerek renkli bir bileşik oluşturduğu metot en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Halliwell & Chirico, 1993).



Şekil 2.6. İki mol TBA ile bir mol MDA'nın oluşturduğu pembe renkli bileşik (Guillén-Sans & Guzmán-Chozas, 2010).

İki aldehit grubu ile birer amino grubuna bağlanarak schiff bazını oluşturan MDA, kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehittir (Horton & Fairhurst, 1987). Ayrıca iki molekül

TBA, MDA ile reaksiyona girerek (Şekil 2.6.) spektrofotometrede 512 nm’de okunabilen pembe renkli bir bileşik oluşturur (Guillén-Sans & Guzmán-Chozas, 2010).

2.3.2. Antioksidan savunma

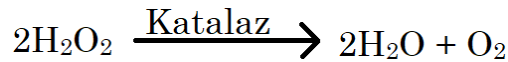
Antioksidan kavramı, bir substratın oksidasyonunu ya geciktirebilecek ya da önleyebilecek herhangi bir bileşiği ifade etmektedir. Antioksidan fonksiyonları ise; oksidatif stres, DNA mutasyonları ve kanserleşme gibi birçok hücrel hasar parametrelerini azaltmaktır (Pisoschi & Pop, 2015). Bugün çok fazla tanımlanmış antioksidan molekül bulunmasıyla birlikte, vücutta endojen antioksidan enzimler de mevcuttur. Bu antioksidan moleküller ve enzimler gerek birer serbest radikal süpürücüsü olarak; gerekse de bir redoks tepkime sonucu ortamdaki reaktif oksijen türlerini ortamdan kaldırarak görev yaparlar.

Antioksidanlar ve SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi en önemli endojen antioksidan enzimler hem hücre içi kompartmanlarda hem de hücre dışında ROT’lara karşı önemli bir savunma hattı oluştururlar (Karihtala & Soini, 2007).

2.3.2.1. Antioksidan enzimler

2.3.2.1.1. Katalaz

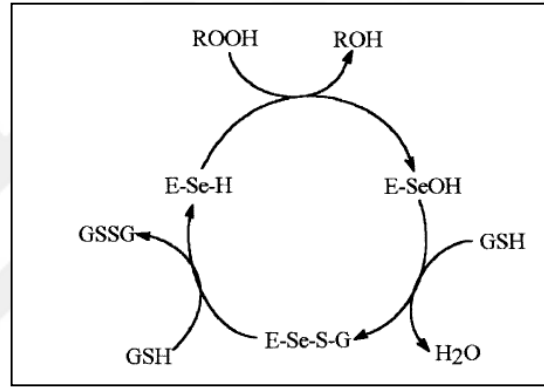
Katalaz (EC 1.11.1.6), 60 kDa ağırlığında dört adet ferriporfirin grubu içeren, alt birimlerden oluşmuş ve toplamda yaklaşık 240 kDa ağırlığında tetramerik bir enzimdir. Katalaz hidrojen peroksit üzerinde oldukça etkili bir enzimdir ve H₂O₂’yi peroksidaz aktivitesi ile suya ve moleküler oksijene parçalar (Mates, Perez-Gomez, & de Castro, 1999).



Mates ve diğerleri (1999), yaptıkları derlemede katalaz enziminin; alerjide, kanserde, kardiyak rahatsızlıklarda, genetik ve metabolik hastalıklarda, enfeksiyon hastalıklarında ve nörodejeneratif hastalıklarda oldukça önemli bir yere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, fare kolit modelinde yapılan bir çalışmada, kolon katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (Rochat, ve diğerleri, 2007).

2.3.2.1.2. Glutasyon peroksidaz

Tıpkı katalaz gibi, GPx'de (EC 1.11.1.9) bir endojen antioksidan enzimdir. Memeli dokularında selenyum bağımlı GPx'in dört ana izoenzimi vardır: kırmızı kan hücrelerinde, karaciğerde, akciğerde ve böbreklerde bulunan klasik GPx1; gastrointestinal sistemde bulunan GPx2; farklı dokulardan salınan plazmadaki GPx3 ve yine birçok dokudan salınan fosfolipit GPx4 (PHGPx4)'tür. Bunlardan GPx1, 2 ve 3 homotetramer iken PHGPx4 monomer olarak fonksiyonlarını yerine getirmektedir (Margis, Dunand, Teixeira, & Margis-Pinheiro, 2008).



Şekil 2.7. Glutasyon peroksidaz enziminin katalitik döngüsü. E, glutasyon peroksidaz enzimi (Mugesh & Singh, 2000).

Yapısında selenosistein bulunan glutasyon peroksidazın rolü, selenosistein içeren aktif bölgesi aracılığı ile hidrojen peroksit ve organik peroksit miktarını azaltmaktır. Burada selenolat anyonu (E-Se-H), selenik asite (E-Se-OH) okside olurken hidrojen peroksit ise indirgenir. Selenik asit bu noktadan sonra redükte glutasyon (GSH) ile reaksiyona girer ve selenosülfidi oluşturur (E-Se-S-G). Selenosülfid oluşuktan sonra bir GSH daha selenosülfid yapısına saldırarak okside glutasyonun (GSSG) oluşmasına neden olurken enzim ise yeniden aktif formuna dönüşür (Şekil 2.7.) (Mugesh & Singh, 2000).

GPx enziminin, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, iskemi/reperfüzyon hasarı ve inflamasyon gibi durumlarla ilişkisi olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Lubos, Loscalzo, & Handy, 2011). GPx nakavt farelerle yapılan bir çalışmada, mikropsuz yetiştirilen bir ortamda on iki aylığa kadar farelerde herhangi bir semptom görülmezken, normal koşullarda yetiştirilen GPx nakavt farelerin gelişimlerinin erken safhalarında kolit semptomları gösterdikleri ortaya konmuştur ve

GPx nakavt farelerin kolit modeli olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Esworthy, Binder, Doroshow, & Chu, 2003). Bu çalışma ile GPx enziminin inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile doğrudan ilişkisi olduğu ve eksikliğinin olduğu durumda kolit hastalığının oluşabildiği ortaya koyulmuştur.

2.3.3. Oksidatif stresin inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi

Birçok kapsamlı çalışmaya rağmen İBH'nin başlaması, gelişmesi ve yayılması ile ilgili kesin bir model ortaya konulamamıştır. İnflamatuvar hücrelerin, bağırsak mukozasına aşırı derecede infiltrasyonu nedeni ile gastrointestinal sistemin immun mekanizmalarının disregülasyona uğramış olma hipotezi daha baskın olarak tartışılmaktadır. Bu noktada hücresel hasara sebep olan spesifik yollar tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, oksidatif stresin önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Rezaie, Parker, & Abdollahi, 2007).

İBH'ye sahip bireylerde, mukozaya miyeloperoksidaz içeren çok sayıda aktive fagositin infiltre olması, uzamış ve artmış mukozal maruziyet anlamına gelmektedir. Bu fagositlerin mukozaya göçü, ROT ve RAT da dahil, toksik ve hasar veren diğer ajanlara karşı da bir bariyer görevi üstlenmektir (Kruidenier & Verspaget, 2002). Lih-Brody ve diğerleri (1996), İBH'ye sahip insanların mukozal lezyonlarından aldıkları biyopsi örneklerinde yaptıkları ROT kemilüminesans analizi sonuçlarının İBH hastalıklarına sahip bireylerde hasta olmayanlara göre çok daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar aynı zamanda hastalığın aktif dönemleri ile ROT miktarlarının arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı İBH modellerinde yapılan çalışmalarda, 8-oxo-7, 8-dihidro 2' - deoksiguanozin (8-oxodG) düzeylerinde artış (Ding, ve diğerleri, 2005), GPx aktivitesinde artış (Tham, Whitin, & Cohen, 2002), GSH düzeylerinde azalma (Ardite, ve diğerleri, 2000), SOD ve Katalaz aktivitelerinde artış (Nieto, ve diğerleri, 2000), lipid peroksidasyonu ve MPO aktivitesinde artış olduğu (Ghazanfari, ve diğerleri, 2006; Ghafar, ve diğerleri, 2006) ve oksidan/antioksidan sisteminin oksidan yönüne doğru değiştiği ortaya konulmuştur. Aynı zamanda insan bağırsak dokusu biyopsi örneklerinde yapılan çalışmalarda, lipid peroksidasyonunda artış tespit edildiği bildirilmiştir (Chiarpotto, ve diğerleri, 1997; Koch ve diğerleri, 2000; Kruidenier ve diğerleri, 2003).

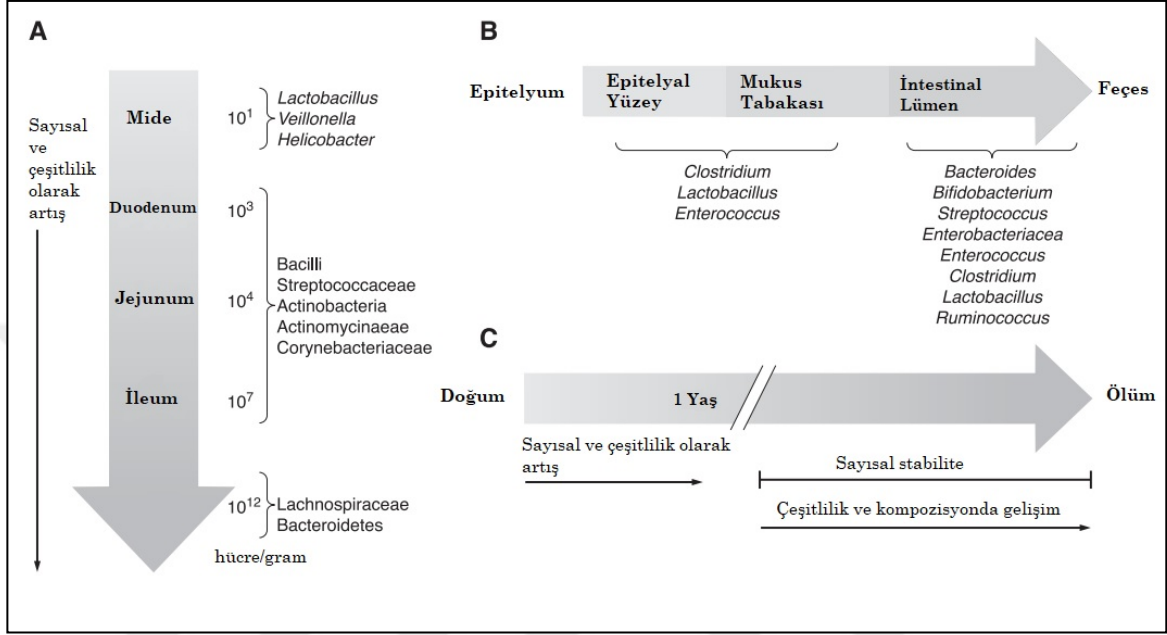
Birçok hayvan modelinde araştırmacılar oksidatif stresin İBH ile doğrudan ilişkili olabileceğini ve hatta doku hasarının en büyük mekanizmalarından birinin olabileceğini bu çalışmalarla ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalardan en dikkat çekici olanı Esworthy ve diğerlerinin (2003), transgenik hayvanlarla yaptıkları çalışmaları olmuştur. Araştırmacılar, GPx enziminin olmadığı transgenik hayvanlar üretmiş ve hayvanların gelişimlerinin erken dönemlerinden itibaren İBH'nin oluşmaya başladığını ortaya koymuşlardır.

2.4. Bağırsak Mikrobiyotası

Bağırsak lümeni çeşitli simbiyotik bakteriler ve mikroorganizmalarla çevrelenmiştir ve bunların tamamı bağırsak mikrobiyotası olarak isimlendirilmektedir. Mikrobiyotadaki yararlı bakteriler ile konak canlı arasındaki bu mutualist yaşam, insan sağlığına yararlı olabilecek birtakım metabolitlerin bakteriler tarafından üretilmesine imkân sağlamaktadır (Nicholson, ve diğerleri, 2012).

Son yirmi yıl içinde bağırsak sağlığının korunmasının ne kadar önemli olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Bu süreçte immunoloji ve bağırsak mikrobiyotası alanında iki önemli ilerleme kaydedilmiştir. Bunlardan biri, diyetin bağırsak mikrobiyotası çeşitliliği ve kompozisyonu üzerinde olan etkisidir. Farklı insan popülasyonlarının bağırsak mikrobiyotalarındaki farklılık ve diyetlerinin değişmesi ile bu mikrobiyotadaki değişiklik bunun en büyük göstergesidir. İkincisi ise, bağırsak mikrobiyotası çeşitliliğinin ve mikrobiyotada üretilen ürünlerin, immun ve inflamatuvar yanıtlardaki tahmin edilemez etkileridir. Yapılan çalışmalarla da mikrobiyota kompozisyonunun ve çeşitliliğinin, obezite, tip-1 diyabet, astım ve daha birçok hastalıkla ilişkisi olduğu ortaya konmuştur (Maslowski & Mackay, 2011).

Şekil 2.8. Bağırsak mikrobiyotasının zamansal ve bölgesel yönlerinin bir gösterimi. A: Gastrointestinal boşluk boyunca mikrobiyal sayının ve çeşitliliğin değişimi. B:



Tabakalar arası bakteriyal çeşitlilikteki farklılık. C: Bakteriyal sayı ve çeşitliliğin zamansal değişimi ve gelişimi (Sekirov, Russell, Antunes, & Finlay, 2010).

Doğumdan itibaren oluşmaya başlayan bağırsak mikrobiyotası neredeyse bir yaşına kadar sayısal olarak gelişimini tamamlar ve hayatının sonuna kadar bunu sürdürürken, mikrobiyotadaki çeşitlilik ve kompozisyon gelişmeye devam eder. Bu çeşitliliği, anneden gelen kolonizasyon, diyet, çevresel maruziyet ve antimikrobiyal ajanlarla yapılan tedaviler oldukça etkiler (Sekirov, Russell, Antunes, & Finlay, 2010). Yapılan çalışmalar bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri çeşitliliğinin binlerle ifade edildiğini ortaya koymuştur. Sadece çeşitlilik olarak değil aynı zamanda sayısal olarak da gastrointestinal boşlukta, mideden başlayarak sırasıyla, duodenum, jejunum, ileum ve kolona doğru gittikçe bakterilerin miktarı değişmektedir (O'Hara & Shanahan, 2006). Bununla birlikte epitelyal yüzeyde ve mukoza tabakasında *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsine ait birtakım bakteri türleri bulunurken *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Ruminococcus* gibi bazı cinslere ait bakteri türlerinin de lümende olduğu ve feçese geçtiği bilinmektedir (Şekil 2.8.). Bu bakteri türleri epitelyal ve mukozal alanda bulunmamaktadır (Swidsinsk, Loening-Baucke, Lochs, & Hale, 2005).

2.4.1. Probiyotikler ve *Bacillus clausii* probiyotiği

Birçok çalışmada, probiyotiklerin, prebiyotiklerin ve bunların birlikte uygulanması (simbiyotik) durumlarda intestinal mikrobiyotanın aktivitesinin ve kompozisyonunun değiştirilebileceği gösterilmiştir. Dünya sağlık örgütüne göre probiyotikler; yeterli miktarlarda uygulandığında konak canlıya önemli faydalar sağlayan yaşayan mikroorganizmalardır (Bedani, Saad, & Sivieri, 2016). Bunlar arasında en iyi bilenenleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait suşları içeren probiyotik mikroorganizmalardır (Saxelin, Tynkkynen, Mattila-Sandholm, & de Vos, 2005).

Amaretti ve diğerleri (2013), *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları ile yaptıkları bir çalışmada bu suşları farklı konsantrasyonlarda, doksorubisin ile indüklenmiş oksidatif stres sıçan modelinde uygulamışlar ve bu probiyotik bakterilerin oksidatif stres üzerinde azaltıcı bir özelliğinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda farklı cinslere ait probiyotik bakteri suşlarının gelişim, immün sistem ve oksidatif stres üzerine olan etkileri bilinmektedir. Bu probiyotik bakterilerin hidroksil radikali ve süperoksit radikallerini süpürücü özellikleri bulunurken, probiyotik *Bacillus* türlerinin de inflamasyon ve immün sistem üzerinde pozitif yönde etkinlikleri mevcuttur (Wang, ve diğerleri, 2017).

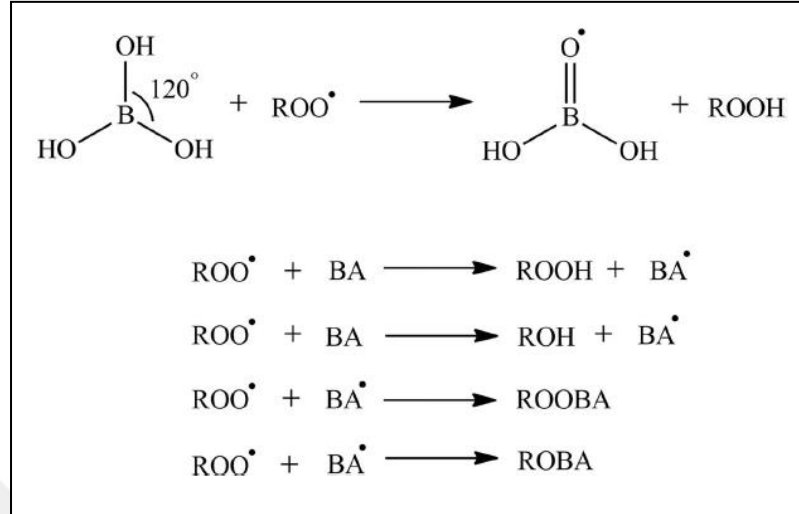
Bacillus clausii, literatürde Enterogermina® ürünü adı altında reçetesiz satılan bir medikal destek ürünü olarak onaylanmıştır ve sadece *Bacillus clausii* türünün sporlarını içermektedir. Bu probiyotik bakteri türünün birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu da bilinmektedir (Cutting, 2010). Yapılan bazı çalışmalarla *Bacillus clausii* sporlarının herhangi bir hasar almadan doğrudan gastrointestinal boşluğu geçebildiği gösterilmiş, ağız yoluyla uygulanmasından sonra farelerin gastrointestinal boşluğunda 18 gün, insanlarda ise 12 gün boyunca kalabildiği ve burada kolonize olabildiği gösterilmiştir (Lopetusa, Scaldaferrì, Franceschi, & Gasbarrini, 2016). Bir araştırma grubu, altı hasta ile yaptıkları bir çalışmada *Bacillus clausii* tedavisinin, inflamasyon, bağışıklık sistemi ve immün yanıtı, bağırsak geçirgenliği, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücreler arası sinyal, apoptoz, hücre adhezyonu gibi birçok mekanizmayı ilgilendiren genler üzerinde etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır (Di Caro, ve diğerleri, 2005).

Asetaminofen uygulanan bir çalışmada, *Bacillus clausii* türünün uygulandığı sıçan grubunun böbrek dokusundaki SOD, katalaz ve GSH gibi endojen antioksidan sistemlerin, *Bacillus clausii* uygulanmayan gruba kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada araştırmacılar, oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkan ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinin hasta grubunda, *Bacillus clausii* uygulanan gruba göre çok yüksek düzeylere çıktığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar *Bacillus clausii* türünün antioksidan sistemler üzerinde pozitif bir etkisinin olduğunu ayrıca oksidatif stresi bu sistemler üzerinden azalttığını ileri sürmüşlerdir (Patel, Patel, & Acharya, 2020).

2.5. Borik Asit

Bor, periyodik tablonun beşinci elementidir ve oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşan inorganik formlar (Borik asit, boraks, vs.) halinde bulunmaktadır. Borun ana kaynağı diyet ve içme suyudur. Özellikle meyveler, sebzeler ve kuru yemişler bor bakımından zengin kaynaklardır. Borik asit (BA), bor ile oksijen bağının koparılması için yüksek enerji gerektirmesi nedeniyle insan ve hayvanlarda metabolize olamamaktadır. Oral yoldan uygulanan borik asit sıçanlarda, tavşanlarda ve insanlarda tamamen gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilmekte ve değişikliğe uğramadan idrar yolu ile atılmaktadır (Murray, 1998).

Kar ve diğerleri (2019) yayınladıkları çalışmada borik asidin, proton donörü olarak görev aldığını ve oksidan moleküllerin aktivitelerini proton vererek etkisiz hale getirdiğini, ayrıca zincirleme devam eden reaksiyonları belirli yerlerden kırarak ya da serbest radikalleri kendi üzerlerine alarak antioksidan özellik gösterdiğini ileri sürmektedirler (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Borik asidin olası antioksidatif etkinliğinin şematik gösterimi (Kar, ve diğerleri, 2019).

İnsan kanı ile yapılan *in vitro* bir çalışmada araştırmacılar, borik asidin farklı dozlarının antioksidan enzim sistemleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, insan eritrositlerinde borik asidin 15 mg/L konsantrasyonunda olduğu grupların SOD, katalaz, GPx ve Glutasyon S transferaz gibi bir takım antioksidan enzimlerin düzeylerinde artışın olduğunu, total antioksidan kapasitenin (TAC) arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda genotoksik birtakım parametrelerle de çalışmış olan araştırmacılar, doz bağımlı borik asidin genetik hasara yol açmadığını ileri sürerek, eritrositler üzerinde yaptıkları bu çalışmayla, borik asidin endojen antioksidan sistemler üzerinde oldukça önemli etkilerinin olduğunu ve bu etkilerle oksidatif stresin azaltılabileceğini belirtmişlerdir (Türkez, Geyikoğlu, Tatar, Keleş, & Özkan, 2014).

İnce, ve diğerleri (2010), sıçanlarla yaptıkları çalışmada hayvanların günlük yemine ek olarak borik asit ve boraks ilave etmişlerdir. Lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerinin, kontrol grubuna göre borik asit ve boraks suplementasyonunun olduğu gruplarda anlamlı bir şekilde düşmüş olduğunu gözlemlerlerken, Türkez, ve diğerlerinin (2014) yaptıkları çalışmanın aksine SOD, katalaz ve GSH gibi önemli endojen antioksidan mekanizmalar üzerinde etkili olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Kar ve diğlerlerinin (2018), sinaptozomlarda etanol ile indükledikleri oksidatif stres üzerine yaptıkları çalışmada, borik asidin MDA düzeylerini önemli derecede düşürdüğünü ve etanol kaynaklı katalaz artışının ise yeniden kontrol grubu düzeylerine kadar düştüğünü ortaya koymuşlardır.

Yapılan birçok çalışmada borik asidin, oksidatif stresi özellikle endojen antioksidan enzimler üzerinden etkileyerek antioksidatif bir etkinlik gösterdiği ortaya koyulmuştur.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Hekzadesiltrimetilamonyum bromür (HETAB):	Sigma H6269, ABD.
2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS)	: Sigma-Aldrich 92822, ABD.
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	: Sigma 88F-0060, ABD.
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	: Sigma-Aldrich 860336, ABD.
Naftiletilendiamin dihidroklorür	: Sigma-Aldrich N9125, ABD.
Tiyobarbitürik asit (TBA)	: Sigma T-5500, ABD.
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	: Sigma-Aldrich 18312, ABD.
N,N-Dimetilformamid	: Sigma D-4254, ABD.
Kadmiyum granülleri	: Fluka 20890, Almanya.
Potasyum klorür (KCl)	: Merck K26325335, Almanya.
Sodyumdodesil sülfat	: Sigma-Aldrich L6026, ABD.
Ditiotreitol (DTT)	: AppliChem A1101, İspanya.
NOS2 primer antikoru	: Santa Cruz sc-7271, ABD.
NOS2 sekonder antiokur	: Santa Cruz sc-358914, ABD.
β-aktin primer antikoru	: ABclonal AC026, ABD.
β-aktin sekonder antikoru	: ABclonal AS014, ABD.
<i>Bacillus clausii</i>	: Enterogermina, Sanofi, İtalya.
Fosfat Tamponu	: Sigma P4417, ABD.
Sülfanilamid	: Sigma S-9251, ABD.
Triton X-100	: Sigma-Aldrich X100, ABD.
Borik asit	: AppliChem A2940, İspanya.
Sülfürik asit	: Riedel-deHaen 07208, Almanya.
Asetik asit	: Riedel-deHaen 27225, Almanya.
Glisin	: Sigma G-2879, ABD.
Tris	: AppliChem A2264, İspanya.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

iBlot TM 2 Dry Blotlama Sistemi	: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Mikropleyt okuyucu	: PerkinElmer2030 Multilabel reader, Victor X3
Derin Dondurucu	: Thermo, ULT 1386-5-V40
Hassas Terazı	: Sartorius BP121S
ISE modülü	: ROCHE/HITACHI COBAS
Işık mikroskobu	: Olympus
İnkübatör	: BINDER BD53
Mikropleyt yıkayıcı	: BioTek ELx50
Mikrotom	: Leica RM 2145
pH Metre	: HANNA pH 211
Santrifüj	: Nüve NF800
Santrifüj, soğutmalı	: Jouan MR22
Shaker	: WiseMax
Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1601
Su banyosu	: Nüve BM402
Otoanalizör	: ROCHE/HITACHI COBAS
Vorteks	: WiseMix VM-10, WISD
Mini Gel Tank	: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Homojenizatör	: Hangzhou Miu Instruments, MT-30K
Florometre	: DeNovix
GEN-BOX ImagER CFx	
iBind Flex	

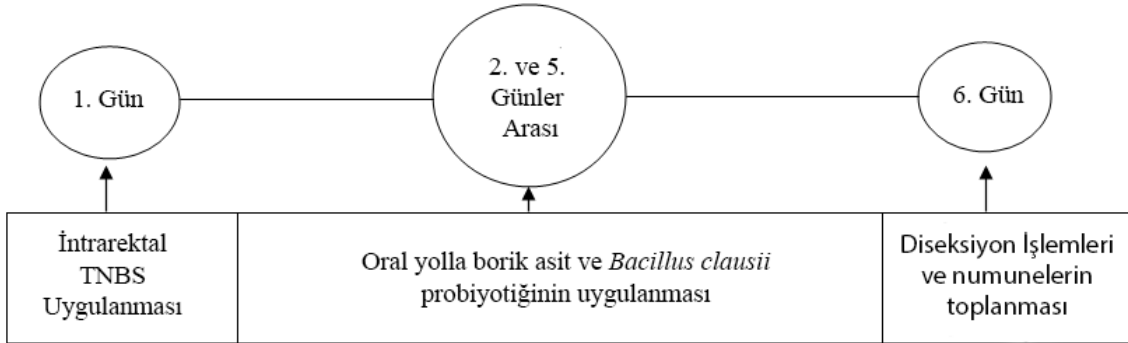
3.2. Deney Hayvanlarının Temin ve Bakımı

Çalışmaya başlamadan önce, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan 13.12.2019 tarihli, 778 no'lu karar ile onay alındı. Sıçanların bakımı ve cerrahi müdahaleler ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TICAM)'nde, biyokimyasal analizler ESOĞÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda ve histolojik incelemeler ise ESOĞÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Hayvanlar 12 saat gündüz/gece olarak ayarlanmış, $22\pm3^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklık/nemli ortamda barındırılarak *ad libitum* beslenme uygulandı. Çalışmada 8 haftalık, ortalama 250-300 g ağırlıklarında, 45 adet erkek Spraque Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Cerrahi işlemler sonrası ortaya çıkan tüm “tıbbi atıkların” yönetimi ESOĞÜ TICAM tarafından yapıldı.

3.3. Deney Planı, Deney Modelinin Oluşturulması, Deney Grupları ve Madde Uygulanması, Diseksiyon İşlemi

3.3.1. Deney planı

Toplamda altı gün süren deney planı aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1.). Bu plana göre; ilk gün anestezi altında olan Kontrol grubu sıçanlara intarektal serum fizyolojik, diğer deney grubundaki sıçanlara TNBS uygulandı, 24 saatlik sürenin ardından hayvanlara madde uygulaması başlatıldı ve dört gün madde uygulandıktan sonra (2. ve 5. günler arası) 6. günde tüm hayvanların diseksiyon işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen deney planı.

3.3.2. Deney modelinin oluşturulması

Deney modelinin oluşturulabilmesi için sıçanlar akşamdan 12 saatlik açlık periyoduna tabi tutuldu. Daha sonra hayvanlarda anesteziyi sağlamak için Ketamin ve analjezik/kas gevşetici olarak ise Ksilazin uygulandı (Ketamin/Ksilazin 3:1, 1,32 mg/kg intramusküler).

Çalışmada İBH sıçan modeli oluşturmak için Kankuri ve diğerlerinin (1999), uyguladıkları model kullanıldı. Bu modele göre özetle, ilk gün anestezi altındaki sıçanlara, %50'lik etanol içerisinde 120 mg/kg olacak şekilde hazırlanmış olan TNBS, plastik kanül yardımı ile rektumdan 8 cm içeriye girilerek (yalnızca kontrol grubu hariç) enjekte edildi. Daha sonra inen (descending) kolona ulaştığından emin olmak için 30 saniye boyunca sıçanlar kafa üzeri ters çevrilmiş olacak şekilde bekletildi. 30 saniyenin tamamlanmasıyla birlikte, hayvanların rektum ve kolonu içerisinde kalan fazlalık TNBS'nin atılması sağlanıp, yeniden ayılmak üzere kafeslerine yerleştirildi.

3.3.3. Deney grupları ve madde uygulanması

Deney grupları; Kontrol, İBH, İBH + Borik Asit (BA), İBH + Probiyotik (PB) ve İBH + Kombine (KOM) olmak üzere toplamda 5 grup olarak düzenlenmiştir (Tablo 3.1.). Aşağıda gruplara yapılacak uygulamaların detayları verilmiştir;

Kontrol: Rektuma 8 cm'lik kanül ile girildi ve sadece 1 ml serum fizyolojik (SF) uygulandı.

İBH Grubu: İBH modelini oluşturmak için 120 mg/kg TNBS (%50 etanol içerisinde çözüldü, toplam hacim 1 ml olarak ayarlandı) intrarektal olarak uygulandı.

BA Grubu: TNBS enjeksiyonundan 24 saat sonra başlanıp 5. güne kadar 100 mg/kg olacak şekilde her gün taze olarak 2 ml serum fizyolojik (% 0.9'luk NaCl çözeltisi) içerisinde çözünüp gavaj yolu ile uygulandı.

PB Grubu: TNBS enjeksiyonundan 24 saat sonra başlanıp 5. güne kadar 1×10^9 CFU/ml/100 g *Bacillus clausii* olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı.

KOM Grubu: TNBS enjeksiyonundan 24 saat sonra başlanıp 5. güne kadar 100 mg/kg borik asit ve 1×10^9 CFU/ml/100 g *Bacillus clausii* olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı.

Tablo 3.1. Deney grupları ve gruplardaki sıçanlara uygulanan maddeler.

Gruplar/Maddeler	TNBS	Borik Asit	Probiyotik
Kontrol (n:9)	-	-	-
İBH (n:9)	120 mg/kg	-	-
İBH + Borik Asit (BA) (n:9)	120 mg/kg	100 mg/kg	-
İBH + Probiyotik (PB) (n:9)	120 mg/kg	-	1 x 10 ⁹ CFU/ml/100 g vücut ağırlığı <i>Bacillus clausii</i>
İBH + Kombine (KOM) (n:9)	120 mg/kg	100 mg/kg	1 x 10 ⁹ CFU/ml/100 g vücut ağırlığı <i>Bacillus clausii</i>

3.3.4. Borik asit ve *Bacillus clausii* dozlarının belirlenmesi

Borik asit dozları daha önce tarafımızdan yapılan çalışmaya dayanılarak 100 mg/kg olarak belirlenmiştir (Kar, ve diğerleri, 2019). Aynı zamanda çalışma ekibimizin borik asidin 100 mg/kg dozunu kullanıldığı farklı çalışmaları da mevcuttur (Ataizi, ve diğerleri, 2019; Karimkhani, ve diğerleri, 2020). *Bacillus clausii*'ye ait doz için ise Patel ve diğerlerinin (2020), yaptıkları çalışma incelenmiş ve uygun doz araştırmacıların çalışmasına dayanarak belirlenmiştir.

3.4. Diseksiyon İşlemi

Çalışmanın 6. gününde, bir gece önceden aç bırakılmış olan sıçanlara anestezi uygulandı ve diseksiyonları gerçekleştirildi. Biyokimyasal analizler için alınan kan örnekleri jelli serum tüplerine aktararak, 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen serum örneklerinden rutin testler aynı gün yapıldı. Aynı hayvanlardan ayrılan diğer serum örnekleri ise, TNF- α ve IL-35 analizleri için alikotlanarak, çalışma anına kadar -80°C'de buzdolabında saklandı. Biyokimyasal analizler için alınan bağırsak dokusu örnekleri de doku poşetleri içerisinde, -80°C buzdolabında, çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

Aynı zamanda bağırsak dokuları, histolojik analiz prosedürlerinin uygulanacağı zamana kadar, %10'luk formaldehid solüsyonu içerisinde, karanlık ve serin bir ortamda muhafaza edildi.

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Rutin biyokimya ve tam kan sayımı (CBC) analizleri

Borik asidin *in vivo* etkinliğini belirlemek üzere, sıçan serum örneklerinde karaciğer fonksiyonu ile ilişkili testler (ALT, AST ve ALP); böbrek fonksiyonu ile ilişkili testlerin [kreatinin ve kan üre azotu (BUN)] ölçümleri, ticari kitler kullanılarak Roche Cobas 702 modüler otoanalizörlerde gerçekleştirildi. Tam kan hücre sayımı için Sysmex XN1000 cihazı kullanıldı.

3.5.2. İnflamatuar biyobelirteçlerin analizleri

3.5.2.1. Serum TNF- α düzeylerinin analiz edilmesi

İnflamasyon belirteci olarak mukozada antijen sunan hücrelerden ve makrofajlardan salgılanan bir pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α , sıçan serumunda, ticari ELISA Kiti (*Katalog No. E0764Ra*, BT LAB) ile analiz edildi. Bu analiz; kantitatif sandviç enzim immünolojik test tekniğine dayanmaktadır. Standartlar, kontrol ve örnekler kuyucuklara pipetlenerek, mevcut TNF- α immobilize antikörler tarafından bağlanması sağlanır. Bağlanmayanlar yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sıçan TNF- α 'ya özgü enzim bağlı bir poliklonal antikör, kuyucuklara ilave edilir. Bağlanmayan antikör-enzim reaktiflerinin uzaklaştırılması için yapılan bir diğer yıkamanın ardından, kuyucuklara substrat çözeltisi eklenir. Reaksiyon durdurma solüsyonunun eklenmesi ile reaksiyon durdurulur. Oluşan rengin şiddeti, ilk adımda bağlanan TNF- α miktarıyla orantılıdır. Absorbanslar spektrofometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülerek, standart grafiği yardımıyla örneklerdeki TNF- α konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.5.2.2. Serum IL-35 düzeylerinin analiz edilmesi

T ve B hücrelerinden salınan anti-inflamatuar bir sitokin olan IL-35, sıçan serumunda, ticari ELISA Kiti (*Katalog No. E2118Ra*, BT LAB) kullanılarak analiz edildi. Bu analiz; kantitatif sandviç enzim immünolojik test tekniğine dayanmaktadır. Standartlar, kontrol ve örnekler kuyucuklara pipetlenerek, mevcut IL-35 immobilize

antikorlar tarafından bağlanması sağlanır. Bağlanmayanlar yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara sıçan IL-35'e özgü bir biyotin konjuge antikor eklenir. Bağlanmayan antikor-enzim reaktiflerinin uzaklaştırılması için yapılan bir diğer yıkamanın ardından, kuyucuklara substrat çözeltisi eklenir. Reaksiyon durdurma solüsyonunun eklenmesi ile reaksiyon durdurulur. Oluşan rengin şiddeti, ilk adımda bağlanan IL-35 miktarıyla orantılıdır. Absorbanslar spektrofometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülerek, standart grafiği yardımıyla örneklerdeki IL-35 konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.5.2.3. Bağırsak dokusunda MPO aktivitesinin analiz edilmesi

Ölçüm prensibi:

Nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyon göstergelerinden biri olan miyeloperoksidaz aktivitesi bağırsak dokusunda ölçüldü (Suzuki, Ota, Sasagawa, Sakatani, & Fujikura, 1993). Yöntem, sentetik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) molekülünün, miyeloperoksidazın katalizlediği bir reaksiyon ile oksidasyonunun ölçülmesine dayanmaktadır.

Ölçüm ve homojenizasyon sırasında kullanılan çözeltiler:

50 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponu: Hazır pelletler kullanılarak 50 mM'lık 100 ml fosfat tamponu hazırlandı.

50 mM pH 6.0 potasyum fosfat tamponu: Hazır pelletler kullanılarak 50 mM'lık pH 6.0 100 ml fosfat tamponu hazırlanıp, 1 g HETAB ve 0.3722 g EDTA bu tampon içerisinde çözülerek kullanıldı.

160 mM pH 5.4 potasyum fosfat tamponu: Hazır pelletler kullanılarak 160 mM'lık pH 5.4 fosfat tamponu hazırlandı.

16 mM TMB: 0.0961 g TMB 25 ml N-N-dimetilformamid içinde çözülerek hazırlandı. pH<5 iken çözünmediği için NaOH damlatılarak çözünmesi sağlandı.

%0.06'lık hidrojen peroksit: %30'luk stoktan 0.1 ml alınıp 50 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Doku homojenatlarının hazırlanması:

Doku örnekleri tartıldıktan sonra %10 (w/v) olacak şekilde 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu pipetlendi ve homojenizatör ile buz üzerinde yaklaşık 1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenattan 1 ml alındı, 7000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Pellet üzerine 1 ml 50 mM pH 6.0 fosfat tamponu (HETAB içeren) pipetlendi ve yeniden homojenize edildi. Ölçümler için bu homojenat kullanıldı.

Deney protokolü:

Bu aşamada tüplere sırasıyla; 500 µl potasyum fosfat tamponu pH 5.4, 350 µl kör tüp için distile su ve 330 µl numune tüpleri için distile su, numune tüplerine 20 µl homojenat ve 100 µl TMB pipetlenip, 2 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir ölçüm için küvet içerisine aktarılan karışıma 50 µl H₂O₂ pipetlenerek reaksiyon başlatıldı (Tablo 3.2.). 37°C'de devam eden reaksiyon, 655 nm'de 5 dakika boyunca değişen absorbans artışı takip edildi.

Tablo 3.2. MPO aktivitesi analiz prosedürü.

	Kör	Numune
Potasyum fosfat tamponu pH 5.4	500 µl	500 µl
Distile su	350 µl	330 µl
Homojenat	-	20 µl
TMB	100 µl	100 µl
H₂O₂	50 µl	50 µl

Doku MPO aktivitesinin hesaplanması:

Elde edilen süpernatantlardan ayrıca total protein ölçüldü ve MPO aktivitesi U/mg protein olarak verildi. MPO aktivitesinin ünite olarak hesaplanabilmesi için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{MPO (U/ml)} = \frac{\Delta A / \text{dakika} \times V_{\text{total}}}{\epsilon \times V_{\text{örnek}}} \times \text{DF}$$

ϵ : Ekstinksiyon kat sayısı.

ΔA : Belli bir süre aralığındaki absorbans değişimi.

Vörnek: Küvetler içerisine pipetlenen numune hacmi.

V_{total} : Küvetler içerisine pipetlenen toplam hacim.

DF: Dilüsyon faktörü.

3.5.2.4. *Bağırsak dokusunda NO düzeylerinin analiz edilmesi*

Ölçüm prensibi:

Nitrik oksit ölçümünde Cortas ve Wakid (1990), ölçüm prensibi kullanıldı. Yöntem bakır kaplı kadmiyum granülleri ile nitrat (NO^-3)'ın nitrit (NO^-2)'e dönüştürülmesi ve nitritin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Ölçüm ve homojenizasyon sırasında kullanılan çözeltiler:

50 mM fosfat tamponu: Hazır pelletler kullanılarak 50 mM'lık fosfat tamponu hazırlandı.

75 mM'lık ZnSO_4 çözeltisi: 10.78 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan tartıldı, bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

55 mM'lık NaOH çözeltisi: 0.55 gr NaOH tartıldı biraz distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

0.2 M Glisin-NaOH tamponu: 15 gr glisin yaklaşık 100 ml distile suda çözüldü. 2 M'lık NaOH çözeltisi ile tamponun pH'sı 9.7'ye ayarlandı ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2 M NaOH çözeltisi: 8 gr NaOH tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.

0.1 M H_2SO_4 çözeltisi: Bir miktar distile su içerisine 2.78 ml ~%96'lık H_2SO_4 pipetlendi ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

5 mM CuSO₄ çözeltisi: 0.624 gr CuSO₄.5H₂O tartıldı, bir miktar distile su içerisinde çözülerek son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

3 M HCl: 124.3 ml %37'lik stok HCl bir miktar distile su içerisine pipetlendi ve daha sonra yine distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Sülfanilamid çözeltisi: 5 gr sülfanilamid 500 ml 3M sıcak HCl içerisinde çözüldü ve soğutuldu.

N-Naftiletilediamin çözeltisi: 50 mg N-Naftiletilediamin tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Eşit boyutlardaki kadmiyum granülleri numune ve kör tüp sayısı kadar ayrıldı. 3 sefer distile su ile yıkanan kadmiyum granülleri, 5 mM CuSO₄ içerisinde iki dakika bekletildikten sonra glisin-NaOH tamponu ile 3 defa yıkandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.

Doku homojenatlarının hazırlanması:

Numaralandırılmış tüplere aktarılan dokuların üzerine %10 (w/v) oranında 50 mM'lık fosfat tamponu (pH: 7.4) pipetlendi ve homojenizatör ile buz üzerinde yaklaşık 1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen dokular +4°C'de 20 dk boyunca 4000 x g'de santrifüj edildi ve süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Tablo 3.3. NO analiz prosedürü.

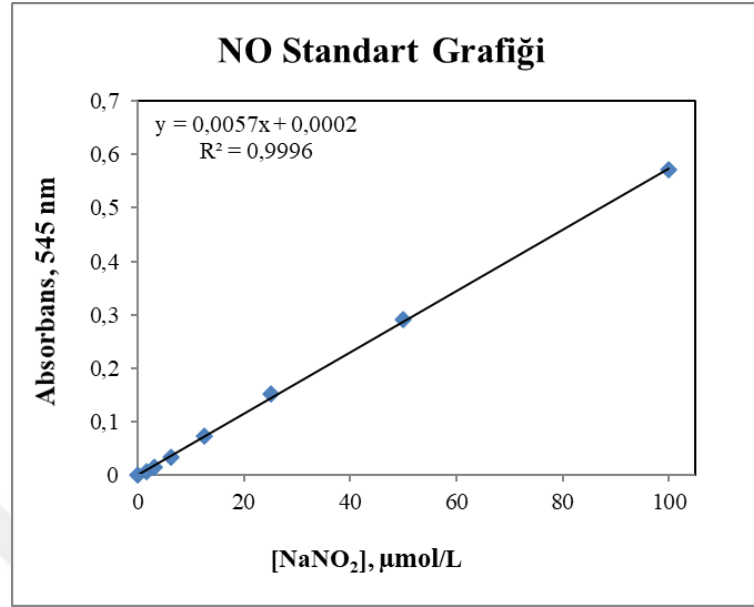
	Deney	Kör	Standart
0.05 M fosfat tamponu	-	0.25 ml	-
Süpernatant	0.25 ml	-	-
55 mM NaOH	1.25 ml	1.25 ml	-
75 mM ZnSO₄	1 ml	1 ml	-
10 dakika beklendikten sonra, 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve ikinci süpernatant numune olarak kullanıldı.			
Glisin-NaOH tamponu	1 ml	1 ml	1 ml
İkinci süpernatant/standart	1 ml	1 ml	1 ml
Distile Su	2 ml	2 ml	2 ml
Kadmiyum Granülleri	Eklendi	Eklendi	-
Oda sıcaklığında 90 dakika inkübübe edildi.			
Süpernatant	2 ml	2 ml	2 ml
Distile Su	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sülfanilamid	1 ml	1 ml	1 ml
N-naftiletilediamin	1 ml	1 ml	1 ml
60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 545 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.			

Deney protokolü:

Hazırlanan homojenatlar santrifüj edildikten sonra süpernatantlar ölçüm için kullanıldı. Deneyin ilk aşamasını deproteinizasyon aşaması oluşturmaktadır. Deproteinizasyon için kör tüpe, 0.25 ml tampon üzerine, 1.25 ml 55 mM'lık NaOH ve 1 ml 75 mM ZnSO₄ pipetlendi; örnek tüplere ise 0.25 ml ilk süpernatanttan pipetlenip 1.25 ml 55 mM'lık NaOH ve 1 ml 75 mM ZnSO₄ eklendi; standartlar için deproteinizasyon işlemleri uygulanmadı. Pipetleme işleminden 10 dakika sonra, kör ve örnek tüpler, 3500 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen ikinci süpernatant bir sonraki aşama için kullanıldı. Bu aşamada örnek ve kör tüp için süpernatantlardan, standartlar için ise hazırlanan standart çözeltilerinden 1 ml alınıp üzerine 2 ml distile su ve 1 ml glisin tamponu pipetlendi. Çözeltiler vortekslendikten sonra, örnek ve kör tüplerinin her birine birer adet olacak şekilde bakır kaplı (aktive) kadmiyumlar eklendi. Standart tüplerine aktive kadmiyumlar eklenmedi. 90 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda standart, kör ve örneklerden 2 ml alındı ve üzerlerine 1 ml N-Naftiletildiamin ve Sülfanilamid pipetlendikten sonra distile su ile 4.5 ml'ye tamamlandı. 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan numuneler daha sonra küvetler içerisine aktarılıp 545 nm'de spektrofotometrik olarak okundu (Tablo 3.3.).

Doku NO düzeylerinin hesaplanması:

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için standart çözelti olarak 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µmol/L'lik konsantrasyonlarında NaNO₂ hazırlandı. Aynı bütün standart tüpleri içerisine pipetlendi. Tablodaki gibi kör ve örnek tüplere uygulanan aşamalar uygulandı. Elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.2.). Örneklerin konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpıldı. Daha sonra her bir dokuya ait olan homojenatlar kullanılarak total protein konsantrasyonları hesaplandı. Örneklerin konsantrasyonu total protein konsantrasyonlarına oranlandı ve NO sonuçları µmol/mg protein olarak verildi.



Şekil 3.2. NO standart grafiği.

3.5.2.5. Bağırsak dokusunda Western Blot yöntemi ile iNOS ve β-aktin analizi

Bağırsak dokusu iNOS ve β-aktin proteinlerine ait Western Blot analizi için dokular çalışma anına kadar -80°C’de bekletildi. Çalışma için toplamda 5 adet ependorf tüpü hazırlandı ve her bir grup (Kontrol, İBH, BA, PB ve KOM) için kodlandı.

Ependorf tüplerinde, her bir grup için seçilen 5 adet hayvanın doku örnekleri aktarılarak bir havuz oluşturuldu. Tüpler içerisinde 570 µl Radyoimmunopresipitasyon (RIPA) tamponu ve her birinden 10 µl olacak şekilde sırasıyla dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş fenilmetilsülfonil florür (FMSF), DMSO’da çözülmüş proteaz inhibitör karışımı ve sodyum ortovanadat eklendi. Örnekler 3 dakika boyunca homojenize edildikten sonra +4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Falcon tüpü içerisinde her bir örnek için 199 µl Qubit protein tamponu ve 1 µl Qubit protein reaktifi olacak şekilde stok hazırlandı. Bu stoktan 198 µl süpernatantlardan ise 2 µl pipetlenerek total protein ölçümü yapıldı ve her bir örnek süpernatant 50 µg/µl protein içerecek şekilde gerekli hesaplamalara tabi tutuldu.

Protein ölçümünden sonra denatürasyon işlemi için şu aşamalar uygulandı: Her bir süpernatanttan pipetlenmesi gereken miktar hesaplandıktan sonra 8’li strip tüplere aktarıldı. Her bir gruba 5 µl lityum dodesil sülfat (LDS) örnek tamponu ve 2 µl

indirgeyici ajan eklenip son hacimleri saf su ile 20 µl'ye tamamlandı. 8'li strip içerisinde hazırlanan çözeltiler 10 dakika boyunca 70°C'de inkübe edildi.

İnkübasyondan çıkan örnekler hem iNOS hem de β-aktin ölçümelerini gerçekleştirmek için 2 farklı poliakrilamid (%4-%12) jel üzerindeki kuyucuklara, her grup için 10 µl olacak şekilde pipetlendi. İlk kuyucuklarda standart diğer kuyucuklarda numuneler olacak şekilde örnekler yarım saat boyunca 200 V'da yürütüldü. Yarım saat sonra jeller, iBlot TM 2 cihazına alındıktan sonra yürütülen proteinlerin membrana aktarımı gerçekleştirildi. Daha sonra membranlar sığır serum albümini (BSA) içeren bloklama solüsyonu içinde bekletildi. iBind Flex cihazına yerleştirilen 2 ayrı membran; biri iNOS diğeri β-aktin için ayarlandı ve iki buçuk saat boyunca antikor ile muamele edildi. Biri iNOS diğeri β-aktin olmak üzere membran üzerine aktarılan bantların görüntülenmesi için 1 ml Luminol-Enhancer solüsyonu ve 1 ml peroksit solüsyonu ile 5 dakika boyunca muamele edildikten sonra her iki membran için de görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

Oluşan bantların yoğunluklarının sayısal veriye dönüştürülmesi için ImageJ programı kullanıldı. Sonuçlar iNOS proteinlerinin göreceli ekspresyonu olarak verildi.

3.5.3. Oksidatif stres biyobelirteci ve antioksidan enzim aktivitesi analizleri

3.5.3.1. Bağırsak dokusunda MDA düzeylerinin analiz edilmesi

Ölçüm prensibi:

MDA ölçümü için Ohkawa ve diğerlerinin (1979), kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntem lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehitin tiyobarbitürik asit (TBA) ile pH 3.5 ve 95°C'deki inkübasyonu ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır.

Ölçüm ve homojenizasyon sırasında kullanılan çözeltiler:

%1.15'lik KCl çözeltisi: 1.15 g KCl tartılıp distile su ile 100 ml tamamlandı.

%8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS): 8.1 g SDS tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

%20'lik Asetik asit (pH: 3.5): Bir miktar distile su içersine 20 ml asetik asit eklendi ve 90 ml'ye kadar distile su ile tamamlandı. Daha sonra NaOH ile pH 3.5'e ayarlanıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%0.8'lik Tiyobarbitürik Asit (pH: 5.5): 0.8 gr TBA tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra pH, NaOH ve HCl kullanılarak 5.5'a ayarlanıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

MDA analizi için doku homojenatının hazırlanması:

Dokular -80°C'deki derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri tek tek tartıldı. Tartılan her bir doku ayrı ayrı numaralandırılmış tüplere koyuldu. Homojenizasyonu yapılacak olan doku için %10 (w/v) olacak şekilde 0,15 M'lık KCl tüplere pipetlendi ve 15000 devir/dk hızla ortalama 1 dakika boyunca buz üzerinde homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar daha sonra +4°C'de 1500 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Deney protokolü:

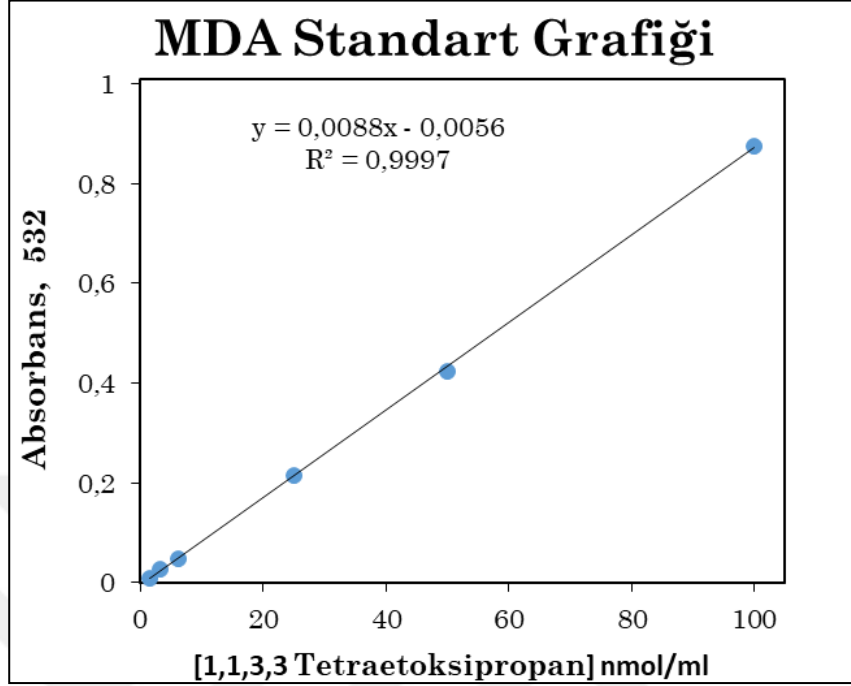
Kapaklı tüpler alınarak kör, standart ve örnek tüpler hazırlandı. Kör tüpüne 0.1 ml SDS, 0.75 ml asetik asit, 0.75 ml TBA, 0.4 ml distile su koyuldu; örnek tüplerine ise 0.2 ml süpernatant, 0.1 ml SDS, 0.75 ml asetik asit, 0.75 ml TBA ve 0.2 ml distile su koyuldu; standart tüplerine örnek tüplerine koyulan maddelerin aynısı koyuldu ancak süpernatant yerine hazırlanan standart çözeltiler eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve tüm tüpler 95°C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda tüm tüpler musluk suyu altında soğutuldu. Soğutulan tüpler daha sonra 4000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar küvetlere pipetlendi ve 532 nm'de köre karşı absorbans ölçümü yapıldı (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. MDA analizi prosedürü.

	Kör	Numune	Standart
Standart	-	-	0.2 ml
Süpernatant	-	0.2 ml	-
%8,1 SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
%20'lik Asetik asit	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml
%0,8'lik TBA	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml
Distile Su	0.4 ml	0.2 ml	0.2 ml
60 dakika boyunca 95°C'de inkübe edildi.			
4100 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir.			
Süpernatantlar küvetlere pipetlendi ve 532 nm'de köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.			

Doku MDA düzeylerinin hesaplanması:

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için standart çözelti olarak 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nmol/ml'lik konsantrasyonlarında 1,1,3,3 tetraetoksipropan hazırlandı. Ayrı ayrı bütün standart tüpleri içerisine koyuldu. Tablodaki gibi kör ve örnek tüplere uygulanan aşamalar uygulandı. Elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.3.). Örneklerin MDA konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve yine aynı örneklerin süpernatantları kullanılarak analiz edilen total protein konsantrasyonları ile oranlanıp, MDA için sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.



Şekil 3.3. MDA standart grafiği.

3.5.3.2. Bağırsak dokusunda katalaz aktivitesinin analizi

Ölçüm prensibi:

Doku katalaz aktivitesi; hidrojen peroksitin katalaz tarafından, su ve oksijene katalizlenme hızının, spektrofotometrik olarak 240 nm dalga boyundaki absorbans düşüşünün takip edilmesi esasına dayanır (Aebi, 1984). Bir ünite katalaz, pH 7.0'da dakikada 1 μmol H_2O_2 'yi katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır.

Ölçüm ve homojenizasyon sırasında kullanılan çözeltiler:

50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0): Hazır pelletler kullanılarak 50 mM'lık fosfat tamponu hazırlandı.

30 mM hidrojen peroksit: 340 μl %30'luk H_2O_2 , fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

%10'luk Triton X-100: 9 ml fosfat tamponu içerisine 1 ml stok Triton X-100 pipetlenerek hazırlandı.

Katalaz aktivite tayini için doku homojenatının hazırlanması:

Dokular -80°C 'deki derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri tek tek tartıldı. Tartılan her bir doku ayrı ayrı numaralandırılmış tüplere aktarıldı. Homojenizasyonu yapılacak olan doku için 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0) tüplere pipetlendi ve 15000 devir/dk hızla ortalama 1 dakika boyunca buz üzerinde homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar, hücre parçaları ve çekirdeğin uzaklaştırılması için $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 700 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Final konsantrasyonu 0.17 M olacak şekilde etanol eklendi ve örnekler 30 dakika boyunca soğuk su banyosunda inkübe edildi. 30 dakika sonrasında, %10'luk Triton X-100 den karışım içerisindeki final konsantrasyonu %1 olacak şekilde ilave edildi. Örnek karışımları 1/100 oranında soğuk fosfat tamponu ile seyreltilip ölçüm için kullanıldı.

Deney protokolü:

Küvet içerisine, aşağıdaki tabloda olduğu gibi kör için, 0,6 ml fosfat tamponu ve 0,3 ml H_2O_2 eklenip spektrofotometrede okutuldu. Daha sonra numunelerin katalaz aktivitesi analizi için 0,6 ml dilüe süpernatanttan kuvartz küvete pipetlendi ve reaksiyon 0,3 ml H_2O_2 pipetlenmesi ile başlatıldı ve 240 nm dalga boyundaki absorbans düşüşü takip edildi (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Katalaz aktivitesi analiz prosedürü.

	Kör Tüpü	Örnek Tüpleri
Dilüe Süpernatant	-	0,6 ml
Fosfat tamponu (pH 7.0)	0,6 ml	-
H_2O_2	0,3 ml	0,3 ml

Doku katalaz aktivitesinin hesaplanması:

Elde edilen süpernatantlardan ayrıca total protein ölçüldü ve katalaz spesifik aktivitesi U/mg protein olarak verildi. Katalaz aktivitesinin ünite olarak hesaplanabilmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Katalaz (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{dakika} \times V_{\text{total}}}{\epsilon \times V_{\text{örnek}}} \times \text{DF}$$

ϵ : H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon kat sayısı.

ΔA : Belli bir süre aralığındaki absorbans değişimi.

Vörnek: Küvetler içerisine pipetlenen örnek hacmi.

Vtotal: Küvetler içerisine pipetlenen toplam hacim.

DF: Dilüsyon faktörü.

3.5.3.3. *Bağırsak dokusunda GPx aktivitesinin analizi*

Ölçüm için GPx ölçüm kiti (Cayman Chemical, Cat No. 703102) kullanılmıştır.

Ölçüm prensibi:

Bu ölçümün prensibi, GSH'ın GPx enzimi aracılığı ile okside glutatyona okside edilmesi ve daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile GSSG yeniden GSH'a redüklenirken bu reaksiyonda harcanan NADPH miktarına dayanmaktadır. NADPH'daki azalma GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ölçüm ve homojenizasyon sırasında kullanılan çözeltiler:

50 mM pH 7.5 Tris-HCl Tamponu: 1.5142 g Tris, 0.3653 g EDTA ve 0.0386 g DTT (1,4-Ditiotreitol) tartılıp bir miktar distile su içerisinde çözüldü ve HCl ile pH 7.5'e ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlandı.

GPx Ölçüm Tamponu

GPx Numune Tamponu

GPx (Kontrol)

GPx Kosubstrat

GPx NADPH

GPx Kumen Hidroperoksit

Doku homojenatlarının hazırlanması:

Doku örnekleri tartıldıktan sonra tüpler içerisine, %10 (w/v) olacak şekilde 50 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponu pipetlendi ve homojenizatör ile buz üzerinde yaklaşık 1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenatlar, 15000 x g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Tablo 3.6. GPx aktivitesi analiz prosedürü.

	Kör	Pozitif Kontrol	Numune
GPx Ölçüm Tamponu	70 µl	50 µl	50 µl
GPx Kosubstrat	50 µl	50 µl	50 µl
GPx NADPH	50 µl	50 µl	50 µl
GPx (Kontrol)	-	20 µl	-
Numune	-	-	20 µl
GPx Kümen Hidroperoksit	20 µl	20 µl	20 µl

Deney protokolü:

Bu aşamada, çözeltiler doğrudan ölçüm küvetleri içerisine pipetlendi ve en son kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatıldı. Eklenen çözeltiler sırasıyla; kör için GPx ölçüm tamponundan 70 µl, pozitif kontrol ve numune için ise 50 µl; GPx kosubstrat 50 µl, GPx NADPH 50 µl, GPx kontrol 20 µl (sadece pozitif kontrole eklendi) ve numune küvetlerine ise 20 µl süpernatanttan eklendi. En son 20 µl GPx kümen hidroperoksit pipetlenmesi ile reaksiyon başlatıldı (Tablo 3.6.). Ortamdaki NADPH'ın azalması ile 340 nm dalga boyunda düşen absorbans değerleri, tüm örnekler ve pozitif kontrol için 5 dakika boyunca izlendi.

Doku GPx aktivitesinin hesaplanması:

Elde edilen süpernatantlardan ayrıca total protein ölçüldü ve GPx aktivitesi U/mg protein olarak verildi. GPx aktivitesinin ünite olarak hesaplanabilmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{GPx (U/ml)} = \frac{\Delta A / \text{dakika} \times V_{\text{total}}}{\epsilon \times V_{\text{örnek}}} \times \text{DF}$$

ϵ : NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki eksintikasyon kat sayısı.

ΔA : Belli bir süre aralığındaki absorbans değişimi.

$V_{\text{örnek}}$: Küvetler içerisine pipetlenen örnek hacmi.

V_{total} : Küvetler içerisine pipetlenen toplam hacim.

DF: Dilüsyon faktörü.

3.5.4. *Doku total protein ölçümü*

Ölçüm prensibi:

Doku homojenatlarında total protein düzeyi Gornall ve diğerleri (1949) tarafından bildirilen Biüret yönteme göre yapıldı.

Bu yöntemin prensibi, alkali koşullar altında bakır tuzlarının iki veya daha fazla peptit bağı içeren bileşiklerle mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan renkli kompleksin absorbanşı, spektrofotometrik olarak 545 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması:

Total protein ölçümü için, MDA, NO, MPO, GPx ve katalaz aktivitesi analizi için kullanılan homojenatlar kullanıldı.

Çözeltiler:

Biüret reaktif: 9 g Na-K tartarat 400 ml 0.2 N NaOH içinde çözüldükten sonra 3 g CuSO₄ ve 5 g KI eklenip son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı ve ölçüm için kullanıldı.

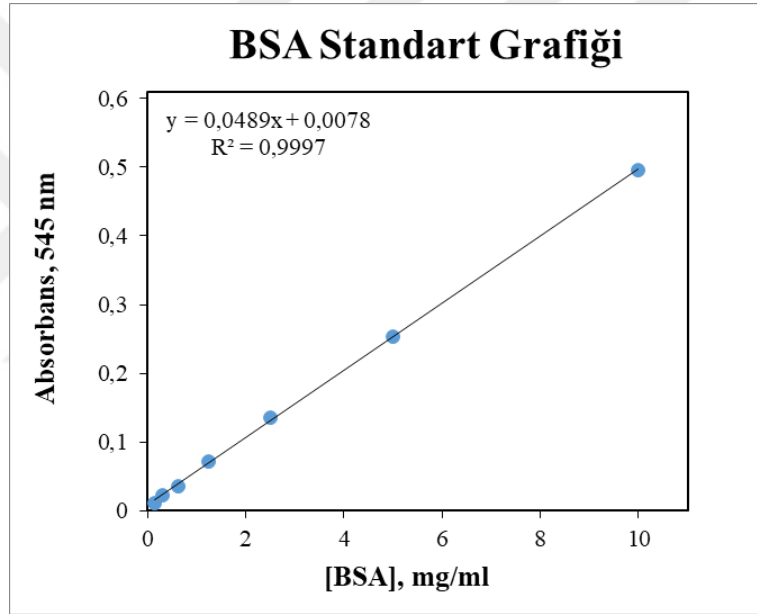
Deney Protokolü:

Kör tüp için 50 µl distile su, numune tüpleri için 50 µl süpernatant ve standart tüpleri için 50 µl farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerinden pipetlendi. Her bir tüp içerisine 1250 µl Biüret reaktif eklenerek 15 dakikalık inkübasyon süreci başlatıldı.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra spektrofotometrik olarak 545 nm’de her bir örnek ve standart için köre karşı okuma yapıldı.

Sonuçların Hesaplanması:

Örnek konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için standart çözelti olarak 0, 0.125, 0.25, 0.50, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albumini kullanıldı. Yukarıdaki prosedür uygulanıp ölçülen absorbans ve konsantrasyonlar Microsoft Office Excel programı kullanılarak bir standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.4.). Örneklerin Konsantrasyonu standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.4. Protein standart grafiği.

3.6. Bağırsak Dokularında Yapılan Histolojik İşlemler

Histolojik analizler için, 6. günün sonunda, anestezi altındaki sıçanların bağırsak dokuları çıkarılarak analiz gününe kadar karanlık ortamda %10’ luk formaldehid solüsyonunda muhafaza edildi. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70’lik, %80’lik, %90’lık ve %96’lık alkol serilerinde 45’er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20’şer dakika ksilolde bekletildi. Bağırsak örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C’de

eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılan mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra, etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve bağırsak doku örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekilerek skorlamaları yapıldı. Skorlamalar; 0: Hasar yok; 1: Az hasar; 2: Orta düzeyde hasar ve 3: Çok yüksek hasar olarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizlerinde, GraphPad Prism 7 kullanıldı. Shapiro-Wilk normalite testine göre normal dağılan belirteçlere One-Way ANOVA testi uygulanırken, normal dağılıma uymayan belirteçlere Kruskal-Wallis testi uygulandı. One-Way ANOVA testinde gruplar arasındaki farklar Tukey testine göre belirlenirken, Kruskal-Wallis testinde Dunn's testine göre belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama ($\pm$ standart sapma) ve medyan (%25-%75) olarak verildi. $P<0.05$ olan değerler için anlamlı, $p<0.01$ yüksek düzeyde anlamlı ve $p<0.001$ olan değerler için çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Rutin biyokimya ve tam kan sayımı bulguları

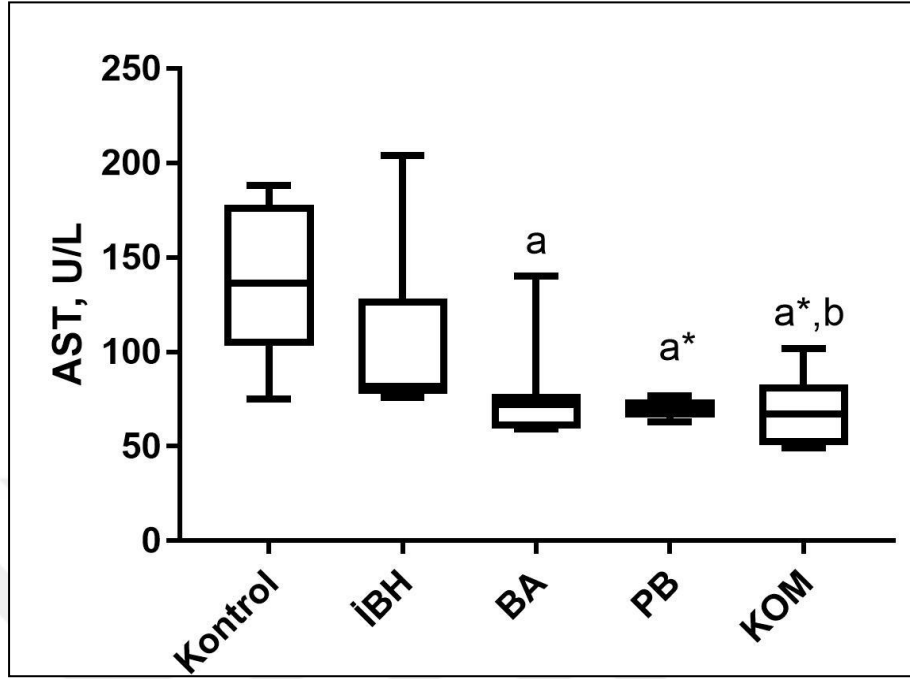
4.1.1.1. Serum AST aktiviteleri

AST aktivitesi incelendiğinde; Kontrol grubuna göre kıyaslanınca BA grubunda bir düşüş izlenmiş ve bu düşüş istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu ile tek tek PB ve KOM grupları karşılaştırıldığında, aktivitede istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($p<0.01$). Aynı zamanda KOM grubundaki azalışın İBH grubuna göre anlamlı düzeyde farklı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.1., Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Serum AST aktiviteleri.

Gruplar	N	AST (U/L) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	136.5 (103.5-178)
İBH	9	82 (78-128.5)
İBH + Borik Asit (BA)	9	72 (59.5-77.8) ^a
İBH + Probiyotik (PB)	9	71 (65-75) ^{a*}
İBH + Kombine (KOM)	9	67 (50.5-83) ^{a*,b}

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).



Şekil 4.1. Serum AST aktiviteleri.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).

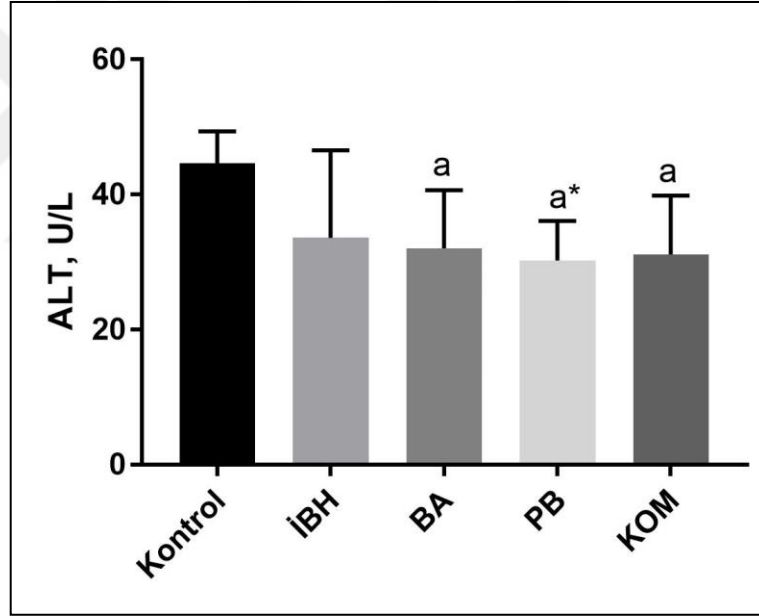
4.1.1.2. Serum ALT aktiviteleri

ALT aktivitesi incelendiğinde; BA ile KOM grupları tek tek Kontrol grubu ile karşılaştırılınca, aktivitede istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). PB grubu ile Kontrol grubu karşılaştırıldığında ise aktivitedeki azalma istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.2., Şekil 4.2.).

Tablo 4.2. Serum ALT aktiviteleri.

Gruplar	N	ALT (U/L) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	44.57 $\pm$ 4.74
İBH	9	33.56 $\pm$ 12.99
İBH + Borik Asit (BA)	9	32 $\pm$ 8.60 ^a
İBH + Probiyotik (PB)	9	30.22 $\pm$ 5.87 ^{a*}
İBH + Kombine (KOM)	9	31.13 $\pm$ 8.68 ^a

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).



Şekil 4.2. Serum ALT aktiviteleri.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).

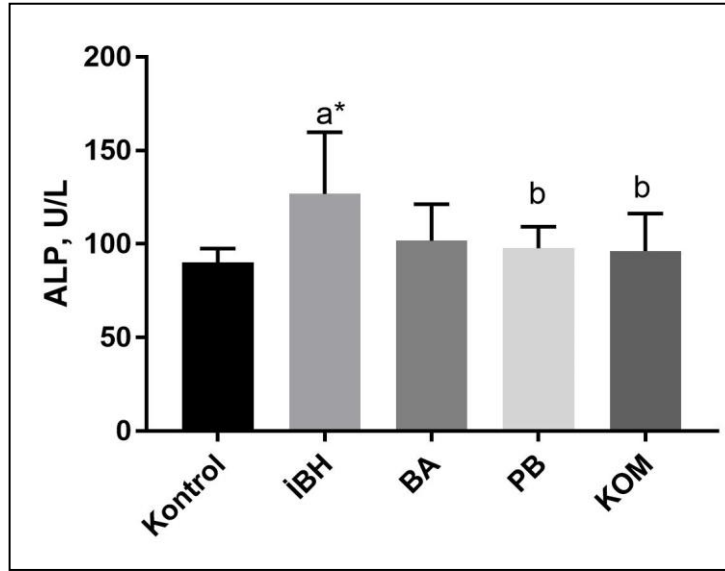
4.1.1.3. Serum ALP aktiviteleri

ALP aktivitesi incelendiğinde; Kontrol grubu ile karşılaştırılınca İBH grubunda istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı ($p<0.01$) bir artış gözlemlenmektedir. PB ve KOM grupları ile İBH grubu kıyaslandığında ise anlamlı bir düşüş bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).

Tablo 4.3. Serum ALP aktiviteleri.

Gruplar	N	ALP (U/L) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	90 $\pm$ 7.53
İBH	9	126.8 $\pm$ 33.04 ^{a*}
İBH + Borik Asit (BA)	9	101.8 $\pm$ 19.4
İBH + Probiyotik (PB)	9	97.78 $\pm$ 11.45 ^b
İBH + Kombine (KOM)	9	96.22 $\pm$ 20.09 ^b

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).



Şekil 4.3. Serum ALP aktiviteleri.

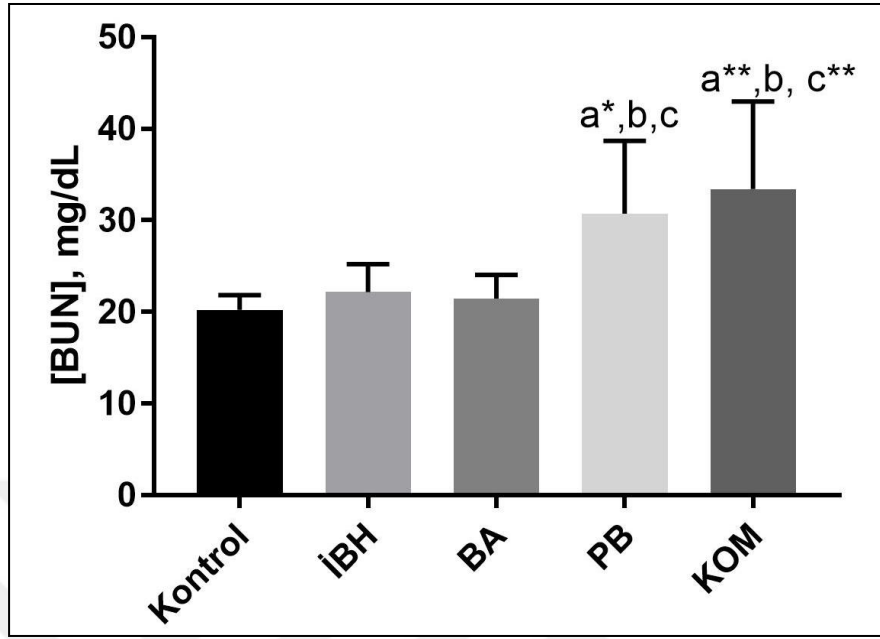
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).

4.1.1.4. Serum BUN düzeyleri

BUN düzeyleri için; PB grubu, İBH ve BA grupları ile kıyaslandığında sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunurken ($p<0.05$); Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.01$). KOM grubu ile İBH grubu karşılaştırıldığında ise BUN düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmektedir ($p<0.05$). Ayrıca, KOM grubu, Kontrol ve BA grubu ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).

Tablo 4.4. Serum BUN düzeyleri.

Gruplar	N	BUN (mg/dL) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	20.24 $\pm$ 1.60
İBH	9	22.18 $\pm$ 3.07
İBH + Borik Asit (BA)	9	21.47 $\pm$ 2.59
İBH + Probiyotik (PB)	9	30.71 $\pm$ 7.99 ^{a*,b,c}
İBH + Kombine (KOM)	9	33.43 $\pm$ 9.56 ^{a**,b,c**}
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). c: İBH + Borik Asit grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).		



Şekil 4.4. Serum BUN düzeyleri.

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). c: İBH + Borik Asit grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

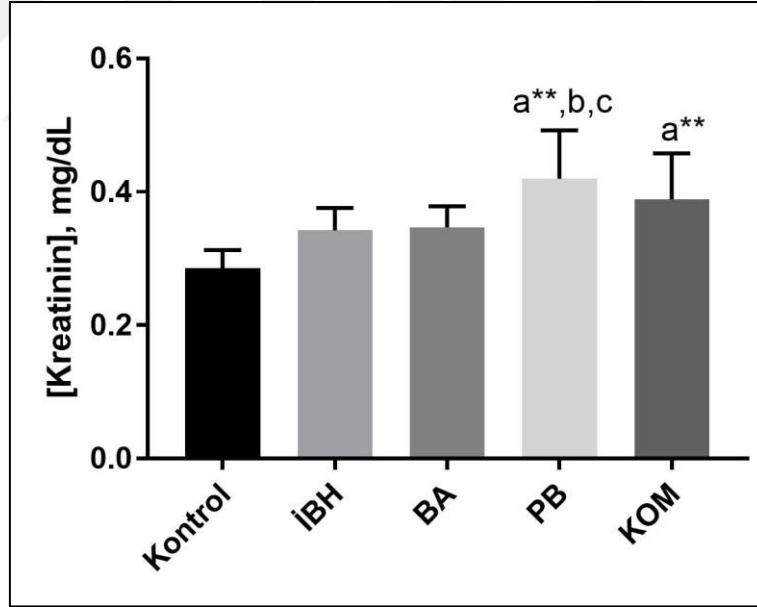
4.1.1.5. Serum kreatinin düzeyleri

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında PB ve KOM gruplarında kreatinin çok yüksek düzeyde anlamlı bir artışı mevcuttur ($p<0.001$). PB grubu ile İBH ve BA grupları karşılaştırıldığında ise yine istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.5., Şekil 4.5.).

Tablo 4.5. Serum kreatinin düzeyleri.

Gruplar	N	Kreatinin (mg/dL) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	0.29 $\pm$ 0.03
İBH	9	0.34 $\pm$ 0.03
İBH + Borik Asit (BA)	9	0.35 $\pm$ 0.03
İBH + Probiyotik (PB)	9	0.42 $\pm$ 0.07 ^{a**,b,c}
İBH + Kombine (KOM)	9	0.39 $\pm$ 0.07 ^{a**}

a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.001$).
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).
c: İBH + Borik Asit grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Serum kreatinin düzeyleri.

a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$). c: İBH + Borik Asit grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).

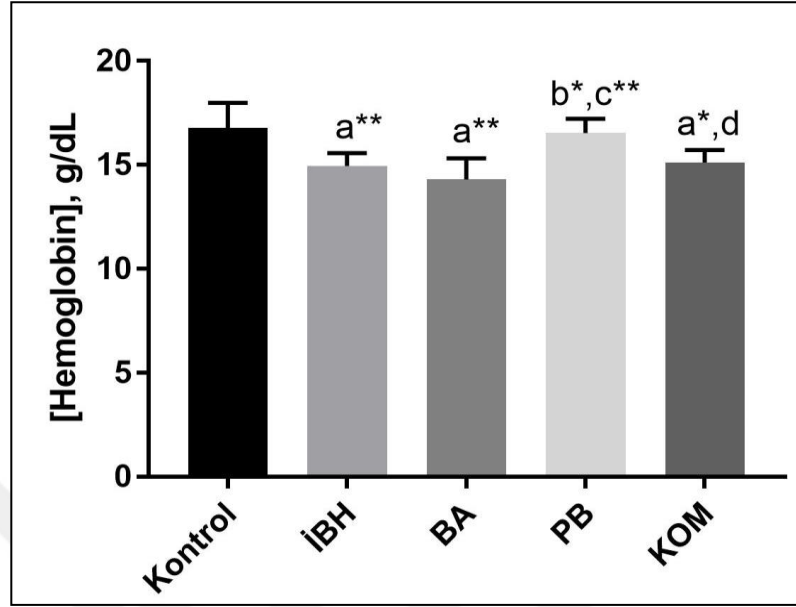
4.1.1.6. Kan hemoglobin düzeyleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KOM grubunda yüksek düzeyde anlamlı bir düşüş ($p<0.01$) görülürken, İBH ve BA gruplarında ise çok yüksek düzeyde anlamlı bir düşüş ($p<0.001$) görülmektedir. PB grubu ile İBH grubu kıyaslandığında yüksek düzeyde anlamlı bir artış izlenmekte ($p<0.01$), yine PB grubu ile BA grubu karşılaştırıldığında ise çok yüksek düzeyde anlamlı bir artışın olduğu görülmektedir ($p<0.001$). KOM grubundaki azalış ise PB grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kaydedilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.6., Şekil 4.6.).

Tablo 4.6. Kan hemoglobin düzeyleri.

Gruplar	N	Hemoglobin (g/dL) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	16.76 $\pm$ 1.23
İBH	9	14.94 $\pm$ 0.61 ^{a**}
İBH + Borik Asit (BA)	9	14.29 $\pm$ 1.02 ^{a**}
İBH + Probiyotik (PB)	9	16.52 $\pm$ 0.68 ^{b*,c**}
İBH + Kombine (KOM)	9	15.1 $\pm$ 0.61 ^{a*,d}

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).
b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).
d: İBH + Probiyotik grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Kan hemoglobin düzeyleri.

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). d: İBH + Probiyotik grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).

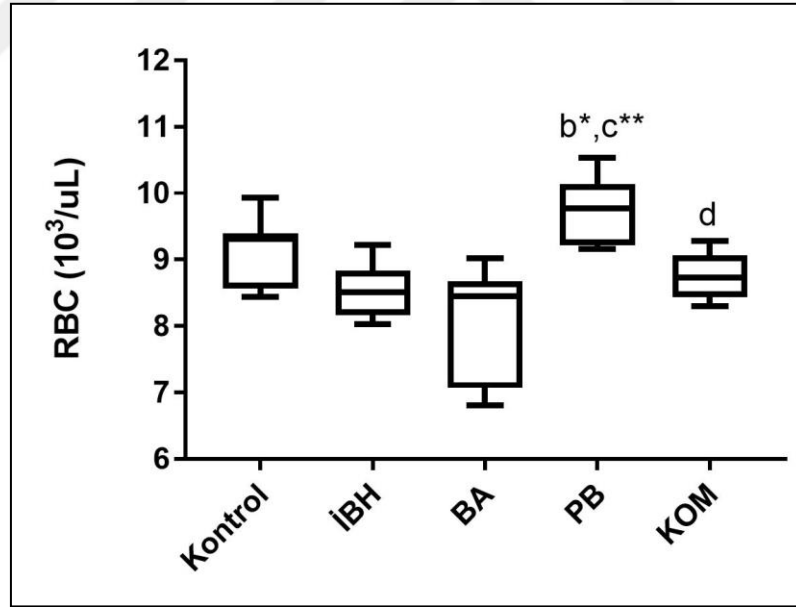
4.1.1.7. Kırmızı kan hücresi (RBC) sayısı

Kırmızı kan hücresi sayımında; İBH grubu ile PB grubu karşılaştırıldığında yüksek düzeyde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$). BA grubu ile PB grubu karşılaştırıldığında ise çok yüksek düzeyde anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0.001$). Buna karşılık KOM grubu ile PB grubu kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azalışın olduğu görülmektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.7., Şekil 4.7.).

Tablo 4.7. Kırmızı kan hücresi sayımı.

Gruplar	N	RBC ($10^3/\mu\text{L}$) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	9.31 (8.56-9.39)
İBH	9	8.51 (8.16-8.84)
İBH + Borik Asit (BA)	9	8.45 (7.07-8.67)
İBH + Probiyotik (PB)	9	9.77 (9.21-10.14) ^{b*,c**}
İBH + Kombine (KOM)	9	8.73 (8.44-9.07) ^d

b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).
d: İBH + Probiyotik grubu arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).



Şekil 4.7. Kırmızı kan hücresi sayımı.

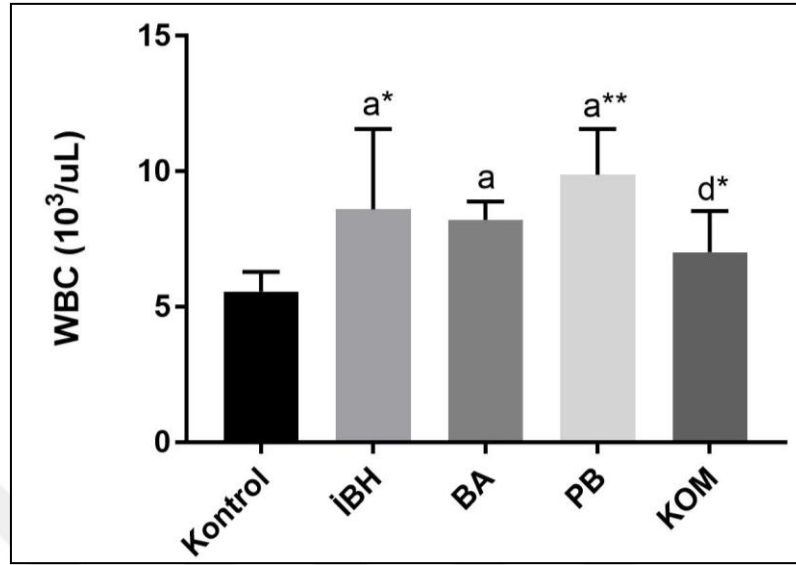
b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). c**: İBH + Borik Asit grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). d: İBH + Probiyotik grubu arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).

4.1.1.8. Beyaz kan hücresi (WBC) sayımı

Kontrol grubunun, BA grubu ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış görülürken ($p<0.05$); İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı artış ($p<0.01$) ve PB grubu ile de arasında çok yüksek düzeyde anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0.001$). Ayrıca KOM grubundaki düşüş PB grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan yüksek düzeyde farklıdır ($p<0.01$) (Tablo 4.8., Şekil 4.8.).

Tablo 4.8. Kandaki beyaz kan hücresi sayısı.

Gruplar	N	WBC ($10^3/uL$) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	5.56 $\pm$ 0.73
İBH	9	8.59 $\pm$ 2.96 ^{a*}
İBH + Borik Asit (BA)	9	8.21 $\pm$ 0.67 ^a
İBH + Probiyotik (PB)	9	9.87 $\pm$ 1.69 ^{a**}
İBH + Kombine (KOM)	9	7.01 $\pm$ 1.51 ^{d*}
a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). d*: İBH + Probiyotik grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).		



Şekil 4.8. Beyaz kan hücresi sayısı.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.001$). d*: İBH + Probiyotik grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).

4.1.1.9. Kandaki nötrofil sayısı

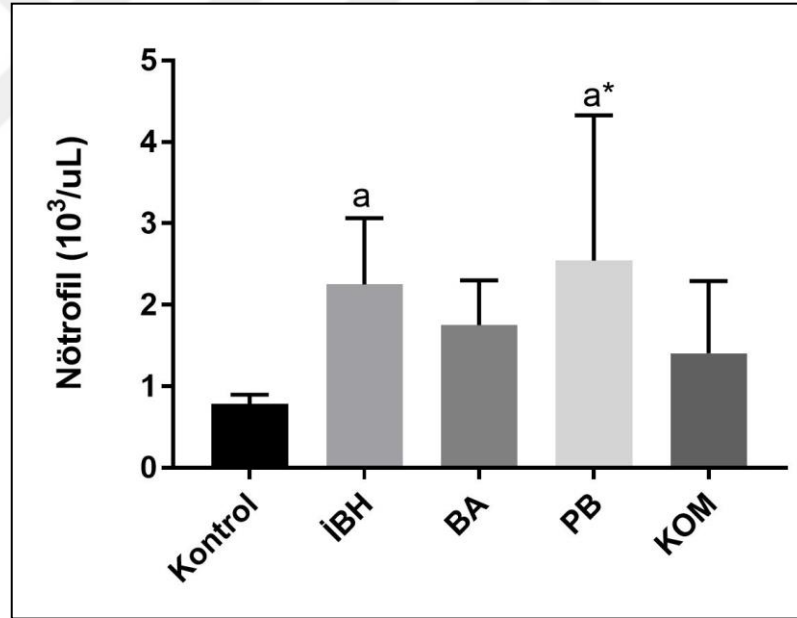
İBH grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nötrofil sayısındaki artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna karşılık PB grubu Kontrol grubu ile kıyaslandığında, artışın yüksek düzeyde anlamlı bir farklılığa sahip olduğu görülmektedir ($p < 0.01$) (Tablo 4.9, Şekil 4.9).

Tablo 4.9. Kandaki nötrofil sayısı.

Gruplar	N	Nötrofil ($10^3/\mu\text{L}$) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	0.79 ± 0.11
İBH	9	2.25 ± 0.81^a
İBH + Borik Asit (BA)	9	1.75 ± 0.55
İBH + Probiyotik (PB)	9	$2.55 \pm 1.78^{a*}$
İBH + Kombine (KOM)	9	1.41 ± 0.89

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).



Şekil 4.9. Kandaki nötrofil sayısı.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).

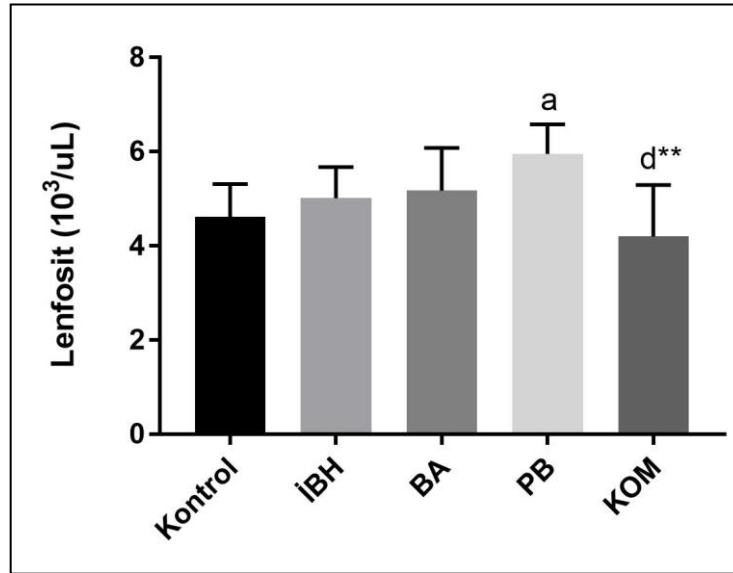
4.1.1.10. Kandaki lenfosit sayısı

PB grubu ile Kontrol grubu karşılaştırıldığında lenfosit sayısında anlamlı düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($p<0.05$). KOM grubu ile PB grubu kıyaslandığında ise istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı bir azalış kaydedilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 4.10., Şekil 4.10.).

Tablo 4.10. Kandaki lenfosit sayısı.

Gruplar	N	Lenfosit ($10^3/\mu\text{L}$) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	4.62 $\pm$ 0.70
İBH	9	5.00 $\pm$ 0.66
İBH + Borik Asit (BA)	9	5.17 $\pm$ 0.91
İBH + Probiyotik (PB)	9	5.95 $\pm$ 0.62 ^a
İBH + Kombine (KOM)	9	4.19 $\pm$ 1.09 ^{d**}

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).
d**: İBH + Probiyotik grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).



Şekil 4.10. Kandaki lenfosit sayısı.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). d**: İBH + Probiyotik grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

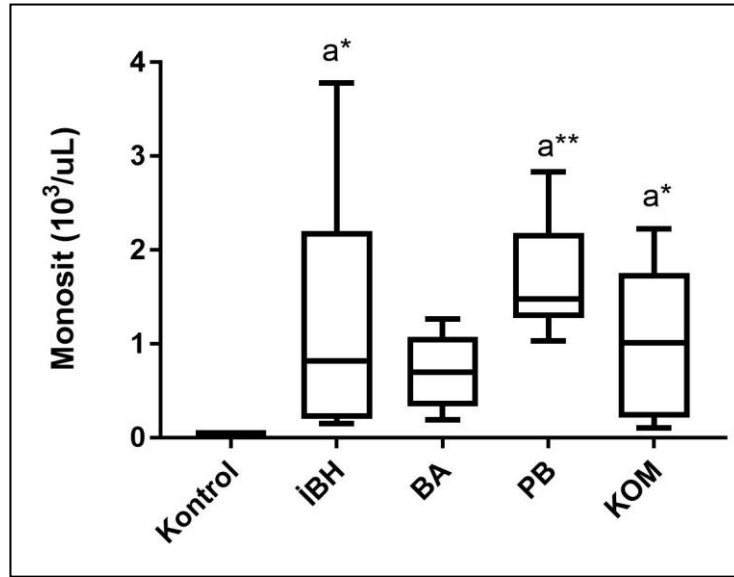
4.1.1.11. Kandaki monosit sayısı

Kontrol grubu ile İBH ve KOM grupları tek tek karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0.01$). Bununla birlikte Kontrol grubu ile kıyaslandığında PB grubundaki artışın çok yüksek düzeyde anlamlı olduğu kaydedilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 4.11., Şekil 4.11.).

Tablo 4.11. Kandaki monosit sayısı.

Gruplar	N	Monosit ($10^3/\mu\text{L}$) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	0.03 (0.02-0.045)
İBH	9	0.82 (0.2-2.2) ^{a*}
İBH + Borik Asit (BA)	9	0.7 (0.34-1.08)
İBH + Probiyotik (PB)	9	1.48 (1.28-2.18) ^{a**}
İBH + Kombine (KOM)	9	1.01 (0.22-1.76) ^{a*}

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).
a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).



Şekil 4.11. Kandaki monosit sayısı.

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

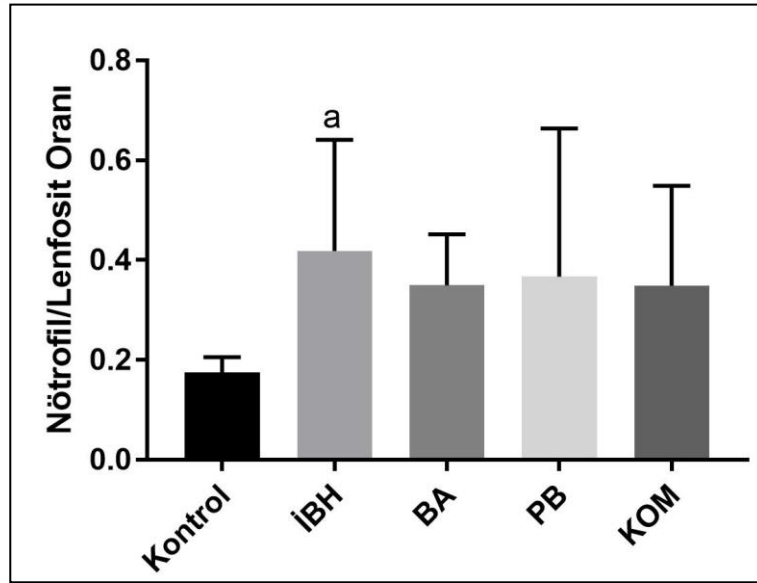
4.1.1.12. Nötrofil/Lenfosit Oranı

Nötrofil/Lenfosit oranı için Kontrol grubu ile İBH grubu kıyaslandığında artışın istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturduğu görülmektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.12., Şekil 4.12.).

Tablo 4.12. Nötrofil/Lenfosit oranı.

Gruplar	N	Nötrofil/Lenfosit Oranı (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	0.18 $\pm$ 0.05
İBH	9	0.47 $\pm$ 0.20 ^a
İBH + Borik Asit (BA)	9	0.34 $\pm$ 0.12
İBH + Probiyotik (PB)	9	0.43 $\pm$ 0.31
İBH + Kombine (KOM)	9	0.34 $\pm$ 0.19

a: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).



Şekil 4.12. Nötrofil/Lenfosit oranı.

a: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).

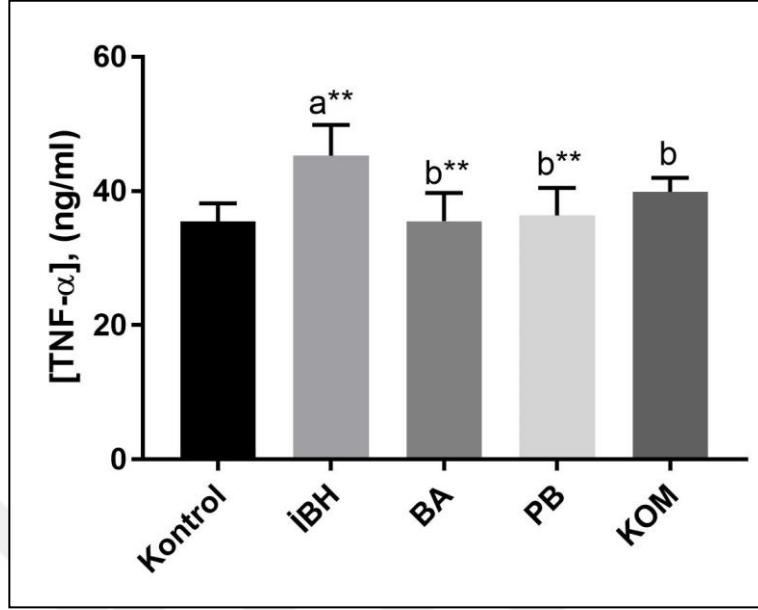
4.1.2. İnflamatuar süreçlerle ilgili bulgular

4.1.2.1. Serum TNF- α düzeyleri

İBH grubu, Kontrol grubu ile kıyaslandığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0.001$). KOM grubundaki azalma İBH grubu ile karşılaştırılınca istatistiksel açıdan bir anlam ifade ederken ($p<0.05$); BA ve PB gruplarındaki azalma İBH grubu ile karşılaştırılınca çok yüksek düzeyde bir anlam ifade etmektedir ($p<0.001$) (Tablo 4.13., Şekil 4.13.).

Tablo 4.13. Serum TNF- α düzeyleri.

Gruplar	N	TNF- α (ng/mL) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	35.50 $\pm$ 2.70
İBH	9	45.29 $\pm$ 4.57 ^{a**}
İBH + Borik Asit (BA)	9	35.51 $\pm$ 4.20 ^{b**}
İBH + Probiyotik (PB)	9	36.38 $\pm$ 4.12 ^{b**}
İBH + Kombine (KOM)	9	39.9 $\pm$ 2.06 ^b
a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).		
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).		
b**: İBH grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).		



Şekil 4.13. Serum TNF- α düzeyleri.

a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). b**: İBH grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

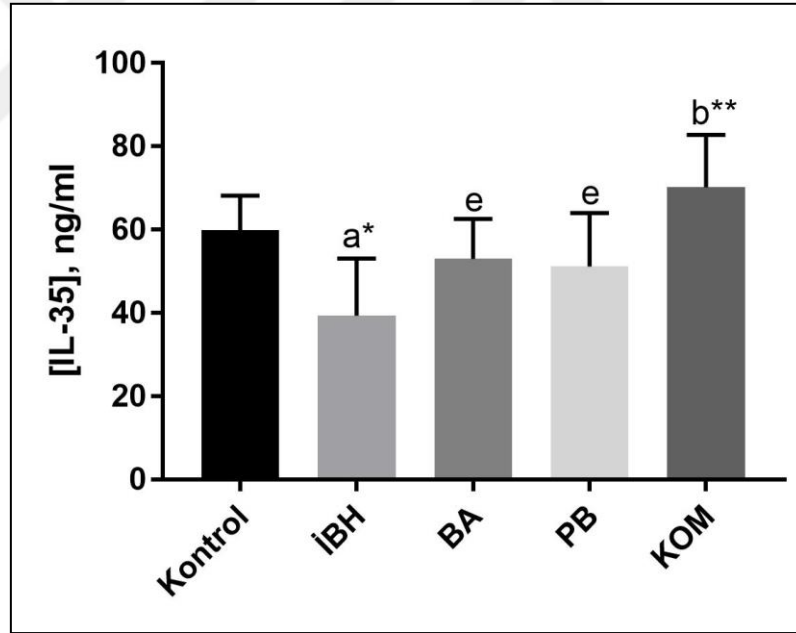
4.1.2.2. Serum IL-35 düzeyleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İBH grubundaki IL-35 seviyeleri yüksek düzeyde anlamlı farklılık oluşturacak kadar düşmüştür ($p<0.01$). Bununla birlikte BA ve PB gruplarındaki azalma KOM grubu ile kıyasladığında istatistiksel açıdan anlam ifade etmektedir ($p<0.05$). Ayrıca KOM grubundaki yükseklik İBH grubu ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde bir anlam ifade etmektedir ($p<0.001$) (Tablo 4.14., Şekil 4.14.).

Tablo 4.14. Serum IL-35 düzeyleri.

Gruplar	N	IL-35 (ng/mL) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	59.80 $\pm$ 8.36
İBH	9	39.27 $\pm$ 13.78 ^{a*}
İBH + Borik Asit (BA)	9	52.99 $\pm$ 9.59 ^e
İBH + Probiyotik (PB)	9	51.11 $\pm$ 12.82 ^e
İBH + Kombine (KOM)	9	70.09 $\pm$ 12.62 ^{b**}

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık (p<0.01).
b**: İBH grubu ile arasından çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık (p<0.001).
e: İBH + Kombine grubu ile arasında anlamlı farklılık (p<0.05).



Şekil 4.14. Serum IL-35 düzeyleri.

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık (p<0.01). b**: İBH grubu ile arasından çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık (p<0.001). e: İBH + Kombine grubu ile arasında anlamlı farklılık (p<0.05).

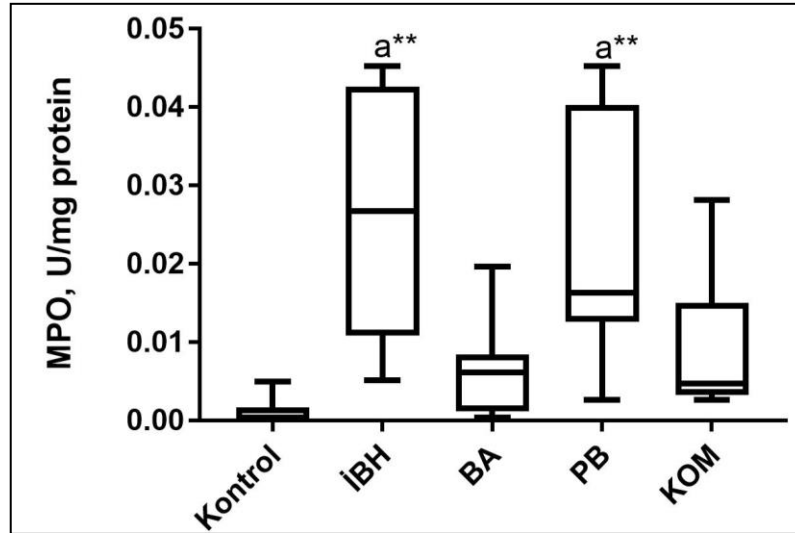
4.1.2.3. Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri

Yapılan istatistiksel analizlere göre; İBH ve PB grupları tek tek Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, iki grubun da çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark oluşturacak şekilde arttığı görülmektedir ($p<0.001$) (Tablo 4.15., Şekil 4.15.).

Tablo 4.15. Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri.

Gruplar	N	MPO (U/mg protein) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	0 (0-0.0017)
İBH	9	0.0267 (0.1080-0.0426) ^{a**}
İBH + Borik Asit (BA)	9	0.0061 (0.0012-0.0084)
İBH + Probiyotik (PB)	9	0.0163 (0.0126-0.0403) ^{a**}
İBH + Kombine (KOM)	9	0.0047 (0.0033-0.0150)

a** : Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).



Şekil 4.15. Bağırsak dokusu MPO aktiviteleri.

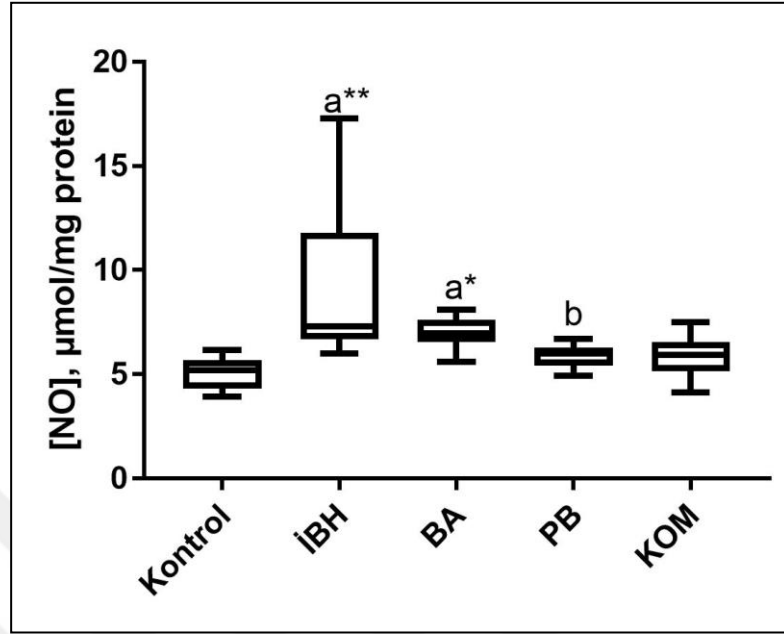
a** : Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

4.1.2.4. Bağırsak dokusu NO düzeyleri

İstatistiksel analizlere göre; İBH grubu, Kontrol grubu ile kıyaslandığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir farklılığa sebep olan bir artış görülmektedir ($p<0.001$). Yine, BA grubundaki artış Kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek düzeyde anlamlı bir fark göstermektedir ($p<0.01$). Bununla birlikte PB grubundaki azalma İBH grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.16., Şekil 4.16.).

Tablo 4.16. Bağırsak dokusu NO düzeyleri.

Gruplar	N	NO ($\mu\text{mol/mg protein}$) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	5.19 (4.32-5.70)
İBH	9	7.31 (6.68-8.85) ^{a**}
İBH + Borik Asit (BA)	9	6.98 (6.55-7.61) ^{a*}
İBH + Probiyotik (PB)	9	5.99 (5.4-6.30) ^b
İBH + Kombine (KOM)	9	5.29 (5.16-6.56)
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).		
a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).		
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).		



Şekil 4.16. Bağırsak dokusu NO düzeyleri.

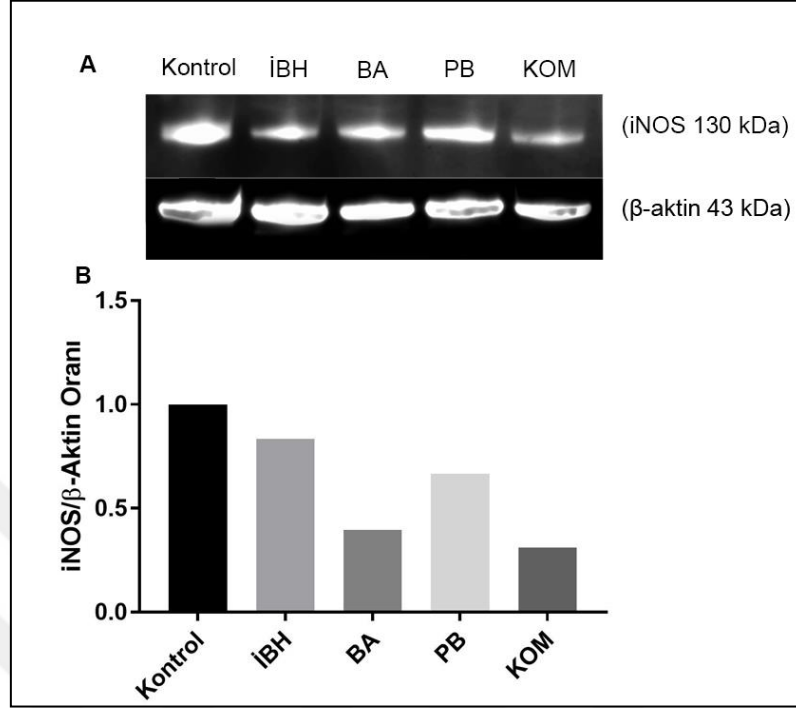
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).

4.1.2.5. Bağırsak dokusu iNOS'un göreceli protein ekspresyonu (iNOS/ β -aktin Oranı)

Bağırsak dokusunda Western Blot tekniği ile analizini yaptığımız iNOS'un göreceli protein ekspresyonu, BA ve KOM gruplarında önemli düzeyde düşüş gösterirken, PB grubunda daha az düzeylerde düşüş göstermektedir. iNOS/ β -aktin oranı en yüksek kontrol grubunda bulunmuştur (Tablo 4.17., Şekil 4.17.).

Tablo 4.17. Bağırsak dokusu iNOS/ β -aktin Oranı.

Gruplar	N	iNOS/ β -aktin Oranı
Kontrol	5	1
İBH	5	0,833847
İBH + Borik Asit (BA)	5	0,395881
İBH + Probiyotik (PB)	5	0,66517
İBH + Kombine (KOM)	5	0,311876



Şekil 4.17. iNOS ve β -aktin Western Blot analizi. A. Bağırsak dokusunda ölçülen iNOS'un Western Blot görüntüsü. B. iNOS'un göreceli protein ekspresyonu (iNOS/ β -aktin Oranı).

4.1.3. Oksidatif stres biyobelirteci ve antioksidan enzim aktivitesi bulguları

4.1.3.1. Bağırsak dokusu MDA düzeyleri

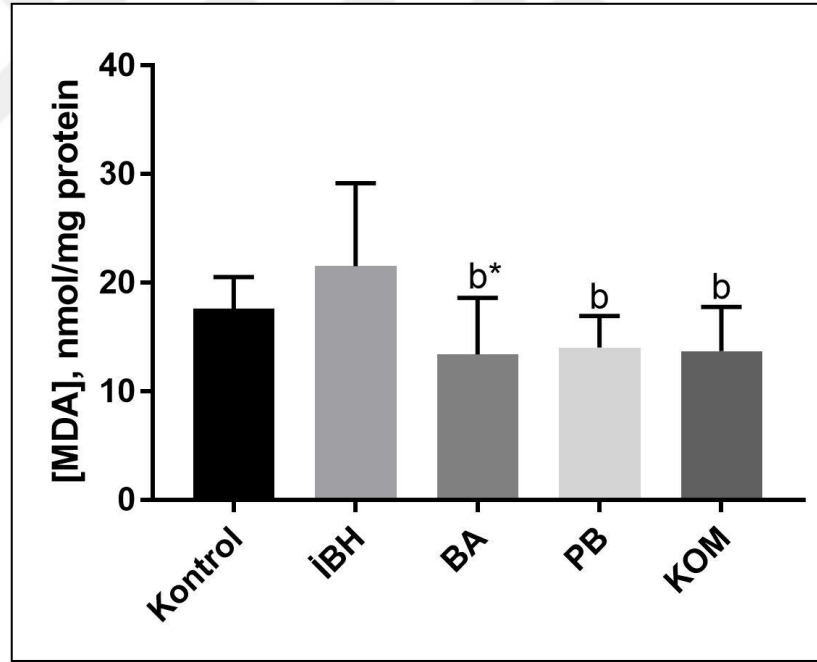
Çalışmamızda, İBH grubu Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde bir artış görülmektedir; ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. BA grubundaki düşüş İBH grubuna kıyasla yüksek düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0.01$); PB ve KOM gruplarındaki düşüş İBH grubu ile karşılaştırıldığında sadece anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.18., Şekil 4.18.).

Tablo 4.18. Bağırsak dokusu MDA seviyeleri.

Gruplar	N	MDA (nmol/mg protein) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	17.57 $\pm$ 2.96
İBH	9	21.51 $\pm$ 7.65
İBH + Borik Asit (BA)	9	13.37 $\pm$ 5.20 ^{b*}
İBH + Probiyotik (PB)	9	14.02 $\pm$ 2.89 ^b
İBH + Kombine (KOM)	9	13.68 $\pm$ 4.07 ^b

b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$).

b*: İBH grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).



Şekil 4.18. Bağırsak dokusu MDA düzeyleri.

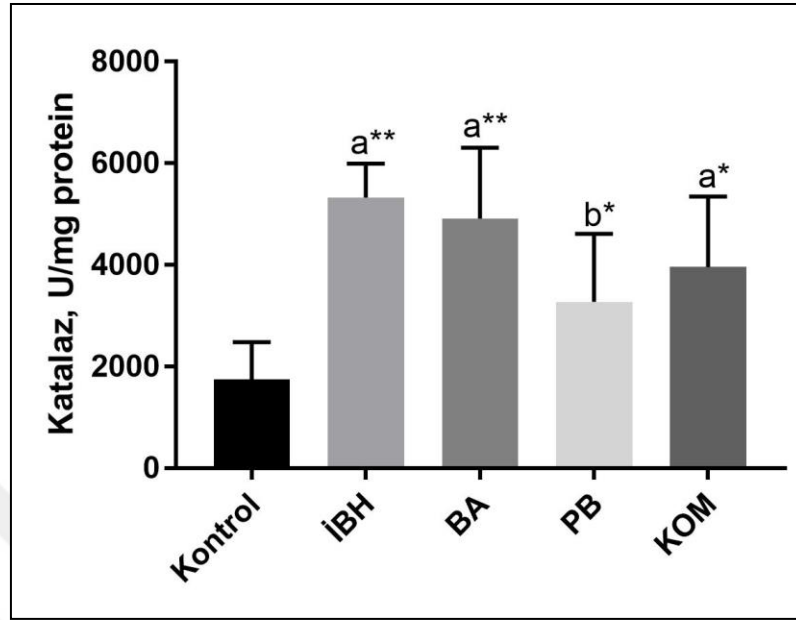
b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$). b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p < 0.01$).

4.1.3.2. Bağırsak dokusu katalaz aktiviteleri

İBH ve BA grupları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir farklılık oluşturan artış gözlenmektedir ($p<0.001$). Buna karşılık KOM grubundaki artış Kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek düzeyde anlamlı bir farklılık görülmektedir ($p<0.01$). PB grubundaki azalma İBH grubu ile karşılaştırıldığında ise yüksek düzeyde anlamlı bir farklılık gözlenmektedir ($p<0.01$) (Tablo 4.19., Şekil 4.19.).

Tablo 4.19. Bağırsak dokusu katalaz aktiviteleri.

Gruplar	N	Katalaz (U/mg protein) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	9	1774 $\pm$ 733.2
İBH	9	5322 $\pm$ 668.1 ^{a**}
İBH + Borik Asit (BA)	9	4911 $\pm$ 1392 ^{a**}
İBH + Probiyotik (PB)	9	3271 $\pm$ 1339 ^{b*}
İBH + Kombine (KOM)	9	3958 $\pm$ 1387 ^{a*}
a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).		



Şekil 4.19. Bağırsak dokusu Katalaz aktiviteleri.

a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). b*: İBH grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$).

4.1.3.3. Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri

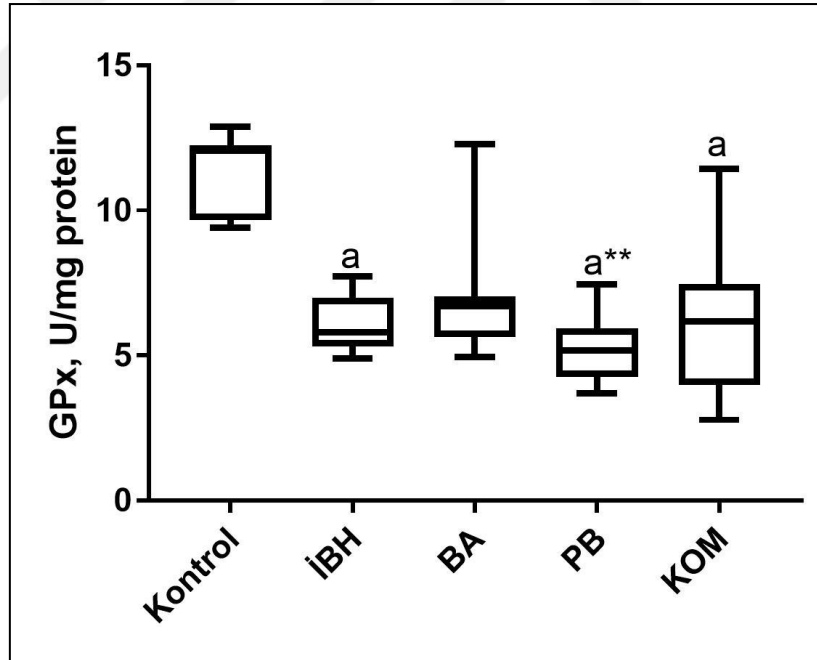
İstatistiksel analizlere göre; İBH ve PB grupları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p<0.05$). PB grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında düşüş çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.20., Şekil 4.20.).

Tablo 4.20. Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri.

Gruplar	N	GPx (U/mg protein) Medyan (%25-%75)
Kontrol	9	12.06 (9.68-12.25)
İBH	9	5.8 (5.33-6.99) ^a
İBH + Borik Asit (BA)	9	6.7 (5.64-7.05)
İBH + Probiyotik (PB)	9	5.18 (4.27-5.95) ^{a**}
İBH + Kombine (KOM)	9	6.18 (3.99-7.47) ^a

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$).

a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).



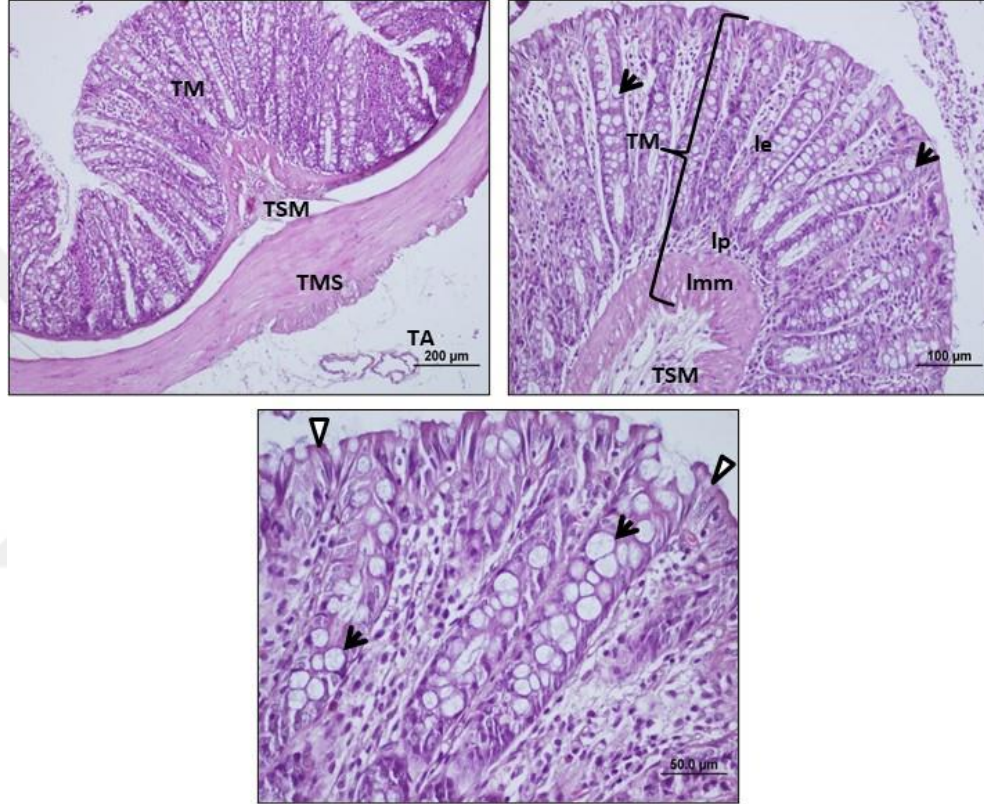
Şekil 4.20. Bağırsak dokusu GPx aktiviteleri.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. Bağırsak dokusu Hematoksilen-Eosin incelemeleri

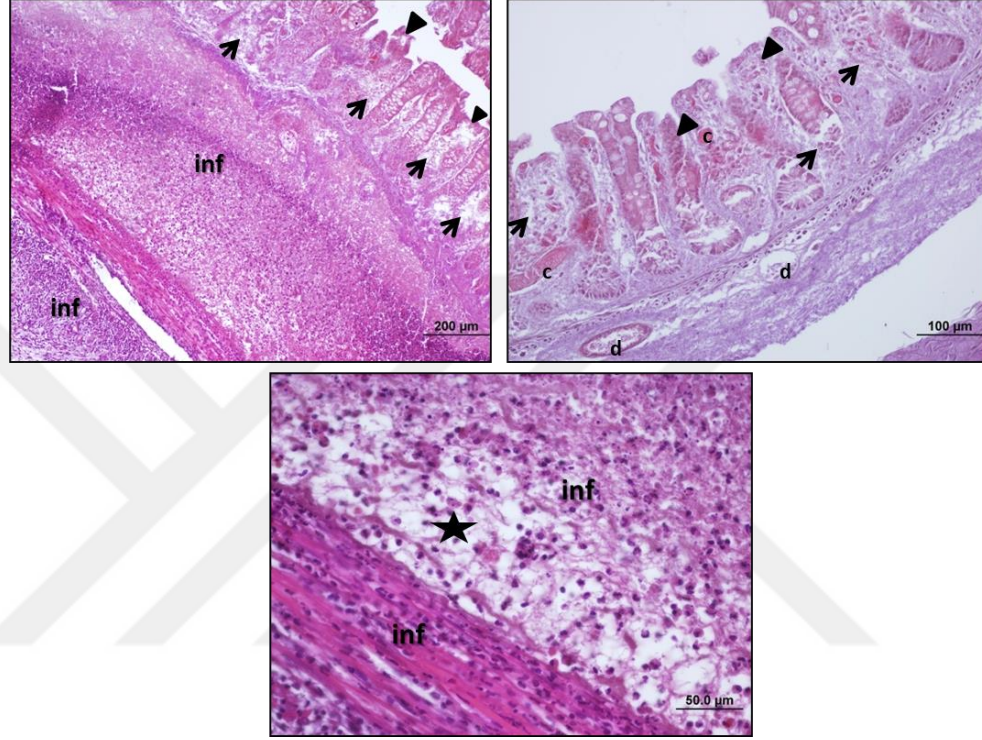
Kontrol grubuna ait bağırsak dokusu kesitlerinin incelenmesinde histolojik yapının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Kontrol grubuna ait histolojik görüntü.

Deney hayvanlarının kalın bağırsaklarının tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epitel yapısındaki (▷) ve goblet hücrelerinden zengin (→) lamina epitelyalisi (le), lamina propriası (lp) ve lamina muskularis mukoza (lmm) tabakalarını içeren tunika mukoza tabakası (TM) ({}), submukoza (TSM), muskular tabaka (TMS) ve tunika adventisya/seroza (TA) tabakaları normal morfolojik yapıda gözlemlendi.

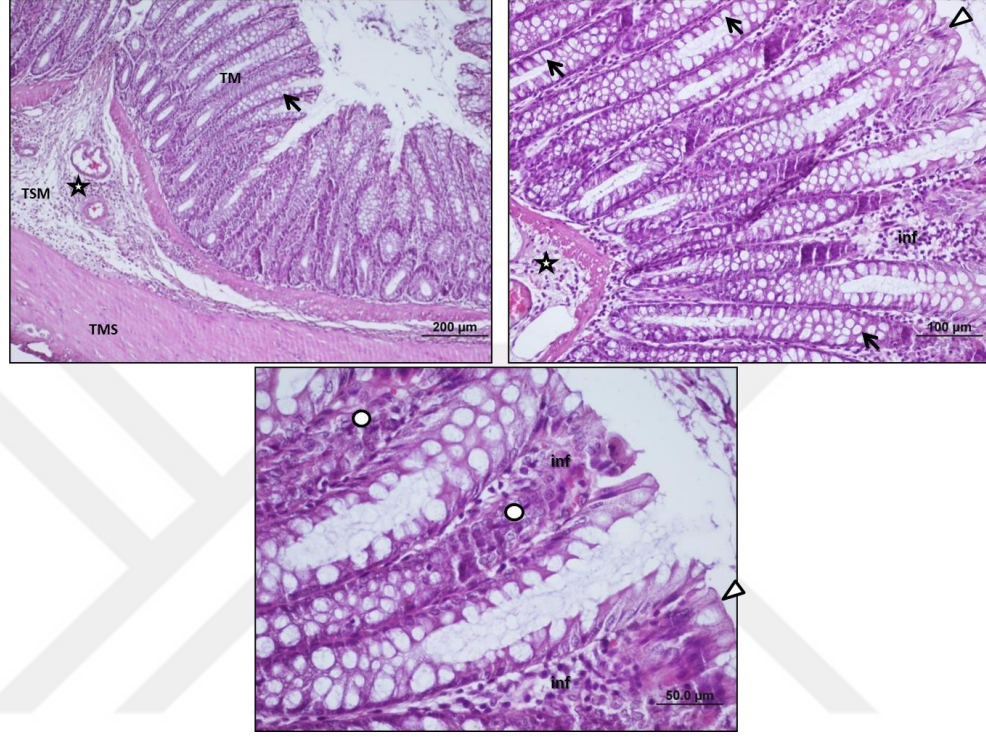
İBH grubuna ait bağırsak dokusu kesitlerinin incelenmesinde yoğun inflamasyon ve hasar gözlendi (Şekil 4.22.)



Şekil 4.22. İBH grubuna ait histolojik görüntü.

Sıçan kalın bağırsak (kolon) mukozasında yoğun hasar (►), goblet hücre kaybı, lamina propriasında yoğun hasar, ödem (→) ve damar kongesyonu (c), submukoza tabakasında yoğun ödem (★), inflamasyon (inf) ve damar dilatasyonu (d), muskuler tabakada inflamasyon (inf) gözlendi (HE, scale bar: 200µm, 100µm, 50.0µm).

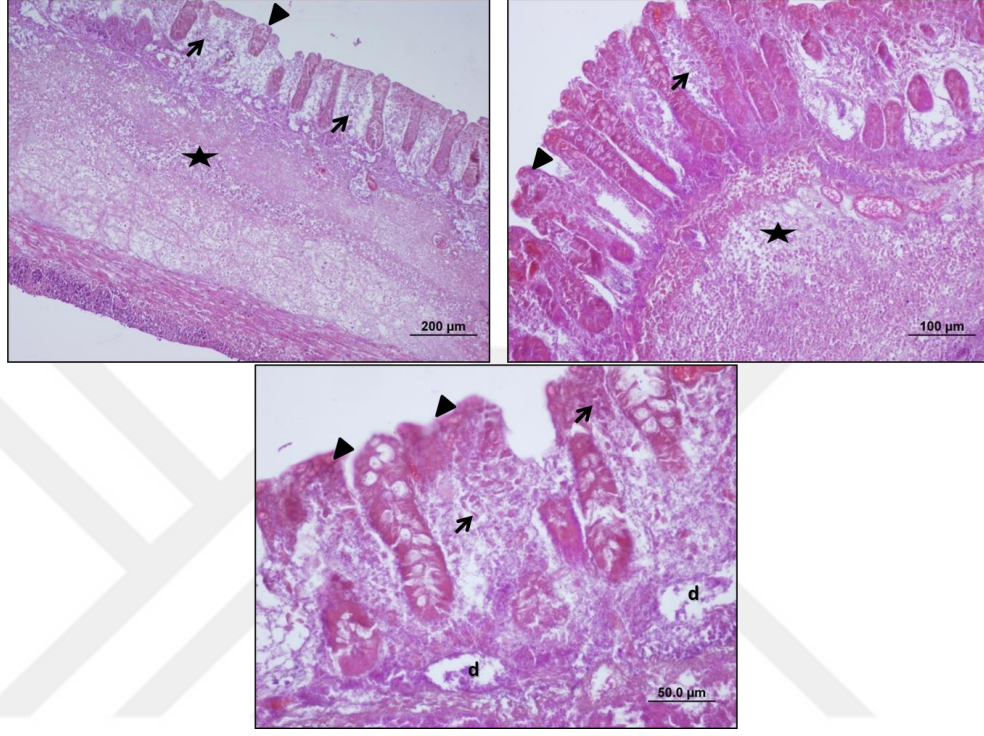
Borik asit grubuna ait bağırsak dokusu kesitlerinin incelenmesinde, İBH’de oluşan hasara karşı normale biraz daha yakın morfolojik yapı gözlemlendi (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. Borik Asit (BA) grubuna ait histolojik görüntü.

Deney hayvanlarının kalın bağırsakları, goblet hücrelerinden zengin (→) ve tek katlı çizgili kenarlı prizmatik epitel yapısı (▷) bazı bölgelerde kısmi hasar (○) gözlemlense de genelde azalmış hasar izlendi. Tunika submukoza (TSM) tabakasında kısmi ödem (★) ve inflamasyon görülmesine rağmen hasarlı gruba göre normale biraz daha yakın morfolojik yapıda gözlemlendi.

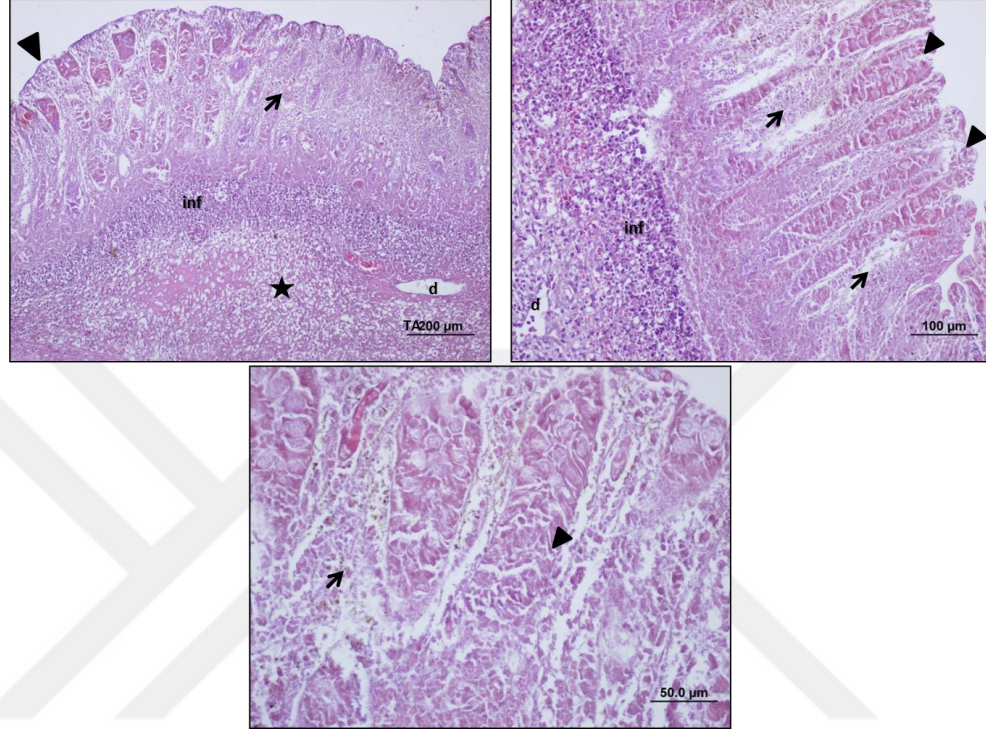
Probiyotik grubuna ait bağırsak dokusu kesitlerinin incelenmesinde, İBH’de oluşan hasara karşı çok az iyileşmiş morfolojik yapı gözlemlendi (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Probiyotik (PB) grubuna ait histolojik görüntü.

Deney hayvanlarının kalın bağırsak (kolon) epitelinde yoğun hasar (►) ve hücresel kayıplar, lamina propriasında yoğun hasar, ödem (→) ve submukoza tabakasında ödem (★), inflamasyon (inf) ve damar dilatasyonu (d) gözlemlendi.

Kombine grubuna ait bağırsak dokusu kesitlerinin incelenmesinde, İBH’de oluşan hasara karşı çok az iyileşmiş morfolojik yapı gözlemlendi (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. Kombine grubuna ait histolojik inceleme.

Deney hayvanlarının kalın bağırsak (kolon) epitelinde yoğun hasar (►) ve hücresel kayıplar, lamina propriasında yoğun hasar, ödem (→) ve submukoza tabakasında ödem (★), inflamasyon (inf) ve damar dilatasyonu (d) gözlemlendi.

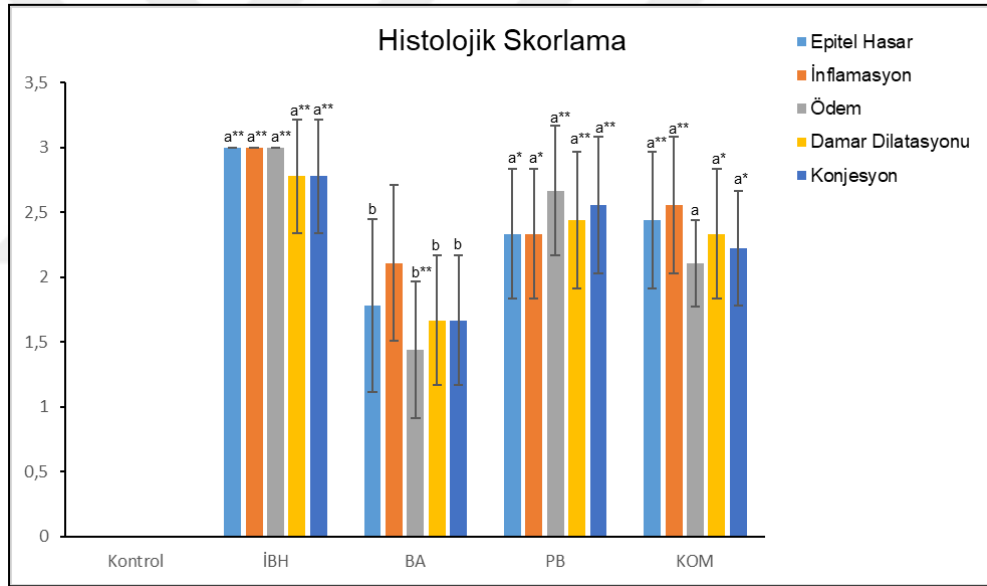
4.2.2. Bağırsak dokusu histolojik skorlama bulguları

Bağırsak dokusuna ait histolojik skorlamalar incelendiğinde kontrol grubu için epitel hasar, inflamasyon, ödem, damar dilatasyonu ve konjesyonu görülmemektedir. İBH grubunda ise tüm parametrelerin skorlaması kontrol grubuna kıyasla artmış ve istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0.001$) (Şekil 4.26.).

Borik asit grubunun skorlamaları İBH grubuna göre kıyaslandığında; epitel hasar, damar dilatasyonu ve konjesyonu anlamlı düzeyde azalırken ($p<0.05$); ödem skorlaması çok yüksek düzeyde anlamlı ($p<0.001$) bir azalış göstermiştir (Şekil 4.26.).

Probiyotik grubunun skorlamaları incelendiğinde ise İBH'ye kıyasla tüm parametrelerde bir azalma gözlenmiş, ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Ödem, damar konjesyonu ve dilatasyonu skorlamaları Kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı ($p<0.001$) bir artış gözlenirken; epitel hasar ve inflamasyonda yüksek düzeyde anlamlı bir artış ($p<0.01$) gözlenmiştir (Şekil 4.26.).

Kombine grubundaki skorlamalar incelendiğinde ise PB grubundan çok farklı gözükmemektedir. Epitel hasar ve inflamasyon skorlamaları çok yüksek düzeyde anlamlı ($p<0.001$) bir artış gösterirken; damar dilatasyonu ve konjesyonu yüksek düzeyde ($p<0.01$) artış, ödem ise sadece anlamlı bir artış göstermektedir ($p<0.05$) (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. Bağırsak dokusuna ait epitel hasar, inflamasyon, ödem, damar dilatasyonu ve konjesyonuna ait skorlama analizleri.

a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). a*: Kontrol grubu ile arasında yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$). a**: Kontrol grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$). b: İBH grubu ile arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$). b**: İBH grubu ile arasında çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$).

5. TARTIŞMA

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, ince bağırsak distali ve mukozasının kronik ve idiyopatik hastalıkları olup, Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki klinik fenotipi ile karakterizedir (Abad, ve diğerleri, 2003). İnflamasyon, UC'de yalnızca kolonda görülürken, CD'de ağızdan başlayarak anüse kadar, gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesinde bulunabilmektedir (Rubin & John, 1999).

Ülkemizde ve dünyada insidansı artan bu hastalıkla ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan biri de Amerika'da yapılmış olan bir prevalans çalışmasıdır. Bu çalışmaya göre İBH'nin Amerika'da görülme sıklığı 100000 kişide 439 olduğu belirtilmiştir (Kappelman, ve diğerleri, 2007). Türkiye'de, 2001-2003 yılları arasında on iki merkezin yürüttüğü çalışmaya göre, UC vakalarının insidansı 100000 kişide 4.4 olduğu bildirilirken, CD hastaları için insidans 100000 kişide 2.2 olarak bildirilmiştir (Nurdan, ve diğerleri, 2009).

Yaşam kalitesi oldukça düşen UC hastalarında distal kolonda daha fazla olmak üzere tüm kolonda ülserasyonların meydana gelmesi ve özellikle ileri safhalarda mukozadan psödopolip oluşumlarının gözlenmesi söz konusudur (Robbins, 1997), hastalığın aktif dönemlerinde ishal ve kanlı ishale, inaktif dönemden daha sık rastlanabilmektedir.

Bu hastalıklara karşı anti-inflamatuvar ilaçlar, antibiyotikler ve ayrıca glikokortikoid gibi steroid ilaçlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle streoid ilaçların zorunlu uzun süre kullanımına bağlı olarak, immün sistemin aşırı baskılanması, yüksek enfeksiyon riski gibi bir takım yan etkilerin de ortaya çıkması önemli bir sorun teşkil etmektedir (de Mattos, ve diğerleri, 2015). Bu yan etkilerin giderilebilmesi için ilave tedavilerin gerekmesi de söz konusu olabilmektedir. Bu doğrultuda, İBH'nin tedavisine yönelik yan etkisi minimal olan ideal bir ajanın tespit edilmesi ve en doğru dozun belirlenebilmesi için deneysel araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

Günümüze kadar inflamatuvar bağırsak hastalıklarına neden olan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve ilişkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine temel oluşturulabilmesi amacıyla, çok sayıda kolit hayvan modeli geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir (Wirtz & Neurath, 2000). Bu modeller arasında en yaygın kullanılan ve

bizimde (Cengiz ve diğeri, 2012; Bayramoğlu, ve diğeri, 2020) başarıyla uyguladığımız model TNBS'nin intrarektal uygulandığı sıçan İBH modelidir (Kankuri ve diğeri, 1999). TNBS, kolonik mukozanın nötrofil ve makrofajlarla infiltrasyonu ile karakterize olan, koliti indükleyen ve böylece inflamatuvar mediyatörlerin artışına yol açan bir hapten olarak etki göstermektedir ve insan İBH koşullarını taklit eden bir model oluşumunu sağlamaktadır (Kankuri ve diğeri, 1999).

TNBS ile İBH modeli oluşturduğumuz bu tez çalışmasında, borik asit, *B. clausii* probiyotiği ve bunların kombinasyonu gavaj yolu ile üç ayrı tedavi grubuna uygulandı. Yan etkisi daha az olabilecek, etkin bir tedavi stratejisi geliştirmek için tasarlanan bu çalışmada, sıçanlara uygulanmış olan maddelerin etkinlikleri biyokimyasal analizler ve histolojik incelemelerle araştırılıp tartışıldı.

5.1. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi

Karaciğer fonksiyon testleri olarak bilinen serum ALT, AST ve ALP aktiviteleri, TNBS ile kolit modeli oluşturulmuş birçok çalışmada önemli bir biyobelirteç olarak analiz edilmiştir.

Bizim de toplamda altı gün süren, TNBS (%50 etanol içinde 120 mg/kg) ile oluşturduğumuz kolit modeli çalışmamızda, karaciğer fonksiyon testleri olarak ALT, AST ve ALP aktiviteleri analiz edildi. Kontrol grubuna kıyasla İBH grubunda meydana gelen düşüş, istatistiksel analizlere göre anlamlı bulunmamıştır. Literatürdeki ilgili çalışmalar incelendiğinde, ALT ve AST aktiviteleri için birçok çalışmada anlamlı bir artış görülürken (Cengiz, ve diğeri, 2012; Mateus, ve diğeri, 2018), bazı çalışmalarda da azalma gözlemlenmiş (al-Qayim & Abass, 2014) ve bu azalmanın istatistiksel açıdan anlam ifade etmediği bildirilmiştir (Weidenbach, ve diğeri, 2000).

Çalışmamızda Kontrol grubu ile İBH grubu arasında istatistiksel olarak farkın anlamlı bulunmaması ($p>0.05$), özellikle örnek hacmimizin dar olması ve gruplar içerisindeki ALT ve AST aktivitelerinin çok fazla değişkenlik göstermesi ile ortaya çıkan geniş standart sapma aralığının bir sonucudur. Ayrıca TNBS grubunun serum ALT ve AST aktivitelerinin artmamış olması, karaciğerde herhangi bir hasar oluşmamış olmasının bir göstergesidir. ALT ve AST aktivitelerindeki bu azalmaya karşın İBH grubunun ALP aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlenmektedir.

Bununla ilgili Malo ve diğerlerinin (2014) yayınladıkları makalede, intestinal ALP'nin, normal bağırsak mikrobiyotasının homeostazını sağladığı ile ilgili yaptıkları çalışma oldukça dikkat çekmektedir. Bağırsakların mukozal defansında görev alan ve bağırsağın fırçamsı yüzeyinin bir enzimi olan intestinal alkalen fosfataz lipopolisakkaritleri defosforile ederek bu etkinliğini göstermektedir (Malo, ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda, TNBS uygulayarak oluşturduğumuz bağırsak hasarının bir sonucu olarak, enterositlerin yüzeyinde bulunan ALP enziminin serbestleşerek kan dolaşımına geçtiği ve serum ALP düzeylerini arttırdığı düşünülmektedir.

Tedavi edici olarak uyguladığımız borik asit grubunda ise TNBS ile oluşturduğumuz bağırsak hasarına karşılık; serum ALT, AST ve ALP aktivitelerinde bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu enzimlerin aktivitelerinde artış olmaması, takviye olarak uyguladığımız 100 mg/kg borik asidin karaciğer fonksiyonlarında kötü bir etkiye neden olmadığını ortaya koymuştur. Literatürde de çalışmamızı destekler nitelikte olan, borik asidin 50, 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarının gavaj yolu ile uygulandığı durumlarda, karaciğer fonksiyon testleri üzerinde herhangi bir kötü etkiye neden olmadığı ve hatta bir iyileşmeye sebep olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (Ince, ve diğerleri, 2011; Cengiz, ve diğerleri, 2019).

Çalışmamızda, probiyotik olarak gavaj yoluyla uyguladığımız *Bacillus clausii*'nin, ALT, AST ve ALP aktivitelerini arttırmadığı hatta İBH grubuna kıyasla aktivitelerini azalttığı görülmektedir. Bu sonuçlar, borik asidin ve *B. calusii*'nin birlikte uygulandığı KOM grubunda da aynı şekilde azalma yönündeydi.

5.2. Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi

Birer böbrek fonksiyon testi olarak tahlili yapılan BUN ve kreatinin seviyeleri, bizim çalışmamızda da analiz edilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) görülmemesine rağmen Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İBH grubunda minimal düzeyde bir artma mevcuttu. BA grubunda ise yine hem BUN hem de kreatinin için farklılık Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$), bu da 100 mg/kg borik asidin böbrek fonksiyonları üzerinde negatif bir etkisinin olmadığını bir göstergesidir. Bunun aksine, Kontrol, İBH ve BA gruplarına karşılık PB ve KOM

gruplarındaki artış her iki biyobelirteç için de anlamlı bir fark oluşturacak ($p<0.05$) şekilde yüksekti.

2001 yılında *Bacillus subtilis* probiyotiği ile yapılan bir çalışmada, probiyotik, farelere ağız yoluyla uygulanmış ve sporların, farklı saatlerdeki, dolaşıma ve diğer organlara yayılımı takip edilmiştir. Araştırmacılar, sağlıklı farelerde yürüttükleri bu araştırma ile *B. subtilis* sporlarının 84. saatte böbreklerdeki sayısının altı adet olduğunu bildirmişlerdir (Hoa, ve diğerleri, 2001). Çalışmamızda, *B. clausii* sporlarını gavaj yolu ile uyguladığımız iki grupta da (PB ve KOM) BUN ve kreatinin düzeylerinin artışının, kolit modeli ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda, bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulduğu inflamatuvar bağırsak hastalıklarında, *B. calusii* sporları ya da vejetatif formları, dolaşımla böbrek dokusuna ulaşp fonksiyonlarını negatif yönde etkilemiş ve serum BUN ve kreatinin düzeylerini arttırmış olabilir.

5.3. Kan Hücre Sayımının (CBC) Değerlendirmesi

Bu tez çalışması kapsamında hemoglobin (Hb) düzeylerinin tespisi, ayrıca kan hücre sayımı analizleri; eritrosit (RBC), akyuvar (WBC), lenfosit, monosit ve nötrofil sayımı gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlarımıza göre İBH grubunun, Hb düzeylerinde ($p<0.001$) ve eritrosit sayısında, kontrol grubuna göre kıyaslandığında bir düşüş mevcuttu. Bu düşüşün önemli sebeplerinden biri, kolit modeli oluşturulan grupta görülen kanamalı ishaldir. Herias ve diğerlerinin (2005), dekstran sodyum sülfat (DSS) ve Soliman ve diğerlerinin (2018), asetik asit ile oluşturdukları sıçan kolit modeli çalışmalarında ayrı ayrı bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte hem Hg düzeylerinde hem de eritrosit sayısında azalmanın olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, DSS ile oluşturdukları kolit modeli çalışmasında, probiyotik gruplarının 7. ve 17. günlerdeki sonuçlarını incelediklerinde, kolit grubuna kıyasla hemoglobin seviyelerinde ve eritrosit sayılarında artış tespit etmişlerdir (Herias, ve diğerleri, 2005). Bizim çalışmamızda da probiyotik uyguladığımız grubun, Hg düzeyi ve eritrosit sayısındaki artış, İBH grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farka ($p<0.01$) sahiptir. Buna karşılık PB grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir. Bu sonuçlara göre probiyotik grubunun Hb

seviyeleri ve eritrosit sayıları üzerindeki iyileştirici etkinliğinin, kombine ve borik asit grupları ile karşılaştırıldığında daha iyi olduğu söylenebilir.

TNBS ile oluşturulan kolit modelinde ortaya çıkan inflamatuvar süreçlerin bir parçası olarak, WBC, lenfosit, monosit ve nötrofil gibi immun yanıt ile ilgili hücrelerin sayısının kandaki artışı beklenen bir sonuçtur. Ayrıca nötrofil/lenfosit (N/L) oranı, vücudun toplam inflamatuvar statüsü hakkında bilgi vermekte, özellikle Ülseratif kolit hastalarının aktif dönemlerinde pik yapmaktadır (Celikbilek, ve diğerleri, 2013).

Liu ve diğerleri (2009), Sprague-Dawley türü sıçanlarda TNBS ile indükledikleri kolit modeli çalışmalarında, WBC, nötrofil ve lenfosit hücre sayılarının, hasta grupta oldukça yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, akut inflamasyonun bir göstergesi olarak MPO aktivitesi ölçümü de yapmış ve MPO aktivitesinin doğrudan nötrofil infiltrasyonunun derecesi ile bağlantılı olduğunu açıklamışlardır. Literatürde bu sonuçları destekleyen benzer çalışmalara rastlanmaktadır (Togawa, ve diğerleri, 2002; Larrosa, ve diğerleri, 2009). Bizim çalışmamızdaki bulgular da literatürdeki sonuçlara paraleldir. Buna göre çalışmamızın, İBH grubundaki, N/L oranı ($p<0.05$), beyaz kan hücresi (WBC) ($p<0.01$), lenfosit ($p>0.05$), nötrofil ($p<0.5$) ve monosit ($p<0.01$) hücre sayısı artışı, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar hasta grubunda, inflamatuvar süreçlerin başlamış olduğunun önemli bir göstergesidir.

Tedavi edici olarak borik asidin uygulandığı BA ve KOM grupları, İBH grubu ile karşılaştırıldığında ise hücre sayılarında, istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir; ancak, probiyotik grubu incelendiğinde sonuçların neredeye İBH grubu ile eş düzeyde olduğu anlaşılmaktadır. İnflamatuvar süreçlerle yakından ilişkili olan WBC, monosit, lenfosit ve nötrofil hücrelerinin kandaki sayılarının azalıp, kontrol grubu seviyesine kadar yaklaşmasında, 100 mg/kg borik asit içeren grupların (BA ve KOM grupları), PB grubuna göre daha etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Idiz ve diğerleri (2019) yılında yaptıkları çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer bir sonuç paylaşmıştır. Araştırmacıların, sepsis modeli oluşturdukları bu çalışmada, 5 gün boyunca borik asit (50 mg/kg) ve ampicillini birlikte uyguladıkları grupta WBC sayısının %18 oranında düştüğünü bildirmişlerdir. Buna karşılık başka bir araştırma

grubunun, DSS ile indüklediği kolit modeli çalışmasında, uzun ve kısa dönem probiyotik uyguladıkları gruplardaki WBC, lenfosit ve nötrofil sayısının kolit modeli grubu ile kıyaslandığında hücre sayılarının daha yüksek olduğunu açıklamışlardır (Herias, ve diğerleri, 2005). Asetik asit ile oluşturulan bir başka kolit modeli çalışmasında ise, 5. günde, probiyotik verdikleri grubun, bizim çalışmamızın aksine, WBC ve lenfosit sayılarında çok az miktarda bir düşüş; nötrofil ve monosit sayılarında ise artış olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar, N/L oranı vermişler ve probiyotik uyguladıkları grupta bir miktar seviyelerinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Qayim & Bakhit, 2016).

TNBS uygulandıktan sonra dört günlük, borik asit ve probiyotik tedavisini içeren sıçan kolit modeli çalışmamızda, önemli bir akut kolit belirtici olan N/L oranı özellikle İBH grubunda çok fazla artarken ($p<0.05$), BA ve KOM gruplarındaki azalış, PB grubu ile karşılaştırıldığında nispeten daha fazlaydı. Bu bulgular, borik asitle birlikte probiyotik uygulanmasının da inflamatuvar süreçler üzerine iyileştirici etkinliğinin olabileceğini düşündürmektedir.

5.4. Serum TNF- α Düzeylerinin Değerlendirilmesi

TNF- α , çeşitli otoimmün veya inflamatuvar hastalıklarda Th-1 hücrelerinin aktivasyonu ile indüklenen inflamatuvar kaskatın en önemli efektör moleküllerinden biridir. İBH ile ilişkili birçok farklı proinflamatuvar sitokin (IL-1, IL-6, TNF- α) olmasına rağmen, Crohn olan hastalarda artan seviyelerinin keşfedilmiş olmasından bu yana en çok dikkati ve ilgiyi üzerinde TNF- α toplamıştır. Aynı zamanda fare ve sıçanlarda yapılan tüm İBH modellerinde TNF- α 'nın artıyor olması bu modellerin ortak özellikleridir (Garside, 1999).

Literatürde, sıçanlar ve farelerde TNBS ile oluşturulmuş kolit modellerinde serum TNF- α düzeylerinin arttığını belirten farklı çalışmalar mevcuttur (Neurath, ve diğerleri, 1997; Soyuturk, ve diğerleri, 2012; Xu, ve diğerleri, 2018). d'Alessio ve diğerleri (2013) yaptıkları çalışmada serum TNF- α düzeylerinin, TNBS uygulandıktan 24 saat sonra, kontrol grubuna göre kıyaslandığında neredeyse doksan kat arttığını gösterirken; bir başka araştırma grubu, sekizinci günün sonunda, kolit oluşturdukları gruptaki TNF- α düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir artış

($p < 0.001$) gösterdiğini bildirmiştir (Liu, ve diğerleri, 2011). Bu çalışmalara karşın, Ameho ve diğerleri (1997), TNBS uyguladıkları ve toplamda on dört gün süren çalışmada, hasta grubunun ilginç bir şekilde serum TNF- α düzeylerinin anlamlı bir farklılık göstermediğini belirtmişlerdir.

Dikkat çeken çalışmalardan biri Cury ve diğerlerinin (2013), yayınladıkları çalışmaları olmuştur. Araştırmacılar, TNBS ile kolit oluşturulan grubun TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre çok yüksek seviyelerde başladığını ancak günden güne azalarak on ikinci günde neredeyse yarı seviyelerine kadar düştüğünü bildirmiştir. Doğrudan nötrofiller, monositler ve erken farklılaşmış makrofajlar tarafından salınan bir protein olan ve yarılanma ömrü 5 saat (Fagerhol, ve diğerleri, 2005) olan kalprotektin seviyeleri de analiz edilmiş olan bu çalışmada on iki gün boyunca neredeyse stabil kaldığı gösterilmiştir (Cury, ve diğerleri, 2013). Bu çalışmalardan çıkarılabilecek önemli sonuçlardan biri, nötrofil ve monosit gibi hücre sayılarının kanda yüksek seyretmeye devam ettiği, ancak buna karşılık TNF- α düzeylerinin ilk günden itibaren başlayarak azalmaya devam ettiğidir.

Bu tez çalışması kapsamında da İBH için önemli bir biyobelirteç olan TNF- α 'nın serumdaki seviyeleri analiz edilmiştir. Literatürdeki birçok çalışmada olduğu gibi bizim de çalışmamızda, kolit modeli oluşturduğumuz İBH grubunun TNF- α düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde anlamlı ($p < 0.001$) bir artış göstermektedir.

Daha önce yayınladığımız sıçan kalp krizi modeli çalışmamızda borik asidin (100 mg/kg) uygulandığı grupta, hasta grup ile kıyaslandığında, serum TNF- α düzeyleri daha düşük seyretmekteydi (Karimkhani, ve diğerleri, 2020). Bir diğer çalışmamızda ise borik asidin farklı dozlarını (50, 100, 200 mg/kg) renal iskemi/reperfüzyon modeli oluşturduğumuz sıçanlara uyguladık. Borik asidin 100 mg/kg uygulandığı gruptaki serum TNF- α seviyeleri, hasta grubu ile karşılaştırıldığında neredeyse iki katı oranında daha düşüktü (Kar, ve diğerleri, 2019). Borik asit ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, araştırmacılar; Thp-1 hücrelerini LPS ile stimüle etmişler ve uyarının sonucunu test etmek için ortamdaki TNF- α düzeyleri ile TNF- α 'nın mRNA ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Kültür ortamında, LPS ile indüklenmiş olan hücrelerin hem TNF- α düzeylerinin hem de ekspresyonunun arttığını bildiren çalışma ekibi, aynı zamanda borik

asit uygulanmasının (5, 10, 25 $\mu\text{mol/L}$) anlamlı bir şekilde TNF- α sekresyonunu ve ekspresyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Cao, ve diğerleri, 2008).

Borik asidin 100 mg/kg dozunu gavaj yolu ile uyguladığımız bu tez çalışmasında, kolitte artan (İBH grubu) serum TNF- α seviyelerinin BA grubunda önemli derecede azaldığı ($p<0.001$) ve hatta kontrol grubu seviyelerine kadar düştüğü görülmektedir. Biz de borik asidin, özellikle TNF- α 'nın sekresyonunda ve ekspresyonunda önemli bir konumda olan Thp-1 hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkinliği aracılığı ile anti-inflamatuar özellik gösterdiğini düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra inflammatuar süreçlerde önemli bir etkinliği olan monosit hücreleri, inflamasyonun olduğu bölgeye göç edip, TNF- α salgılayan makrofajlara dönüşmektedir. Borik asidin, TNF- α seviyelerini önemli oranda azaltarak anti-inflamatuar etkinlik göstermesinin bir diğer mekanizmasının, BA grubunda azalan monosit hücre sayısı ve buna bağlı olarak azalan makrofaj sayısı olduğunu tahmin etmekteyiz.

Yapılan çalışmalar, probiyotiklerin, probiyotik suşuna/suşlarına ve hastalık patofizyolojisine özgü hücreler (Th1, Th2, Th17, Treg, T hücreleri) ve humoral (B hücreleri) bağışıklık tepkilerini farklı şekilde modüle ederek, bağışıklık sistemini kontrol altında tuttuğunu göstermektedir (Dargahi, Johnson, Donkor, Vasiljevic, & Apostolopoulos, 2019). Dar ve diğerlerinin (2018) yayınladıkları postmenepozal osteoporotik fare modeli çalışmasında, *B. clausii* (10^9 CFU/ml) probiyotiğini içme suyu ile birlikte uygulamışlar ve probiyotik uyguladıkları grubun TNF- α , IL-6 ve IL-17 gibi proinflammatuar sitokinlerin seviyelerinin hasta grubuna kıyasla daha düşük seviyelerde olduğunu bildirmişlerdir.

B. clausii probiyotiğini (1×10^9 CFU/ml/100 g) gavaj yolu ile uyguladığımız PB grubunun TNF- α seviyeleri, İBH grubu ile karşılaştırıldığında, tıpkı BA grubunda olduğu gibi yüksek derecede önemli bir düşüş sergilediği görülmektedir ($p<0.001$). *B. clausii* probiyotiği, bazı anti-inflamatuar sitokin salgılayan hücreler üzerinde etki göstererek inflammatuar süreçleri baskıladığını ve böylelikle TNF- α düzeylerinde bir azalmaya sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Borik asit ile probiyotiği kombine olarak uyguladığımız grubun TNF- α düzeyleri, tıpkı diğer iki tedavi grubunda olduğu gibi düşüş göstermektedir ($p<0,05$), ancak

buradaki düşüş ilginç bir şekilde borik asit ve probiyotik grubundaki düşüş kadar yüksek düzeyde anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

5.5. Serum IL-35 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

CD4⁺ hücrelerinin bir alt popülasyonu olan önemli düzenleyici T hücreleri (T_{reg} hücreleri), organizmayı otoimmuniteden korur, ayrıca astım ve İBH gibi kronik inflamatuvar hastalıkların engellenmesinde görev alır. Daha çok T_{reg} hücreleri tarafından üretilen IL-35, bu hücrelerin immun baskılayıcı aktivitelerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bilinen diğer tüm IL-12 ailesinden farklı olarak T hücrelerinden salınan IL-35, bir immun stimülatör ya da bir pro-inflamatuvar sitokin olarak değil bir inhibitör sitokin olarak görev yapar (Collison, ve diğerleri, 2007).

Zhang ve diğerleri (2018), farelerde DSS ile indükledikleri kolit modelinde bir pro-inflamatuvar olan IL-6 ve bir anti-inflamatuvar olan IL-10 ile birlikte IL-35 seviyelerini de analiz etmişlerdir. Araştırmanın sonuçlarına göre serum IL-35 ve IL-10 seviyeleri, kontrol grubuna göre kıyaslanınca DSS grubunda azalırken, IL-6 seviyeleri bu grupta artmaktadır. TNBS ile sıçanlarda oluşturulmuş bir başka kolit modeli çalışmasında ise kolon dokusundaki IL-35'in ekspresyonu ile düzeylerini analiz etmişler ve hem ekspresyonunda hem de seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla yüksek düzeyde anlamlı (p<0.01) bir azalış tespit etmişlerdir (Nan, ve diğerleri, 2018).

Bizim de çalışmamızda bir anti-inflamatuvar sitokin olarak serum IL-35 seviyeleri analiz edilmiştir. Kolit oluşturduğumuz gruptaki IL-35 seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında düşüş, istatistiksel açıdan yüksek düzeyde (p<0.01) anlamlı bir fark göstermektedir. TNBS uygulanan grupta inflamatuvar süreçlerin başlamasıyla birlikte anti-inflamatuvar etki gösterecek olan mekanizmaların düşüşe geçmesi beklenen bir sonuçtur. TNBS'nin oluşturduğu hasarda, IL-35'in sentezlenmesinde önemli bir role sahip olan T_{reg} hücrelerinin de yüksek düzeyde etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Geniş çaplı bir literatür taramasının ardından, borik asidin uygulandığı ve IL-35 seviyelerinin ölçümünün gerçekleştirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak 2020 yılında yapılan bir çalışmada, sağlıklı hayvanlara uyguladıkları borik asidin, bir başka anti-inflamatuvar sitokin olan IL-4'ün serumdaki seviyelerini ve dalaktaki IL-10'un ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, borik asit grubunda bu

sitokinlerin seviyelerinin ve ekspresyonlarının arttığını belirtmişler ve borik asidin immun baskılayıcı özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (Abd-Elhakim, ve diğerleri, 2020).

Benzer şekilde *B. clausii* probiyotığının uygulandığı ve IL-35 seviyelerinin analizinin yapıldığı bir araştırma ile de karşılaşılmamıştır. Başka bir probiyotik olan *Bifidobacterium infantis*'in koruyucu olarak uygulandığı bir çalışmada, kemik iliği kaynaklı dentritik hücrelerde IL-35 ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir (Xue, ve diğerleri, 2019). Ashraf ve diğerleri (2014) yayınladıkları çalışmalarında, bazı *Lactobacillus* türlerinin periferik mononükleer hücreler (PMNC) üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonuçlarına göre, birer anti-inflamatuar sitokin olan ve doğrudan T_{reg} hücrelerinin fonksiyonlarıyla ilişkili olan IL-10 ve TGF- β seviyelerinin artmış olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda T_{reg} hücrelerinin aktivitesini analiz etmişler ve bu probiyotiklerin uygulandığı gruplarda hücrelerin aktivitesinin artmış olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, 100 mg/kg borik asit ve 1×10^9 CFU/ml/100 g *B. clausii* uyguladığımız grupların serum IL-35 seviyesinin, İBH grubuna kıyasla önemli derecede arttığı ve hatta neredeyse kontrol grubunun seviyelerine kadar yeniden yükselmiş olduğu görülmektedir. Bu maddelerin kombine olarak uygulandığı grupta ise IL-35'in seviyesi İBH grubuna göre neredeyse 1,5 katı kadar artarak istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı bir farklılık ($p < 0.001$) göstermektedir. Daha çok T_{reg} hücreleri tarafından sentezlenen IL-35'in, İBH grubuna kıyasla tedavi gruplarında artmış olmasının sebebi olarak, bu maddelerin sadece intestinal mukoza hücreleri üzerinde değil aynı zamanda T_{reg} hücreleri üzerinde iyileştirici bir etkinliğe sahip olması ya da bu hücrelerin aktiviteleri üzerinde pozitif yönde bir etki yaratmış olduğunu düşündürmektedir.

5.6. Bağırsak Dokusu MPO Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Bir yanıt olarak, immun hücrelerinin bağırsak mukozasına infiltre olması İBH'nin histolojik özellikleri içerisinde anahtar role sahiptir. İBH'nin her iki formunda da özellikle nötrofil ve monosit hücrelerinin bağırsak epitelinde belirgin infiltrasyonu ve birikimi söz konusudur. Dolayısı ile hasarlanan bu dokuya infiltre olan nötrofil ve

monositler, MPO'nun salgılanmasında ve iki elektronlu halojenlenmiş oksidanların (HOCl) sentezlenmesinden sorumludurlar (Chami, Martin, Dennis, & Witting, 2018).

TNBS ve DSS ile oluşturulmuş kolit modellerinde, inflamasyonun çok önemli bir göstergesi olan MPO aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir (Hans, ve diğerleri, 2000; Barreau, ve diğerleri, 2004; Endharti & Permana, 2017). İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, hastalığın özellikle aktif dönemlerinde fekal MPO aktivitesinin artmış olması, hayvan çalışmalarına paralellik göstermektedir (Saiki, 1998); (Masoodi, ve diğerleri, 2012).

Bu tez çalışmasında, TNBS ile (100 mg/kg) kolit modeli oluşturulan sıçanların bağırsak dokusundaki MPO aktiviteleri, Kontrol grubu ile kıyaslandığında neredeyse 28 katı kadar daha yüksek olduğu teyit edilmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0.001$). Kan sayımı sonuçlarında belirtmiş olduğumuz gibi TNBS uygulanmış gruptaki sıçanların artan nötrofil ve monosit sayıları, aynı zamanda hasarlı bölgeye infiltre olmuş ve bağırsak dokusunda MPO aktivitesinin artmasına neden olmuştur.

Literatürde borik asidin uygulanıp MPO aktiviteleri üzerindeki etkinliklerinin incelenmiş olduğu tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Geyikoglu ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları bu çalışmada, over isekmi-reperfüzyon hasarını oluşturmada bir saat önce oral borik asit (7 mg/kg) uygulaması yapmışlar ve borik asidin over dokusu MPO aktivitesinde anlamlı bir düşüşe neden olmadığını bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında ise borik asidin dört gün boyunca oral yolla 100 mg/kg dozu uygulanmış ve sıçan kolit modelindeki olası iyileştirici etkinliği analiz edilmiştir. Bu kapsamda aktivitesi ölçülmüş olan MPO'nun, İBH grubuna kıyasla BA grubunda yaklaşık 4 katı kadar azalmış olduğu ve yine BA grubunun kontrol grubu ile arasında istatistiksel açıdan bir farkın bulunmadığı görülmektedir. Bulgularımız göstermektedir ki borik asit, kandaki nötrofil ve monosit sayısını azaltmakta ve TNF- α seviyelerini düşürerek inflamatuvar hücrelerin bağırsak dokusuna infiltre olmasını engellemektedir. Dolaşımdaki bu inflamatuvar hücrelerin bağırsak dokusuna göçünün azalması ile birlikte MPO aktivitesinde de bir azalma meydana gelmektedir.

Literatürdeki kaynaklar incelendiğinde *B. clausii* sporlarının tedavi edici olarak uygulandığı ve MPO aktivitesi analizinin gerçekleştirildiği herhangi bir makaleye ulaşılmamıştır. Ancak portekizce yayınlanan bir tez çalışmasında *B. clausii* uygulanmış ve duodenum, jejunum ve ileum dokularında MPO aktiviteleri analiz edilmiştir. Bu çalışmaya göre hasta grubunda artan MPO aktiviteleri probiyotığın uygulandığı grupta istatistiksel açıdan azalmıştır (Lima, 2018). Ayrıca ot sazanlarında yapılan bir çalışmada, *Bacillus*'un iki farklı türü probiyotik olarak diyetlerine eklenmiş ve bu probiyotiklerin serum MPO aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (Li, ve diğerleri, 2012). Hegazy ve El-Bedewy'nin (2010) yaptıkları, 10'u kontrol 30'u hasta (UC) olmak üzere toplam kırk kişinin katıldığı klinik bir araştırmada, hastalar arasında sülfasalazin ve probiyotik grupları oluşturulmuş ve bu grupların MPO aktiviteleri analiz edilmiştir. Probiyotik olarak *Lactobacillus*'un iki farklı türünün kullanıldığı çalışmada, hasta grubuna göre, probiyotik grubunun MPO aktivitelerinde azalma olduğu belirtilmiştir.

B. clausii probiyotiğini (Enterogermina®) tedavi edici olarak uyguladığımız bu tez çalışmasında, kolit modeli üzerinde bir miktar iyileştirici etkisinin olmasının yanı sıra borik asit kadar etkili olmadığını gösterdik. PB grubunun MPO aktivitesi incelendiğinde İBH grubuna göre ortalaması biraz daha düşük olmasına rağmen istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmemektedir. PB grubu ile Kontrol grubu kıyaslandığında ise sonuçlar bize çok yüksek düzeyde anlamlı ($p < 0.001$) bir artışın olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın kombine grubunun MPO aktivitesi incelendiğinde, aktivitedeki azalma neredeyse borik asit grubundaki kadar olduğu görülmektedir. KOM grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmazken, ortlaması İBH ve PB grubuna göre çok daha düşüktür.

MPO aktiviteleri incelendiğinde borik asit ve kombine grubun anti-inflamatuar etkinliği daha ön planda olduğu, buna karşılık PB grubunun iyi bir anti-inflamatuar etkinlik göstermemiş olduğu söylenebilir. MPO ile ilgili bu sonuçlarımız, özellikle monosit ile nötrofil sayısı, TNF- α seviyeleri ve N/L oranı bulgularımızı yüksek oranda desteklemektedir.

5.7. Bağırsak Dokusu NO Düzeyleri ile iNOS'un Göreceli Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

L-arjinin'den, nitrik oksit sentaz aracılığı ile sentezlenen ve yapısında eşleşmemiş elektrona sahip olan NO, endotel-bağımlı kan akımının ve basıncının düzenlenmesinde, ayrıca nörotransmitter ve mikroorganizmalara karşı ilk savunmayı gerçekleştirmek gibi önemli fizyolojik rolleri üstlenmektedir (Bruckdorfer, 2005). NO, gastrointestinal mukozada yeterli perfüzyonu sağlamak, mikrovasküler/epitelyal geçirgenliği ve immun yanıtı düzenlemek gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Bunların yanı sıra, NO'nun yüksek konsantrasyonlara ulaşması durumunda; nötrofillerin aktive olması, vazodilatasyon, nitrozamin üretiminin artması ve süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oldukça toksik bir bileşik olan peroksinitrit radikaline dönüşebilmesi söz konusudur (Kolias, Valatas, & Ward, 2004).

Yapılan İBH modeli (*in vitro/in vivo*) ve klinik çalışmalarda, hastalığın aktif döneminde NO'nın arttığına yönelik sonuçlar mevcuttur. Araştırmacıların çoğuna göre yükselmiş olan NO düzeyleri, iNOS aktivitesindeki artıştan kaynaklanmaktadır (Kimura, ve diğerleri, 1997; Mei, ve diğerleri, 2005; Ancha, ve diğerleri, 2009; Avdagić, ve diğerleri, 2013). Cooke ve Davidge (2001) yayınladıkları makalede, NO'nın yüksek konsantrasyonlarında oluşan ve oldukça reaktif bir molekül olan peroksinitrit anyonunun NF- κ B'yi aktive ederek iNOS'un ekspresyonunu arttırdığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, Kontrol grubuna göre kıyaslandığında, TNBS (120 mg/kg) uygulanan grubun NO düzeyleri istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı olacak şekilde artmıştır. Buna karşılık Western Blot iNOS analizinde, iNOS'un göreceli protein ekspresyonu (iNOS/ β -aktin oranı) İBH grubuna göre kıyaslandığında Kontrol grubunda daha yüksek görülmektedir. Western Blot ölçümünün 2 kere denenmiş olmasına rağmen İBH grubundaki iNOS protein ekspresyonunun artmamış hatta bir miktar düşük bulunmuş olması ilginç bir bulgudur ve literatür ile çelişmektedir. Bunun nedenlerinden biri olarak İBH grubunda iNOS'un up-regülasyonu gerçekleştikten hemen sonra geri bildirim mekanizmaları ile yeniden down-regüle olduğunu ve bu sebepten ötürü doğru zaman aralığında artışını tayin edememiş olabileceğimizi düşünmekteyiz.

CCl₄ ile farelerde hepatoksisite oluşturulmuş bir çalışmada 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda borik asit uygulanmış ve NO seviyeleri ile iNOS/ β -aktin oranı analiz edilmiştir. Araştırmacılar, hasta grubuna karşı tüm borik asit gruplarını karşılaştırdıklarında, hem NO seviyelerinde hem de iNOS'un göreceli protein ekspresyonunda herhangi anlamlı bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir (Ince, ve diğerleri, 2011). Simsek ve diğerleri (2019) göğüs kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları *in vitro* bir çalışmada borik asit, boraks ve boronu tedavi edici olarak uygulamışlardır. İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, boron türevlerinin olduğu gruplarda iNOS'un yüzde olarak seviyeleri azaldığı belirtilmiştir. Makrofajlar ile yapılmış olan bir başka *in vitro* çalışmada ise borik asidin 15, 20, 100 ve 200 μ g/ml dozları kullanılmıştır. Makrofajları LPS ile indükledikleri gruba kıyasla, diğer tüm doz gruplarında hem NO seviyelerinde hem de iNOS'un göreceli ekspresyonunda bir azalma olduğunu göstermişlerdir (Demirci, ve diğerleri, 2016).

Bu tez çalışmasında BA grubunun NO düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmezken, Western Blot analizi ile elde ettiğimiz iNOS'un göreceli protein ekspresyonu İBH grubuna göre BA grubunda oldukça düşük seviyelerdeydi. Bu noktada literatür bilgilerine dayanarak borik asidin, NF- κ B'ye etki ederek iNOS ekspresyonunu azalttığını düşünmekteyiz. Buna karşılık, NO seviyelerinin azalmamış olmasını ise borik asidin iNOS aktivitesi üzerinde herhangi inhibe edici bir etkiye sahip olmamasına bağlamaktayız.

Aktif peritoneal hücreler üzerinde yapılan *in vitro* bir araştırmada *Bacillus clausii*'nin tüm suşlarının nitrit üretimini arttırdığını teşhis etmişlerdir. Bunu özellikle iNOS indüksiyonuna bağlayan araştırmacılar, iNOS'un indüklenme nedeni olarak artan IFN- γ seviyelerini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar ayrıca *Bacillus clausii*'nin en az T suşu (Enterogermina®) olmak üzere geriye kalan diğer üç suşunun da (O/C, N/R ve SIN suşları) CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiğini belirtmişlerdir (Urdaci, Bressollier, & Pinchuk, 2004). IFN- γ , hücre içerisindeki ilgili genlerin ekspresyonunda görev alan NF- κ B sinyal yolağını aktive etmektedir (Pfeffer, 2011). Dolayısı ile *Bacillus clausii*, CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak, IFN- γ seviyelerini yükselmesine ve bunun etkisiyle NF- κ B sinyal yolağının aktive edilerek iNOS ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında uyguladığımız *Bacillus calusii* probiyotiğinin, iNOS'un göreceli protein ekspresyonunda, çok fazla olmasa da bir miktar azalmaya neden olduğunu; ancak, borik asit kadar etkili olmadığını gözlemledik. Buna karşın PB grubunun NO seviyelerindeki azalma BA grubundakinden daha fazladır ve istatistiksel açıdan İBH grubu ile arasında anlamlı bir farklılık ($p<0.05$) görülmektedir.

Kombine grubu incelendiğinde, NO seviyelerinin PB grubundaki kadar bir azalmaya neden olduğu; iNOS/ β -aktin oranlarının ise diğer tüm gruplar arasından KOM grubunda en düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Bu noktada kombine grubun anlamlı bir farklılık görülmemesine rağmen hem NO seviyelerini hem de iNOS'un göreceli protein ekspresyonunu azaltmada daha etkin olduğu net bir şekilde görülmektedir. Sonuç olarak iNOS'un protein ekspresyonunun azalmasında, KOM grubu başta olmak üzere üç tedavi grubunun da iyileştirici bir etkinliğe sahip olduğu söylenebilir.

5.8. Bağırsak Dokusu MDA Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Hücre membranlarının yapısını oluşturan fosfolipitler ve kolesterol, çoklu doymamış yağ asidi içermektedirler. Oksidatif stres sırasında serbest radikallerin doğrudan bu yağ asidi zincirlerine saldırması ve degradasyonuna sebep olması kısaca lipit peroksidasyonu olarak isimlendirilmektedir (Girotti, 1985). MDA, lipit peroksidasyonunun bir son ürünü olarak oluşan ve fotometrik yöntemlerle tayini yapılabilen bir moleküldür (Halliwell & Chirico, 1993). Dolayısı ile MDA düzeyleri, hem lipit peroksidasyonu hem de oksidatif stresin durumu ile ilgili doğrudan bilgi vermekte kullanılan önemli bir biyobelirteçtir.

TNBS ile oluşturulmuş birçok hayvan modelinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında, hasta grupların MDA düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı/anlamsız bir artışın olduğu bildirilmiştir (Zhou, ve diğerleri, 2006; Giriş, ve diğerleri, 2007; Li, ve diğerleri, 2008; Liu & Wang, 2011). Aynı zamanda, bazı klinik araştırmalarda da İBH'ye sahip olan bireylerle kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Tabari, ve diğerleri, 2017; Xu, ve diğerleri, 2020).

Bu tez çalışması kapsamında İBH grubunun MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yaklaşık %22'lik bir artışla daha yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda sonuçlarımız literatür sonuçları ile tutarlılık göstermektedir. TNBS'nin

oluşturduğu hasara bağlı olarak serbest radikal düzeyleri de artmaktadır. Artmış serbest radikal düzeylerinin hücre içinde sebep olduğu sonuçlardan biri de lipid peroksidasyonudur. Dolayısı ile İBH grubunda istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmemesine rağmen artmış olan MDA seviyeleri beklenen bir sonuçtur.

Daha önce farklı hayvan modelleri ve *in vitro* olarak yürüttüğümüz çalışmalarımızda da borik asidin, MDA düzeylerinin azalmasında önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koyduk (Sogut, ve diğerleri, 2015; Kar, ve diğerleri, 2018; Kar, ve diğerleri, 2019; Ataizi, ve diğerleri, 2019). Karbon tetraklorür ile indüklenmiş bir hepatoksisite çalışmasında tedavi edici olarak borik asidin 50, 100, 200 mg/kg dozları uygulanmış ve MDA düzeyleri analiz edilmiştir. Araştırmacılar, borik asit uygulanan gruplardaki MDA seviyelerinin istatistiksel açıdan azalmasını özellikle artan GSH (endojen antioksidan) seviyelerine bağlamışlardır (Ince, ve diğerleri, 2011). Bir başka çalışmada ise siklofosfamid ile oluşturulan hasara karşılık uygulanan borik asidin MDA seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Araştırmacı bu sonucu, özellikle borik asidin ROT süpürücü özelliğine dayandırmıştır (Cengiz, 2018).

Çalışmamızda, borik asit uygulanan grup ile İBH grubu karşılaştırıldığında BA grubunun MDA seviyelerinde istatistiksel açıdan yüksek düzeyde ($p<0.01$) anlamlı bir düşüş olduğu görülmektedir. Oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan MDA'nın BA grubunda azalmasının nedeni olarak, borik asidin serbest radikal süpürücü özelliğe sahip olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sepsis modelinin oluşturulduğu bir çalışmada, *Bacillus clausii* probiyotiği tedavi edici olarak uygulanmış ve MDA düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Erel & Yılmaz, 2018). Asetik asit (%4) ile oluşturulmuş bir kolit modeli çalışmasında ise *Bacillus clausii* de dahil olmak üzere farklı *Bacillus* türlerinin bulunduğu hazır preparat tedavi edici olarak uygulanmış ve MDA düzeylerinin bu grupta azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bunun sebebini, *Bacillus* türlerinin bir immunoregülatör ve antioksidan olarak görev yapan ekzopolisakkarit (EPS) sentezliyor olmasına bağlamışlardır. Böylelikle EPS'nin hücrelerin ROT seviyesi ile antioksidan mekanizmaları arasındaki dengeyi sağladığı belirtilmiştir (Cătean, ve diğerleri, 2020).

Literatürdeki sonuçları destekler nitelikte olan çalışmamızda, PB grubunun MDA seviyelerinde anlamlı ($p<0.05$) bir azalmaya sebep olduğunu gösterdik. PB grubundaki MDA seviyelerinin düşüşünü, literatürde belirtildiği gibi *B. calusii* probiyotığının EPS aracılığı ile antioksidatif etkinliğe sahip olmasına bağlamaktayız.

Çalışmamızda, kombine grubun MDA düzeyleri İBH grubu ile kıyaslandığında tıpkı PB grubunda olduğu gibi düşüş istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

PB ($p<0.05$) ve KOM ($p<0.05$) gruplarının MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş görülmekle birlikte, BA ($p<0.01$) grubundaki azalış istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı farklılığa sahiptir.

5.9. Bağırsak Dokusu Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Endojen bir antioksidan enzim olan katalaz, H_2O_2 'nin artan konsantrasyonlarına karşı bir yanıt olarak önemli görevler üstlenir (Izawa, Inoue, & Kimura, 1996). Bir diğer antioksidan enzim olan GPx ile birlikte katalaz enzimi; ürik asit, GSH ve E ile C vitaminleri gibi antioksidan moleküllerin hemen ardından seviyeleri artan ROT'lara karşı ikinci savunma duvarını oluşturmaktadır (Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018).

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, ROT ve RAT'ların Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının patomekanizmasında potansiyel bir role sahip olduğunu göstermektedir. İBH'de, aktivasyonu aşırı artmış olan makrofajlar ve polimorf nükleer lökositlerin mukozaya infiltrasyonu serbest radikallerin bölgesel artışına neden olmaktadır (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014). Bu nedenle antioksidan kapasitenin korunmasında intestinal mukozadaki endojen antioksidan enzimlerin aktiviteleri bir kez daha ön plana çıkmaktadır.

TNBS ile indüklenmiş kolit, oksidatif stres ve inflamatuvar hücrelerin mukozal infiltrasyon ile karakterizedir (Morris, ve diğerleri, 1989). TNBS ile indüklenmiş kolit modeli çalışmalarında, kontrol grubuna kıyasla hasta grupta katalaz aktiviteleri azalmaktadır (Lee, ve diğerleri, 2010a; Lee, ve diğerleri, 2010b; Yıldız, ve diğerleri, 2015). Klinik bir araştırmada ise Crohn hastalığına sahip bireylerin, hastalığın aktif yada inaktif olmasına bağlı olmadan, katalaz aktivitesinde kalıcı bir inhibisyon olduğunu belirtmişlerdir (Beltran, ve diğerleri, 2010).

TNBS ile İBH modeli oluşturduğumuz bu çalışmada, sıçanların bağırsak dokusu katalaz aktivitesi analiz edilmiştir. Literatürde genel olarak kolit gruplarında katalaz aktivitesinin düşmüş olduğu bildirilmişse de bizim çalışmamızda tam aksine İBH grubunun katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$) oluşturan bir artış tespit edilmiştir. Colares ve diğerleri (2016), kolit modeli oluşturdukları çalışmada, hasta grubun katalaz aktivitesinin istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, kolit modelinde meydana gelen değişimlerin kompanse edilmesi için aktive edilen bir mekanizma aracılığı ile katalaz aktivitesinin arttığını ileri sürmektedirler (Colares, ve diğerleri, 2016). Bizim de sonuçlarımız bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Daha önce yapmış olduğumuz ve borik asidin 100 mg/kg dozunu uyguladığımız farklı hayvan modeli çalışmalarında ve sinaptozomlar üzerinde yaptığımız *in vitro* bir araştırmada, borik asidin katalaz aktivitesi üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu bildirdik (Kar, ve diğerleri, 2018; Kar, ve diğerleri, 2019; Ataizi, ve diğerleri, 2019).

Bu tez çalışmasında, İBH grubuna göre kıyaslandığında, BA grubunun katalaz aktivitesinde bir düşüş gözlenmektedir; ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlam ($p>0.05$) ifade etmemektedir. Oksidatif stresin artması sonucu yükselen H_2O_2 'nin elimine edilmesinde görev alan katalazın aktivitesi artmaktadır. Borik asidin uygulandığı grupta katalaz aktivitesinin azalmış olması borik asidin antioksidatif etkinliğinin bir göstergesidir. Borik asit bir serbest radikal süpürücüsü gibi görev yaparak H_2O_2 seviyelerinin azalmasına ve dolayısı ile katalaz aktivitesinin azalmasına neden olarak İBH'de oluşan oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadır. Bazı araştırmacılara göre; borik asit bu etkisini, bir başka antioksidan molekül olan redükte glutatyon düzeylerini artırarak göstermektedir (Ince, ve diğerleri, 2011; Sogut, ve diğerleri, 2018).

Patel ve diğerleri (2020), asetaminofen ile indükleri hasarda tedavi edici olarak *Bacillus calusii* probiyotiği kullanmışlar ve SOD, katalaz ve GSH gibi endojen antioksidan enzimler ve moleküllerin analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Probiyotiğin MDA düzeylerinde azalmaya sebep olurken, endojen antioksidan mekanizmaların da iyileşmesine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımıza göre, PB grubu İBH grubu ile karşılaştırıldığında azalma istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.01$) göstermektedir.

PB grubunun, diğer iki tedavi grubuna kıyasla katalaz aktivitesi üzerinde daha fazla iyileştirici etkinlik göstermiş olduğu bulgularımızla ortaya koyulmuştur.

KOM grubunda İBH grubuna göre katalaz aktivitesinde azalmanın ($p>0.05$) olduğu görülmektedir. Üç tedavi grubunda (BA, PB ve KOM) da katalaz seviyeleri İBH grubuna kıyasla düşmüş olmakla birlikte, istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalmış ve iyileştirici etkinliği ön planda olan tek grup PB tedavi grubudur.

5.10. Bağırsak Dokusu GPx Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Diğer bir endojen antioksidan enzim olan GPx, tıpkı katalaz gibi hidrojen peroksite ve hidroperoksitlerin suya indirgenmesinde rol oynamaktadır (Margis, ve diğerleri, 2008). Yapılan genetik araştırmalar GPx enziminin eksikliğinin doğrudan İBH patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Esworthy, ve diğerleri, 2003; Häuser, ve diğerleri, 2015).

TNBS ile indüklenmiş bazı kolit modeli çalışmalarında araştırmacılar, hasta grubun GPx aktivitelerinde anlamlı bir azalış olduğunu belirtirken (Watanabe, ve diğerleri, 1998; Prakash, ve diğerleri, 2008; Maurer, ve diğerleri, 2020) bunların tersine, TNBS ile kolit modeli oluşturulmuş bir başka çalışmada; araştırmacılar, birinci hafta ve ikinci hafta için iki farklı deney düzeneği oluşturmuşlar ve her iki durum için de GPx aktivitesinin hasta grubunda artıyor olduğunu bildirmişlerdir (Nieto, ve diğerleri, 2000). Catana ve diğerleri (2018) yayınladıkları makalelerinde, DSS ve TNBS ile oluşturulmuş kolit modelini karşılaştırmışlardır. Sonuçlarına göre DSS grubunda GPx aktiviteleri artarken, TNBS grubunda ise GPx aktiviteleri kontrole göre azalmaktadır.

Bizim de kolit modeli oluşturduğumuz çalışmamızda, bağırsak dokusu GPx aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandığında İBH grubunda azalmıştır ($p<0.05$) ve bu açıdan literatürdeki bir çok çalışmayla uyumlu gözükmektedir. TNBS ile indüklediğimiz kolit modeli, bağırsak dokusunda, sadece inflamatuvar süreçlerle değil aynı zamanda ROT'un artarak oksidatif stresi oluşturması ile de ilgilidir. GPx aktivitesinin hasta grubunda azalmasının nedeni olarak, kolitte artan hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin süpürülmesinde görev alırken bir süre sonra yaşanan aktivite kayıpları olduğunu düşünmekteyiz.

Borik asit ile yapılan farklı hayvan modeli çalışmaları, hasta gruplarında düşen GPx aktivitesinin, borik asit uygulanan tedavi gruplarında yeniden artmış olduğunu göstermektedir (Sogut, ve diğerleri, 2015; Sogut, ve diğerleri, 2018; Hazman, ve diğerleri, 2018; Cengiz, 2018).

Borik asit uyguladığımız grubun, İBH grubuna göre GPx aktivitesindeki artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamakla birlikte minimal düzeyde bir iyileştirici etkisinin olduğu görülmektedir. Bununla birlikte BA grubundaki GPx aktivitesinin kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark göstermemesi de önemli bir bulgudur.

Erel ve Yılmaz (2018), sepsis modeli oluşturdıkları çalışmada tedavi edici olarak *B. calusii* probiyotiğini uygulamışlardır. Serum GPx aktivitesini ölçtükleri araştırmada, probiyotiğin uygulandığı grupta az bir miktar iyileşme görülmekle birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulmadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte farklı deney hayvanları ve modelleri ile yürütülen çalışmalarda, diğer *Bacillus* (*B. subtilis* ve *B. licheniformis*) probiyotik bakteri türlerinin, GPx aktivitesi üzerinde iyileştirici etkinliğinin bulunduğu belirtilmektedir (Bai, ve diğerleri, 2017; Chen, ve diğerleri, 2020)].

Çalışmamızda PB grubunun GPx aktivitesi incelendiğinde; İBH grubuna kıyasla aktivitenin daha da azaldığı görülmektedir. PB grubunun GPx aktivitesi Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise azalma istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0.001$) göstermektedir. PB grubu tüm gruplar arasında GPx aktivitesinin en düşük bulunduğu gruptur.

Borik asit ve probiyotiğin birlikte uygulandığı KOM grubunun GPx aktivitesi, İBH grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamış olsa bile bir miktar daha yüksek olduğu görülmektedir. Üç tedavi grubunun da GPx aktivitesi üzerinde net bir şekilde etkili olmadığı, buna rağmen BA ve KOM gruplarının PB grubuna göre nispeten daha etkili olduğu söylenebilmektedir.

5.11.Bağırsak Dokusu Histolojik İncelemeleri ve Skorlamaların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda bağırsak dokusu için histolojik incelemeler ile epitel hasar, inflamasyon, ödem, damar dilatasyonu ve damar konjesyonu olmak üzere beş farklı parametrenin skorlaması yapılmıştır.

Kontrol grubunun dokuları incelendiğinde, normal yapıdaki epitel hücreleri ile birlikte goblet hücrelerince zengin bir mukoza tabakası görülmektedir. Tunika mukoza tabakası, submukoza, muskular tabaka ve tunika adventisya tabakası normal morfolojik yapı göstermektedir. Skorlama sonuçları incelendiğinde ise beş parametrenin ortalaması olacak şekilde “0” yani hasar yok olarak bulunmuştur.

TNBS ile kolit indüklenmiş olan İBH grubunun histolojik görüntüleri incelendiğinde; mukozada yoğun bir hasar, goblet hücre kaybı, ödem, damar konjesyonu ve çok yoğun bir inflamasyon gözlenmektedir. Beş parametre için skorlama sonuçları incelendiğinde ortalama histolojik skorun “3” skorlamasına yakın yani çok yüksek hasar olduğu görülmektedir.

TNBS'nin oluşturduğu hasara karşı borik asit uyguladığımız tedavi grubunun histolojik incelemelerinde ise azalmış mukozal hasar, azalan goblet hücre sayısında yeniden artış ve bazı bölgelerde kısmi hasar olmasına rağmen normale biraz daha yakın bir görünüm gözlenmektedir. Epitel hasar, inflamasyon, ödem, damar dilatasyonu ve konjesyonu için yapılan skorlama sonuçlarına göre ortalama “2”ye yakın bir sonuç yani orta düzeyde hasar olduğu görülmektedir.

Kolit modelinde oluşan hasar karşı uygulamış olduğumuz probiyotik ve kombine (borik asit + *B. clausii*) gruplarındaki histolojik incelemelerde, İBH grubunda olduğu kadar olmamakla birlikte mukozada yoğun hasar, goblet hücre kaybı, ödem ve inflamasyon gözlenmektedir. Skorlama sonuçları incelendiğinde ise ortalama “2,5” olarak bulunmuş, yani hasarın orta düzey ile çok yüksek arasında olduğu görülmektedir.

Histolojik inceleme ve skorlama sonuçlarına göre İBH’de oluşan hasara karşılık borik asidin, probiyotik ve kombine grubuna göre daha çok iyileştirici özelliğe sahip olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya çapında insidansı ve prevalansı giderek aratan inflamatuvar bağırsak hastalıkları, gastrointestinal sistemdeki kronik inflamatuvarı, oksidatif stresi ve apoptotik süreçleri içeren idiopatik bir rahatsızlıktır.

Genetik yatkınlık, çevresel etkiler ve beslenme gibi birçok değişkene bağlı olarak gelişen İBH oldukça karmaşık bir patogeneze sahiptir. Bu durumlar bütünü, hastalığın araştırılmasında ve kesin tedavi çözümlerinin üretilmesinde kısıtlayıcı bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında TNBS ile oluşturulan sıçan İBH modelinde; serum, tam kan ve bağırsak dokusu örneklerinin biyokimyasal ve histolojik bulguları doğrultusunda, mukozal hasar, inflamasyon ve oksidatif hasar tespit edildi.

Oluşturduğumuz bu modeldeki hasara karşılık; borik asit, probiyotik (*B. clausii*) ve bunların kombinasyonları tedavi edici olarak uygulandı. Kapsamlı bir literatür taraması ardından, *B. clausii*'nin İBH üzerinde uygulandığı ve tedavi edici etkinliğinin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışmaya rastlanırken; borik asidin, hem tek başına hem de *B. clausii* probiyotiği ile kombine olarak uygulandığı hiçbir çalışmaya rastlanmamış olması bu tez araştırmasını özgün kılmaktadır.

Bu çalışmada borik asit; MPO aktivitesini, TNF- α seviyesini ve iNOS'un protein ekspresyonunu azaltıp, IL-35 seviyesini artırmış ve böylece anti-inflamatuvar bir etkinlik göstermiştir. Bununla birlikte NO seviyeleri üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Ayrıca borik asit, MDA seviyelerinde azalmaya ve minimal düzeylerde olsa da GPx ve katalaz gibi enzimlerin aktivitesinde iyileşmeye neden olarak antioksidatif bir etki göstermiştir.

B. clausii uyguladığımız grupta, MPO aktivitesinin, TNF- α ile NO seviyesinin ve iNOS'un protein ekspresyonunun azalmış, IL-35 seviyesinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte probiyotik, MDA seviyelerinin azalmasına neden olurken, katalaz aktivitesi üzerinde yüksek düzeyde etkili olduğu ortaya koyulmuştur. Buna karşılık probiyotik grubunun GPx aktivitesinde bir miktar düşüş belirlenmiştir.

Ülseratif kolitin akut inflamasyon sürecini araştırdığımız bu çalışmadan elde edilecek çıkarımlardan biri, hem inflamatuvar süreçlerin hem de oksidatif hasarın azalmasında, borik asit tedavisinin, probiyotik ve kombine tedavi gruplarına göre daha ön planda olduğudur. Bununla birlikte probiyotik ve kombine grubunun da iyileştirici bir etkinliği olduğu açıktır. Bu sonuçlar hem biyokimyasal hem de histolojik analizler ile desteklenmiştir.

İBH modellerinde, borik asidin çalışılmamış ve *B. clausii* probiyotiği ile yapılmış kısıtlı çalışmanın olması, literatürde doldurulması gereken bir alandır. Bu kapsamda borik asit tedavisi ile ilgili ilk bilgiler bu tez çalışmasında ortaya konmuştur.

Borik asit ve *B. calusii* probiyotiğinin hem İBH üzerindeki etkilerinin hem de doğrudan İBH'nin moleküler mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için inflamatuvar yanıtı taklit edebilen ko-kültür çalışmaları ile desteklenmesi önerilebilir. Bununla birlikte, klinik araştırmalar için büyük önem teşkil eden deney hayvanı modelleri üzerinde, borik asit ve probiyotiğin farklı dozlarının uygulanacağı pre-tedavi ve post-tedavi çalışmalar, ayrıca borik asitle uygulanacak farklı kombine çalışmalar tasarlanması önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M. G., Arranz, A., Leceta, J., Delgado, M., & Gomariz, R. P. (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of crohn's disease. *Gastroenterology*, 124(4), 961-971.
- Abd-Elhakim, Y. M., Hashem, M. M., Abo-EL-Sooud, K., Ali, H. A., Anwar, A., El-Metwally, A. E., Mahmoud, E. A., & Moustafa, G. G. (2020). Involvement of tumor necrosis factor- α , interferon gamma- γ , and interleukins 1 β , 6, and 10 in immunosuppression due to long-term exposure to five common food preservatives in rats. *Gene*, 1-10.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* (105), 121-126.
- al-Qayim, M. A., & Abass, D. E. (2014). Effects of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) on liver functions in experimental colitis in rats. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 38(2), 48-54.
- Amaretti, A., di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 809–817.
- Ameho, C. K., Adjei, A. A., Harrison, E. K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y., Ito, E., Suzuki, I., Kulkarni, A., Kawajiri, A., & Yamamoto, S. (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor a production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*, (41), 487–493.
- Ancha, H. R., Kurella, R. R., McKimmey, C. C., Lightfoot, S., & Harty, R. F. (2009). Effects of n-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 758–766.
- Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F. J., Pique, J. M., & Fernandez-Checa, J. C. (2000). Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Laboratory Investigation*, 80(5), 735-744.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ardizzone, S. (2003). Ulcerative Colitis. *Orphanet Encyclopedia*, 1-8. website: <https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-UC.pdf>
- Arnold, J. (2004). Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*, 69(1), 8-15.
- Ashraf, R., Vasiljevic, T., Day, S. L., Smith, S. C., & Donkor, O. N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 395-409.
- Ataizi, Z., Ozkoc, M., Kanbak, G., Karimkhani, H., Burukoglu Donmez, D., Ustunisik, N., & Ozturk, B. (2019). Evaluation of the neuroprotective role of boric acid in preventing traumatic brain injury-mediated oxidative stress. *Turkish Neurosurgery*, 1-7.
- Avdagić, N., Zaćiragić, A., Babić, N., Hukić, M., Šeremet, M., Lepara, O., & Nakaš-Ićindić, E. (2013). Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(1), 5-9.
- Ayala, A., Munoz, M., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-31.
- Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., He, J., Zhang, L., & Wang, T. (2017). Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 74-82.
- Barreau, F., Ferrier, J., Fioramonti, J., & Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Neurogastroenterology*, 501-506.
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380, 1590-1605.
- Bayramoğlu, G., Şentürk, H., Kanbak, G., Canbek, M., Bayramoğlu, A., Dokumacıoğlu, E., & Engür, S. (2020). Gallic acid reduces experimental colitis in rats by downregulation of cathepsin and oxidative stress. *Erciyes Medical Journal*, 42(2), 213-217.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bedani, R., Saad, S. M., & Sivieri, K. (2016). Potential benefits of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the intestinal microbiota of the elderly. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, 525-538.
- Beltran, B., Nos, P., Dasi, F., Iborra, M., Bastida, G., Martí'nez, M., O'connor, J-E., Saez, G., Moret, I., & Ponce, J. (2010). Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohns's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(1), 77-86.
- Betteridge, D. (2000). What is oxidative stress? *British Journal of Pharmacology*, 49(2), 3-8.
- Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- Bruckdorfer, R. (2005). The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, 3-31.
- Burner, U., Furtmüller, P. G., Kettle, A. J., Koppenol, W. H., & Obinger, C. (2000). Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20597-20601.
- Cao, J., Jiang, L., Zhang, X., Yao, X., Geng, C., Xue, X., & Zhong, L. (2008). Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 189-195.
- Catalan-Diebné, J., McIntyre, L. L., & Zlotnik, A. (2018). Interleukin 30 to interleukin 40. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 38, 423-439.
- Catana, C. S., Magdas, C., Tabaran, F. A., Craciun, E. C., Deak, G., Magdaş, V. A., Cozma, V., Gherman, C. M., Berindan-Neagoe, I., & Dumitraşcu, D. L. (2018). Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(5), 599-607.
- Catinean, A., Neag, M. A., Krishnan, K., Muntean, D. M., Bocsan, C. I., Pop, R. M., Mitre, A. O., Melincovici, C.S., & Buzoianu, A. D. (2020). Probiotic *Bacillus* spores together with amino acids and immunoglobulins exert protective effects on a rat model of ulcerative colitis. *Nutrients*, 1-18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Celikbilek, M., Dogan, S., Ozbakır, O., Zararsız, G., Küçük, H., Gürsoy, S., Yurci, A., Güven, K., & Yücesoy, M. (2013). Neutrophil–lymphocyte ratio as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*(27), 72–76.
- Cengiz, M. (2018). Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cellular and Molecular Biology*, 11-14.
- Cengiz, M., Altuner, Y., Sahinturk, V., Ozden , H., Senturk, H., Bayramoglu, G., Burukoglu Donmez, D., Sahin, I., & Ayhanci, A. (2012). Lycopene protects liver against ulcerative colitis. *Current Drug Therapy*, (7), 24-29.
- Cengiz, M., Cetik Yildiz, S., Demir, C., Kulcanay Şahin, İ., & Teksoy, Ö. (2019). Hepato-preventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, (53), 1-7.
- Chami, B., Martin, N. J., Dennis, J. M., & Witting, P. K. (2018). Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 61-71.
- Chen, M., Chen, X.-Q., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., & Niu, J. (2020). Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*). *Aquaculture Reports*, 1-11.
- Chiarpotto, E., Scavazza, A., Leonarduzzi, G., Camandola, S., Biasi, F., Teggia, P. M., Garavoglia, M., Robecchi, A., & Poli, G. (1997). Oxidative damage and transforming growth factor beta-1 expression in pretumoral and tumoral lesion of human intestine. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 889–894.
- Cioffi, M., Rosa, A. D., Serao, R., Picone, I., & Vietri, M. T. (2015). Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 13-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Colares, J. R., Schemitt, E. G., Hartmann, R. M., Moura, R. M., Morgan-Martins, M. I., Fillmann, H. S., Fillmann, L., & Marroni, N. P. (2016). Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Journal of Coloproctology*, 97-103.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 1-6.
- Cooke, C.-L. M., & Davidge, S. T. (2001). Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappa B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 395-402.
- Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clinical Chemistry*, (36), 1440-1443.
- Cross, R. K., & Wilson, K. T. (2003). Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9(3), 179–189.
- Cury, D. B., Mizsputen, S. J., Versolato, C., Mijji, L. O., Pereira, E., Delboni, M. A., Schor, N., & Moss, A. C. (2013). Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. *Cellular Immunology*, 66–70.
- Cutting, S. M. (2010). Bacillus probiotics. *Food Microbiology*, 28, 214-220.
- d'Alessio, P. A., Ostan, R., Bisson, J.-F., Schulzke, J. D., Ursini, M. V., & Bene, M. C. (2013). Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sciences*, 1151–1156.
- Dar, H. Y., Pal, S., Shukla, P., Mishra, P. K., Tomar, G. B., Chattopadhyay, N., & Srivastava, R. K. (2018). Bacillus clausii inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice model. *Nutrition*, (54), 118–128.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Dargahi, N., Johnson, J., Donkor, O., Vasiljevic, T., & Apostolopoulos, V. (2019). Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? *Maturitas*, (119), 25-38.
- Davies, M. (2011). Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1), 8-19.
- de Mattos, B. R., Garcia, M. P., Nogueira, J. B., Paiatto, L. N., Albuguerque, C. G., Souza, C. L., Fernandes, L. G. R., Tamashiro, W. M., & Simioni, P. U. (2015). Inflammatory bowel disease: An overview immun mechanisms and biological treatments. *Mediators of Inflammation*, 1-11.
- Demirci, S., Doğan, A., Aydın, S., Dülger, E. Ç., & Şahin, F. (2016). Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 119-133.
- Di Caro, S., Tao, H., Grillo, A., Franceschi, F., Elia, C., Zocco, M. A., Gasbarrini, G., Sepulveda, A. R., & Gasbarrini, A. (2005). Bacillus clausii effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, 951–960.
- Ding, X., Hiraku, Y., Ma, N., Kato, T., Saito, K., Nagahama, M., Semba, R., Kuribayashi, K., & Kawanishi, S. (2005). Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Science*, 96(3), 157-163.
- Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H., & Ruddle, N. H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*, 344-353.
- Endharti, A. T., & Permana, S. (2017). Extract from mango mistletoes Dendrophthoe pentandra ameliorates TNBS-induced colitis by regulating CD4+ T cells in mesenteric lymph nodes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
- Erel, V. K., & Yılmaz, E. M. (2018). Protective effect of B.clasuii on sepsis. *The Annals of Eurasian Medicine*, 20-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Esworthy, R. S., Binder, S. W., Doroshov, J. H., & Chu, F. F. (2003). Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 384, 597-607.
- Fagerhol, M. K., Nielsen, H. G., Vetlesen, A., Sandvik, K., & Lyberg, T. (2005). Increase in plasma calprotectin during long-distance running. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, (65), 211-220.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Garside, P. (1999). Cytokines in experimental colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, (118), 337-339.
- Gerhard, R. (2017). Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 1-10.
- Geyikoglu, F., Koc, K., Erol, H. S., Colak, S., Ayer, H., Jama, S., Eser, G., Dortbudak, M. B., & Saglam, Y. S. (2019). The propolis and boric acid can be highly suitable, alone/or as a combinatory approach on ovary ischemia-reperfusion injury. *Gynecologic Endocrinology and Reproductive Medicine*, 1405–1412.
- Ghafar, H., Yasa, N., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Zamani, M. J., Nikfar, S., Khorasani, R., Minaie, B., & Abdollahi, M. (2006). Protection by Ziziphora clinopoides of acetic acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. *Human & Experimental Toxicology*, 25, 325-332.
- Ghazanfari, G., Minaie, B., Yasa, N., Nakhai, L. A., Mohammadirad, A., Nikfar, S., Dehghan, G., Boushehri, V. S., Jamshidi, H., Khorasani, R., Salehnia, A. & Abdollahi, M. (2006). Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of satureja khuzestanica jamzad essential oil on the mouse model of inflammatory bowel diseases. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16, 365–372.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Giriş, M., Erbil, Y., Doğru Abbasoğlu, S., Tulumoğlu Yanık, B., Alış, H., Olgaç, V., & Aykaç Toker, G. (2007). The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on TNBS-induced colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 591-599.
- Girotti, A. (1985). Mechanisms of Lipid Peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1, 87-95.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, (177), 751-766.
- Groetsky, T., Dirisina, R., Sinh, P., Mittal, N., Managlia, E., Williams, D. B., Posca, D., Ryu, H., Katzman, R. B., & Barrett, T. A. (2012). P53 mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. *Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Pancreatic Pathology*, 181, 1306-1315.
- Guillén-Sans, R., & Guzmán-Chozas, M. (2010). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 315-330.
- Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British Journal of Experimental Pathology*, 70, 737-757.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Free radicals and antioxidants*, 344, 721-724.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-725.
- Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V., & Falk, W. (2000). The role of the resident intestinal flora in acute and Crohnic dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 267-273.
- Häuser, F., Rossmann, H., Laubert-Reh, D., Wild, P. S., Zeller, T., Müller, C., Neuwirth, S., Blankenberg, S., & Lackner, K. J. (2015). Inflammatory bowel disease (IBD) locus 12: is glutathione peroxidase-1 (GPX1) the relevant gene? *Genes & Immunity*, 571-575.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Erkan Uysal, F., & Çelik, S. (2018). The effect of boric acid and borax on oxidative stress, inflammation, ER stress and apoptosis in cisplatin toxication and nephrotoxicity developing as a result of toxication. *Inflammation*, 1032-1048.
- Head, K. A., & Jurenka, J. S. (2003). Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis – pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative Medicine Review*, 8(3), 247-283.
- Hegazy, S. K., & El-Bedewy, M. M. (2010). Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 4145-4151.
- Herias , M. V., Koninkx, J., Vos, J., Huis in't Veld, J., & van Dijk, J. (2005). Probiotic effects of Lactobacillus casei on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology*, (103), 143– 155.
- Ho, T. H., Duc, L. H., Isticato, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P. H., & Cutting, S. M. (2001). Fate and dissemination of Bacillus subtilis spores in a murine model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3819–3823.
- Horton, A., & Fairhurst, S. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 18(1), 27-79.
- Idiz, U. O., Aysan, E., Firat, D., Ercan, C., Demirci, S., & Sahin, F. (2019). Effects of boric acid-linked ampicillin on the rat intra-abdominal sepsis model. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2), 477-481.
- Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., & Kucukkurt, I. (2011). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3), 285-292.
- Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, F., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 161–164.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(1), 61-67.
- Kane, S. V. (2005). Systematic review: adherence issues in the treatment of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23, 577-585.
- Kankuri, E., Asmawi, M. Z., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Moilanen, E. (1999). Induction of iNOS In A Rat Model of Acute Colitis. *Inflammation*, 23(2), 141-152.
- Kappelman, M. D., Rifas-Shiman, S. L., Kleinman, K., Ollendorf, D., Bousvaros, A., Grand, R. J., & Finkelstein, J. A. (2007). The prevalence and geographic distribution of crohn's disease and ulcerative colitis in the united states. *Clinical Gastroenterology and hepatology*, 5, 1424-1429.
- Kar, F., Hacıoğlu, C., Sentürk, H., Donmez Burukoglu, D., & Kanbak, G. (2019). The role of oxidative stress, renal inflammation, and apoptosis in post ischemic reperfusion injury of kidney tissue: The protective effect of dose-dependent boric acid administration. *Biological Trace Element Research*, 1-9.
- Kar, F., Hacıoğlu, C., Özkoç, M., Üstünişik, N., Bütün, A., Uslu, S., & Kanbak, G. (2018). The new perspective neuroprotective effect of boric acid against ethanol-induced oxidative damage on synaptosome. *Journal of Applied Biological Sciences*, 12(2), 28-33.
- Karihtala, P., & Soini, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 115, 81-103.
- Karimkhani, H., Özkoç, M., Shojaolsadati, P., Uzuner, K., Burukoglu Donmez, D., & Kanbak, G. (2020). Protective effect of boric acid and omega-3 on myocardial infarction in an experimental rat model. *Biological Trace Element Research*, 1-9.
- Kimura, H., Miura, S., Shigematsu, T., Ohkubo, N., Tsuzuki, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Akiba, Y., Hokari, R., Hirokawa, M., Serizawa, H., & Ishii, H. (1997). Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- mucosa of patients with active ulcerative colitis and crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(5), 1047-1054.
- Knowles, R., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298, 249-258.
- Koch, T. R., Yuan, L.-X., Stryker, S. J., Ratliff, P., Telford , G. L., & Opara, E. C. (2000). Total Antioxidant Capacity of Colon in Patients with Crohnic Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(9), 1814–1819.
- Kolias, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 427-437.
- Kruidenier, L., & Verspaget, H. W. (2002). Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 1997-2015.
- Kruidenier, L., Kuiper, I., Lamers, C. B., & Verspaget, H. W. (2003). Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *Journal of Pathology*, 201(1), 28-36.
- Kuhn, M. A. (2003). Oxygen free radicals & antioxidants. *American Jorunal of Nursing*, 103(4), 58-62.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2003). *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Saunders.
- Larrosa, M., Yanez-Gascon, M., Selma, M., Gonzalez-Sarrisa, A., Toti, S., Ceron, J., Tomas-Barberan, F., Dolara, P. & Espin, J. C. (2009). Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (57), 2211–2220.
- Lee, I.-A., Hyun, Y.-J., & Kim, D.-H. (2010). Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF-κB activation. *European Journal of Pharmacology*, 162-170.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lee, I.-A., Park, Y.-J., Yeo, H.-K., Han, M. J., & Kim, D.-H. (2010). Soyasaponin I Attenuates TNBS-Induced Colitis in Mice by Inhibiting NF-KB Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10929–10934.
- Li, W. F., Deng, B., Cui, Z. W., Fu, L. Q., Chen, N. N., Zhou, X. X., Shen, W. Y., & Yu, D. Y. (2012). Several Indicators of Immunity and Antioxidant Activities Improved in Grass Carp Given a Diet Containing Bacillus Additive. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2392-2397.
- Li, X.-L., Cai, Y.-Q., Qin, H., & Wu, Y.-J. (2008). Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 841–849.
- Lih-Brody, L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G. S., Katz, S., Floyd, R. A., McKinley, M. J., Fisher, S. E., & Mullin, G. E. (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10), 2078-2086 .
- Lima, F. R. (2018). Bacillus clausii attenuates 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Doktora Tezi, Federal Ceará Üniversitesi*, Fortaleza.
- Liu, L., Yuan, S., Sun, Y., Long, Y., Li, Y., Niu, Y., Li, C., Gan, H., Cao, S., & Mei, Q. (2009). The possible mechanisms of Fructus Mume pill in the treatment of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Journal of Ethnopharmacology*(126), 557–564.
- Liu, X., & Wang, J. (2011). Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of Folium syringae leaves on TNBS-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 780–787.
- Liu, Y., Wang, X.-Y., Yang, X., Jing, S., Zhu, L., & Gao, S.-H. (2013). Lung and intestine: A specific link in an ulcerative colitis rat model. *Gastroenterology Research and Practice*, 1-13.
- Liu, Y., Xiang, J., Liu, M., Wang, S., Lee, R. J., & Ding, H. (2011). Protective effects of glycyrrhizic acid by rectal treatment on a TNBS-induced rat colitis model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (63), 439–446.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lopetusa, L. R., Scaldaferri, F., Franceschi, F., & Gasbarrini, A. (2016). Bacillus clausii and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10(8), 943-948.
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957-1997.
- Maaser, C., Sturm, A., Vavricka, S. R., Kucharzik, T., Fiorino, G., Annese, V., Annese, E., Baumgart, D. C., Bettenworth, D., Nunes, P. B., Burisch, J., Castiglione, F., Eliakim, R., Ellul, P., González-Lama, Y., Gordon, H., Halligan, S., Katsanos, K., Kopylov, U., Kotze, P. G., Krustiņš, E., Laghi, A., Limdi, J. K., Rieder, F., Rimola, J., Taylor, S. A., Tolan, D., van Rheenen, P., Verstockt, B., & Stoker, J. (2019). ECCO-ESGAR guideline for diagnostic assessment in inflammatory bowel disease part I: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(2), 144-164.
- Majno, G., & Joris, I. (2004). *Cells, Tissues, and Disease*. Oxford: Oxford University Press.
- Malo, M. S., Alam, S. N., Mostafa, G., Zeller, S. J., Johnson, P. V., Mohammad, N., Chen, K. T., Moss, A. K., Ramasamy, S., Faruqui, A., Hodin, S., Malo, P. S., Ebrahimi, F., Narisawa, S., Millan, J. L., Warren, H. S., Kaplan, J. B., Kitts, C. L., Hohmann, E. L., & Hodin, R. A. (2010). Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*, (59), 1476-1484.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 3959–3970.
- Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Natura Immunology*, 12, 5-9.
- Masoodi, I., Kochhar, R., Dutta, U., Vaishnavi, C., Prasad, K. K., Vaiphei, K., Hussain, S., & Singh, K. (2012). Evaluation of fecal myeloperoxidase as a biomarker of disease activity and severity in ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 1336-1340.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Mates, J. M., Perez-Gomez, C., & de Castro, I. N. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.
- Mateus, V., Rocha, J., Mota-Filipe, H., Sepodes, B., & Pinto, R. (2018). Hemin reduces inflammation associated with TNBS-induced colitis. *Clinical and Experimental Gastroenterology*(11), 325-334.
- Maurer, L. H., Betim Gazarin, C. B., Quatrin, A., Nichelle, S. M., Minuzzi, N. M., Teixeira, G. F., da Cruz, I. B. M., Junior, M. R. M., & Emanuelli, T. (2020). Dietary fiber and fiber-bound polyphenols of grape peel powder promote GSH recycling and prevent apoptosis in the colon of rats with TNBS-induced colitis. *Journal of Functional Foods*, 1-9.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 428-435.
- Mei, Q., Xu, J.-M., Xiang, L., Hu, Y.-M., Hu, X.-P., & Xu, Z.-W. (2005). Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. *Postgraduate Medical Journal*, 667-672.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of Crohnic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(3), 795-803.
- Mugesh, G., & Singh, H. B. (2000). Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chemical Society Reviews*, 29, 347-357.
- Murray, F. J. (1998). A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biological Trace Element Research*, 66, 331-341.
- Nan, Z., Fan, H., Tang, Q., Zhang, M., Xu, M., Chen, Q., Liu, Y., Dong, Y., Wu, H., & Deng, S. (2018). Dual expression of CXCR4 and IL-35 enhances the therapeutic effects of BMSCs on TNBS-induced colitis in rats through expansion of Tregs and suppression of Th17 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 727-734.
- Nathan, C., & Xie, Q.-w. (1994). Nitric Oxide Synthase: Roles, Tolls, and Controls. *Cell*, 78, 915-918.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Immunology*, 14, 329-342.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Büschenfelde, K.-H. M., Strober, W., & Kollias, G. (1997). Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *European Journal of Immunology*(27), 1743-1750.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *The Gut Microbiota*, 336, 1262-1267.
- Nieto, N., Torres, M. I., Fernandez, M. I., Giron, M. D., Rios, A., Suarez, M. D., & Gil, A. (2000). Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(9), 1820-1827.
- Nieto, N., Torres, M. I., Fernandez, M. I., Giron, M. D., Rios, A., Suarez, M. D., & Gil, A. (2000). Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences*, 1820-1827.
- Nurdan, T., Atug, O., Imeryuz, N., Hamzaoglu, H. O., Tiftikci, A., Parlak, E., Dagli, U., Ulker, A., Hulagu, S., Akpinar, H., Tuncer, C., Suleymanlar, I., Ovunc, O., Hilmioglu, F., Aslan, S., Turkdogan, K., Bahcecioglu, H. I., & Yurdaydin, C. (2009). Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(1), 51-7.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 688–693.
- Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., & Mori, M. (2013). Increased TH17-inducing activity of CC14+ CD163low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with crohn's disease. *Gastroenterology*, 145, 1380–1391.
- Ohkawa, H., Ohisi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*(95), 351-358.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pallone, F., & Monteleone, G. (2001). Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 17, 307-312.
- Patel, C., Patel, P., & Acharya, S. (2020). Therapeutic prospective of a spore-forming probiotic—*Bacillus clausii* UBBC07 against acetaminophen-induced uremia in rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 253-258.
- Patel, R., McAndrew, J., Sellak, H., White, C., Jo, H., Freeman, B., & Darley-Usmar, V. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, 385-400.
- Pfeffer, L. M. (2011). The Role of Nuclear Factor κ B in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(7), 553-559.
- Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 605-620.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Prakash, A., Medhi, B., Avti, P. K., Saikia, U. N., Pandhi, P., & Khanduja, K. L. (2008). Effect of Different Doses of Manuka Honey in Experimentally Induced Inflammatory Bowel Disease in Rats. *Phytotherapy Research*, 1511–1519.
- Qayim, M., & Bakhit, N. (2016). Effect of *Lactobacillus acidophilus* on some physiological and immunological aspects in experimentally induced colitis in rats. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(9), 476-488.
- Rana, S. V., Sharma, S., Prasad, K. K., Sinha, S. K., & Singh, K. (2014). Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India. *Indian Journal of Medical Research*, 139(4), 568-571.
- Rezaie, A., Parker, R. D., & Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 2015-2021.
- Robbins, K. (1997). *Basic Pathology*. Philadelphia: Saunders.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Gratadoux, J., Fourage, C., Hœvler, C., Corthier, G., & Langella, P. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microbial Cell Factories*, 6(22), 1-10.
- Rubin, E., & John, L. F. (1999). *Pathology*. ABD: Lippincott Williams and Wilkins.
- Saiki, T. (1998). Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease. *Kurume Medical Journal*, 69-73.
- Sands, B. E. (2015). Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1-40.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 204-211.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S., Jegaethesan, J., Clancy, R., & Pierce, J. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21, 24-28.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 859-904.
- Shanahan, F. (2002). Crohn's disease. *The Lancet*, 359, 62-69.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-291.
- Simsek, F., Inan, S., & Korkmaz, M. (2019). An in vitro study in which new boron derivatives maybe an option for breast cancer treatment. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*, 3(1), 22-27.
- Sogut, I., Oglakci, A., Kartkaya, K., Kusat Ol, K., Savasan Sogut, M., Kanbak, G., & Erden Inal, M. (2015). Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1023-1027.
- Sogut, I., Paltun, S. O., Tuncdemir, M., Ersoz, M., & Hurdag, C. (2018). The antioxidant and antiapoptotic effects of boric acid on hepatotoxicity in Crohnic alcohol-fed rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Soliman, S., Wadie, W., Shouman, S., & Ainshoka, A. (2018). Sodium selenite ameliorates both intestinal and extra-intestinal changes in acetic acid-induced colitis in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, (391), 639–647.
- Soyturk, M., Saygili, S. M., Baskin, H., Sagol, O., Yilmaz, O., Saygili, F., & Akpinar, H. (2012). Effectiveness of *Saccharomyces boulardii* in a rat model of colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(44), 6452-6460.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1993). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, 132, 345-352.
- Swidsinsk, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., & Hale, L. P. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 1131–1140.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature*, 662-680.
- Tabari, M. V., Moein, S., Qujeq, D., Kashifard, M., Shirvani, J. S., Tilaki, K. H., & Farshidfar, G. (2017). Evaluation of the potential antioxidant role of high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) in patients with ulcerative colitis. *Annals of Colorectal Research*, 1-6.
- Tedder, T. F., & Leonard, W. J. (2014). Autoimmunity: regulatory B cells—IL-35 and IL21 regulate the regulators. *Nature Review Rheumatology*, 10(8), 452-453.
- Tehrani, S. H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1-8.
- Tham, D. M., Whitin, J. C., & Cohen, H. J. (2002). Increased Expression of Extracellular Glutathione Peroxidase in Mice with Dextran Sodium Sulfate-Induced Experimental Colitis. *Pediatric Research*, 51(5), 641-646.
- Togawa, J. I., Nagase, H., Tanaka, K., Inamori, M., Nakajima, A., Ueno, N., Saito, T., & Sekihara, H. (2002). Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (17), 1291–1298.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2016). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1-15.
- Türkez, H., Geyikoğlu, F., Tatar, A., Keleş, S., & Özkan, A. (2014). Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 889-896.
- Urdaci, M. C., Bressollier, P., & Pinchuk, I. (2004). *Bacillus clausii* probiotic strains antimicrobial and immunomodulatory activities. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38(3), 86-90.
- Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2006). Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*, 426-431.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9, 1-15.
- Watanabe, T., Fujii, J., Suzuki, K., Fujii, T., Asahi, M., Matsuoka, K., & Taniguchi, N. (1998). Dysfunction of antioxidative enzymes in the trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis rat. *Pathophysiology*, 191–198.
- Weidenbach, H., Leiz, S., Nussler, A. K., Dikopoulos, N., Bachem, M., Buttenschoen, K., Reinshagen, M., Beger, H. G., Adler, G., & Schmid, R. M. (2000). Disturbed bile secretion and cytochrome P-450 function during the acute state of experimental colitis in rats. *Journal of Hepatology*(32), 708-717.
- Wirtz, S., & Neurath, M. F. (2000). Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *International Journal of Colorectal Disease*(15), 144-160.
- Wirtz, S., Billmeier, U., Mchedlidze, T., Blumberg, R. S., & Neurath, M. F. (2011). Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-Cell–dependent colitis. *Gastroenterology*, 141, 1875–1886.
- Xu, C.-L., Guo, Y., Qiao, L., Ma, L., & Cheng, Y.-Y. (2017). Recombinant expressed vasoactive intestinal peptide analogue ameliorates TNBS-induced colitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 24(6), 706-715.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Xu, M., Tao, J., Yang, Y., Tan, S., Liu, H., Jiang, J., Zheng, F., & Wu, B. (2020). Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis. *Cell Death & Disease*, 11(86), 1-13.
- Xue, J.-M., Ma, F., An, Y.-F., Suo, L.-M., Geng, X.-R., Song, Y.-N., MO, L.-H., Luo, X.-., Zhang, X.-W., Liu, D.-B., Zhao, C.-Q., & Yang, P.-C. (2019). Probiotic extracts ameliorate nasal allergy by inducing interleukin-35-producing dendritic cells in mice. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 1289-1296.
- Yildiz, G., Yildiz, Y., Ulutas, P. A., Yaylali, A., & Ural, M. (2015). Resveratrol Pretreatment Ameliorates TNBS Colitis in Rats. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 9(2), 134-140.
- Zhang, B., Liu, Y., Lan, X., Zhang, X., Li, X., Zhao, Y., Li, G., Du, C., Lu, S., & Wang, H. (2018). Oral Escherichia coli expressing IL-35 meliorates experimental colitis in mice. *Journal of Translational Medicine*, 1-10.
- Zhou, Y.-H., Yu, J.-P., Liu, Y.-F., Teng, X.-J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S.-Q., & Yu, H.-G. (2006). Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD,MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators of Inflammation*, 1-9.

