

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BESLENME VE DİYETETİK**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**ASETİK ASİT İLE DENEYSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA, NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON'UN  
(NHDC, C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>) OLASI KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**İLAYDA ERDEM**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Serdal ÖĞÜT**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBF-22004 proje numarası ile ve TÜBİTAK tarafından 123S011 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2023**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Serdal ÖĞÜT'e ve eş danışmanım Dr. Serdar AKTAŐ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
RESİMLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ülseratif Kolitin Tanımı .....	3
2.2. Epidemiyoloji .....	3
2.3. Patofizyoloji .....	4
2.3.1. Genetik Faktörler.....	4
2.3.2. Mikrobiyota .....	5
2.3.3. Çevresel Faktörler.....	5
2.3.4. Oksidatif Stres ve İmmünolojik Faktörler .....	7
2.4. Tanı ve Klinik Bulgular.....	8
2.4.1. Laboratuvar Bulguları.....	11
2.4.2. Endoskopik Bulgular .....	13
2.4.3. Görüntüleme Yöntemleri.....	13
2.5. Komplikasyonlar .....	14
2.6. Tedavi .....	14

2.7. Neohesperidin Dihidrokalbon.....	15
2.8. Literatür Taraması .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç.....	19
3.1.1. Deney Hayvanları.....	19
3.1.2. Deney Grupları .....	19
3.2. Yöntem .....	24
3.2.1. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri .....	24
3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi .....	26
3.2.3. İmmünohistopatolojik Değerlendirme Yöntemi.....	26
3.2.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi .....	27
4. BULGULAR .....	28
4.1. Biyokimyasal Bulgular .....	28
4.2. Histopatolojik Bulgular .....	42
4.3. İmmünohistopatolojik Bulgular.....	47
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	55
KAYNAKLAR.....	56
EKLER .....	64
Ek 1 (ADÜ-HADYEK) .....	64
BİLİMSEL ETİK BEYANI .....	65
ÖZ GEÇMİŞ.....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>8-OHdG</b>	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CCl<sub>4</sub></b>	: Karbon tetraklorür
<b>CMC</b>	: Karboksimetil Selüloz
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz 2
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	: İnterferon- $\gamma$
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>İBH</b>	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nükleer faktör-kappa B
<b>NHDC</b>	: Neohesperidin Dihidrokalton
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Durum
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- $\beta$ 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Durum
<b>ÜK</b>	: Ülseratif Kolit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ülseratif kolit gelişimi için anahtar risk faktörleri.....	4
Şekil 2. Montreal sınıflandırmasına göre ülseratif kolit fenotipleri .....	9
Şekil 3. 8-OHdG düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.....	30
Şekil 4. Katalaz düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	31
Şekil 5. COX-2 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	32
Şekil 6. IL-10 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	33
Şekil 7. MDA düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	34
Şekil 8. MPO düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.....	35
Şekil 9. NF-Kb düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	36
Şekil 10. TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.....	37
Şekil 11. TNF- $\alpha$ düzeylerinin gruplar arasında dağılımı.....	38
Şekil 12. TAS düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	39
Şekil 13. TOS düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	40
Şekil 14. IFN- $\gamma$ düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	41
Şekil 15. IL-6 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	42

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Deneyin uygulanışı .....	23
<b>Resim 2.</b> Kontrol grubundaki hayvanların makroskopik değerlendirilmesi .....	23
<b>Resim 3.</b> Kontrol grubu: Normal kolon yapısı ve epitel dokusu (H&E x 40) .....	43
<b>Resim 4.</b> Kolit grubu (H&E x 40).....	44
<b>Resim 5.</b> NHDC tedavi grubu (H&E x 40).....	45
<b>Resim 6.</b> NHDC koruyucu tedavi grubu (H&E x 40).....	46
<b>Resim 7.</b> Kaspaz-3, Kontrol grubu.....	49
<b>Resim 8.</b> Kaspaz-3, Kolit grubu.....	49
<b>Resim 9.</b> Kaspaz-3, Tedavi grubu (H&E x 40).....	50
<b>Resim 10.</b> Kaspaz-3, Koruyucu tedavi grubu (H&E x 40) .....	50

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Ülseratif kolit için Truelove ve Witts kriterleri .....	10
<b>Tablo 2.</b> Mayo skorlamasının bileşenleri.....	11
<b>Tablo 3.</b> Biyokimyasal parametre değerleri.....	29
<b>Tablo 4.</b> Kolonda değerlendirilen histopatolojik bulguların semikantitatif skorlaması.....	47
<b>Tablo 5.</b> Kaspaz-3 skorlaması.....	48



## ÖZET

### ASETİK ASİT İLE DENEYSSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ RATLARDA, NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON'UN (NHDC, C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>) OLASI KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Erdem İ. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.**

**Amaç:** Bu araştırma NHDC'nin asetik asit ile kolit oluşturulmuş ratlarda olası koruyucu ve tedavi edici etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma, ağırlıkları 250 - 350 g arasında değişen toplam 28 adet dişi Wistar albino türü sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Sıçanlar kontrol, kolit, tedavi, koruyucu tedavi olmak üzere 4 eşit gruba ayrıldı. Serum ve bağırsak homojenatında uygun kitler ile biyokimyasal analizler gerçekleştirildi. Ayrıca kolon dokuları üzerinde histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı. Verilerin analizinde Shapiro Wilk testi ile normallik sınaması yapıldıktan sonra ANOVA testi ve bu testin anlamlı çıkması halinde post hoc test olarak Tukey's HSD testi kullanıldı.

**Bulgular:** Çalışmamızda kolit grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında IL-10, 8-OHdG, MDA, MPO, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ 1 ve COX-2, TOS, TAS, IFN- $\gamma$  değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar saptandı ( $p < 0.05$ ). CAT ve IL-6 değerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmamıştır. Ayrıca NHDC histopatolojik iyileşme sağlayarak asetik asitin oluşturduğu doku hasarını azaltmıştır. Kaspaz-3 skoru ise tedavi ve koruyucu tedavi gruplarında kolit grubuna göre belirgin olarak daha düşük bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu çalışmada NHDC'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkinlik sergileyerek kolitin yarattığı oksidatif hasarı ve doku hasarını iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır. Alternatif yan etkisiz bir tedavi olması açısından ülseratif kolit ve diğer otoimmün hastalıklar için kullanımı gelecek için umut vericidir.

**Anahtar kelimeler:** Antiinflamatuvar, Antioksidan, Neohesperidin dihidrokalkon, Ülseratif kolit.



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE POSSIBLE PROTECTIVE AND THERAPEUTIC EFFECTS OF NEOHESPERIDINE DIHYDROCHALCONE (NHDC, C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>) IN RATS WITH EXPERIMENTAL COLITIS INDUCED WITH ACETIC ACID

**Erdem İ. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Nutrition and Dietetics Program, Master Thesis, Aydın, 2023.**

**Objective:** This study was carried out to determine the possible protective and therapeutic effects of NHDC in rats with colitis induced with acetic acid.

**Materials and Methods:** The study was carried out using a total of 28 female Wistar albino rats weighing between 250 and 350 g. The rats were divided into 4 equal groups as control, colitis, treatment, and prophylactic treatment. Biochemical analyzes were performed with appropriate kits in serum and intestinal homogenate. In addition, histopathological and immunohistochemical evaluations were performed on colon tissues. In the analysis of the data after testing the normality with the Shapiro Wilk test, the ANOVA test was used, if this test was significant Tukey's HSD test was used as the post hoc test.

**Results:** In our study, when the colitis group and the treatment groups were compared, statistically significant results were found in IL-10, 8-OHdG, MDA, MPO, TNF- $\alpha$ , NF-kB, TGF- $\beta$ 1 and COX-2, TOS, TAS, IFN- $\gamma$  values. ( $p < 0.05$ ). No statistically significant results were found in CAT and IL-6 values. In addition, NHDC provided histopathological improvement and reduced tissue damage caused by acetic acid. Caspase-3 score was found significantly lower in the treatment and prophylactic treatment groups compared to the colitis group.

**Conclusion:** In this study, it was concluded that NHDC can improve the oxidative damage and tissue damage caused by colitis by exhibiting antioxidant and anti-inflammatory activity. Its use for ulcerative colitis and other autoimmune diseases is promising for the future, as it is an alternative treatment with no side effects.

**Key words:** Anti-inflammatory, Antioxidant, Neohesperidin dihydrochalcone, Ulcerative colitis.



# 1. GİRİŞ

Ülseratif kolit, kalın bağırsağın, sıklıkla rektumun iltihabı ile ilişkili olan, ancak sıklıkla kolonun ek alanlarını içerecek şekilde proksimale uzanan, kronik, immün aracılı bir inflamatuvar durumdur. İnsidansı dünya çapında artmaktadır. Ülseratif kolit, önemli bir morbiditeye ve tanımlanmış düşük bir mortalite insidansına neden olur. Aktif hastalığı olan hastaların, anksiyete ve depresyon gibi psikolojik rahatsızlıklara sahip olma ve sosyal etkileşimleri veya kariyer ilerlemesini bozma olasılıkları daha yüksektir. Uzun süreli ülseratif kolit ayrıca, kolorektal kanser riski ile ilişkilidir (Rubin ve diğerleri, 2019).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişimi, çevresel faktörler, bağırsak florasındaki değişiklikler, çeşitli yatkınlık yaratan genetik özellikler ve bağışıklık sistemindeki değişiklikler arasındaki karmaşık etkileşimlerden etkilenir. Aşırı şeker, hayvansal yağ ve linoleik asit tüketimi, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilirken, yüksek lifli diyet ve narenciye tüketimi koruyucu bir rol oynayabilir. Kronik inflamasyon ve kronik olarak kullanılan ilaçların yan etkileri nedeniyle, inflamatuvar bağırsak hastalıkları hastaları demir, kalsiyum, D vitamini, B12 vitamini, folik asit, çinko, magnezyum ve A vitamini gibi beslenme faktörü eksiklikleri açısından yüksek risk altındadır. Ayrıca, hastalığın belirli dönemlerinde uygun beslenme, remisyona ulaşmayı kolaylaştırabilir ve hepsinden önemlisi hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilir (Owczarek ve diğerleri, 2016).

Neohesperidin dihidrokalkon (NHDC,  $C_{28}H_{36}O_{15}$ , E959), turunçgil kabuklarından ekstrakte edilen bir flavonoid olan hesperidin'in katalitik alkali hidrojenasyonu ile ticari olarak sentezlenir. NHDC sakkarozun 250-1800 katı tatlılığa sahiptir. NHDC'nin hücreler ve hayvanlar üzerinde hiçbir toksisitesi olmadığı bulunmuştur, bununla birlikte antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik özellikleri rapor edilmiştir. Doğal olarak üretilen kalkonların ve hesperidin'in de bu faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Oral tüketimden sonra, NHDC, bağırsak mikrobiyotası tarafından dihidrokafeik asit olarak da adlandırılan 3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik aside parçalanır (Choi ve diğerleri, 2021).

Çalışmamızda NHDC'nin ülseratif kolit üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisinin çeşitli enzim, sitokin miktarları ve doku hasarı gibi biyokimyasal ve histopatolojik parametreler üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

NHDC'nin ülseratif kolit üzerindeki etkileri konusunda mevcut bir araştırma yoktur. Ancak hesperidin ve diğer turunçgil flavonoidleri ile yapılan bazı araştırmalar bulunmaktadır (Abe ve diğerleri, 2018; Xu ve diğerleri, 2009; Guo ve diğerleri, 2019; Shafik ve diğerleri, 2019).



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ülseratif Kolitın Tanımı

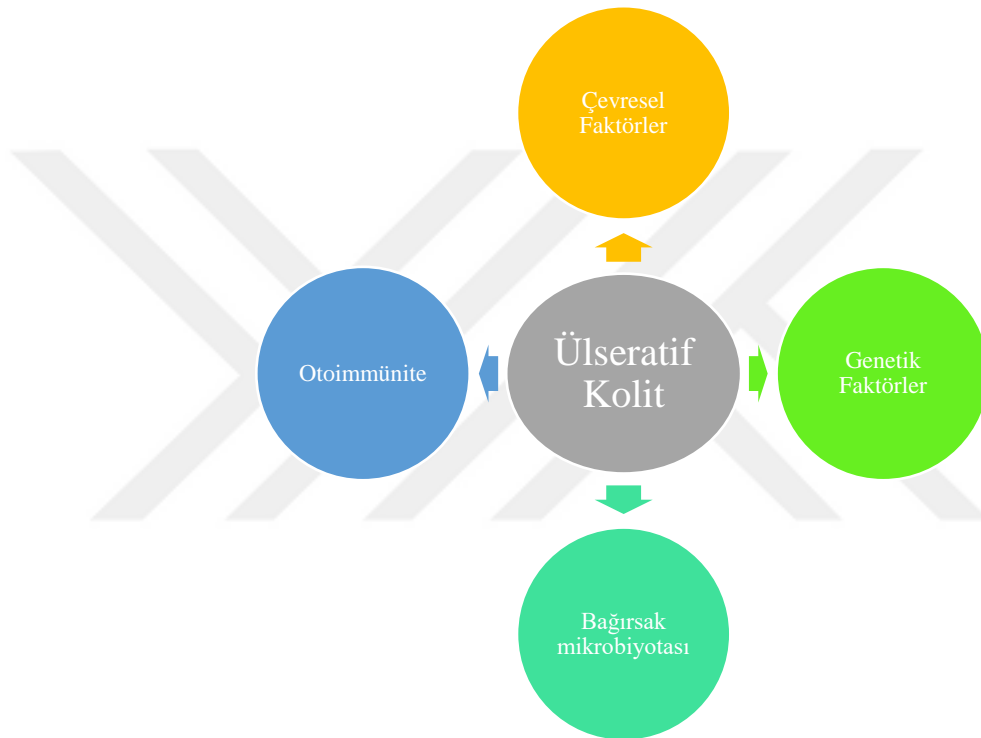
Ülseratif kolit ilk olarak 1859'da Samuel Wilks tarafından tanımlanmıştır (Wilks, 1859). Ülseratif kolit, kalın bağırsağın, sıklıkla rektumun iltihabı ile ilişkili olan, ancak sıklıkla kolonun ek alanlarını içerecek şekilde proksimale uzanan, kronik, immün aracılı bir inflamatuvar durumdur. İnsidansı dünya çapında artmaktadır. Ülseratif kolit, önemli bir morbiditeye ve tanımlanmış düşük bir mortalite insidansına neden olur (Rubin ve diğerleri, 2019).

### 2.2. Epidemiyoloji

Crohn hastalığı ve ülseratif kolit ile temsil edilen inflamatuvar bağırsak hastalıkları, gastrointestinal sistem iltihabına neden olan kronik bozukluklardır. Bu hastalıklar, önemli hasta yükü ve sağlık sistemlerine maliyet getiren önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Ramos ve diğerleri, 2019). Dünya çapında, ülseratif kolit Crohn hastalığından daha yaygındır (Wilks, 1859). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 1,6 milyon insan inflamatuvar bağırsak hastalıklarından, 785.000 insan crohn hastalığından ve 910.000 insan ülseratif kolitten etkilenir. Prevalans, gelişmiş batı ülkelerinde daha yüksektir ve Avrupa'da 2 milyon kadar insan bu hastalıklardan muzdariptir. 21. yüzyılın başındaki epidemiyolojik çalışmalar, Güney Amerika, Asya, Afrika ve Doğu Avrupa'daki gelişmekte olan ülkelere inflamatuvar bağırsak hastalıklarının insidansının arttığını göstermiştir (Ramos ve diğerleri, 2019). Türkiye'de inflamatuvar bağırsak hastalıkları insidansı ülseratif kolit için 2,6/100000 ve crohn hastalığı için 1,4/100 olarak bildirilmiştir (Buran, 2017).

### 2.3. Patofizyoloji

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişimi, çevresel faktörler, bağırsak florasındaki değişiklikler, çeşitli yatkınlık yaratan genetik özellikler ve bağışıklık sistemindeki değişiklikler arasındaki karmaşık etkileşimlerden (Şekil 1) etkilenir (Owczarek ve diğerleri, 2016).



Şekil 1. Ülseratif kolit gelişimi için anahtar risk faktörleri (Gajendran ve diğerleri, 2019).

#### 2.3.1. Genetik Faktörler

Aile öyküsü riskte bir artışa işaret etse de, inflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarının sadece %10 ila %25'i, hastalığa sahip birinci derece bir akrabaya sahiptir. Ülseratif kolit Yahudi kökenli olanlarda Yahudi olmayanlarla karşılaştırıldığında daha sık ve Afrikalı, Amerikalı ve ispanyollarda daha az sıklıkla görülür. Genetik risk faktörleri halen araştırılmaktadır. HLA-DqA1 varyantları ülseratif kolit ile en güçlü şekilde ilişkili görünür. TNFRSF15, TNFRSF9, IL1R2, IL8RaIRB ve IL7R gibi sitokinleri ve inflamatuvar belirteçleri kodlayan genetik yollar

ayrıca, CHD1 ve LAMB1 gibi diğer genetik yollar epitel bariyer fonksiyonunu içerir (Feuerstein ve Cheifetz, 2014).

### **2.3.2. Mikrobiyota**

Birkaç epidemiyolojik ipucu, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında bağırsak mikrobiyotasının disbiyozuna işaret etmektedir. Disbiyozis, kommensal bakteri popülasyonlarının bakteriyel antijenlere karşı bağışıklık tepkisinin düzensizliği sebebiyle değişmiş bileşimi olarak tanımlanır. Mikrobiyal çeşitlilikteki bu fark Chron hastalığında ülseratif kollitten daha fazladır. Sağlıklı kardeşlerden alınan mukozal transkripsiyonel profil, ülseratif kolitli hastaların veya onların sağlıklı ikizlerinin gen ekspresyonu ile kıyaslandığında bakteriyel gen ekspresyonu büyük bir korelasyon gösterir. Bu da, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında mukoza ve mikrobiyota arasında düzensiz bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, ülseratif kolitte bakteriyel disbiyozdan bağımsız olarak Caudovirales ailesine ait bakteriyofajların genişlemesi ile enterik viromda anormallik bildirilmiştir (Gajendran ve diğerleri, 2019).

### **2.3.3. Çevresel Faktörler**

Şu anda, sigara içmenin ülseratif kolite karşı koruma sağladığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Bir meta-analiz, sigara içen kişilerde ülseratif kolite yakalanma riskinin, hiç sigara içmemiş kişilere kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca sigara içen hastalarda hastaneye yatış ve nüks oranları, daha güçlü ilaçlara ve kolektomiye ihtiyaç duyulması anlamlı olarak daha düşüktür. Bununla birlikte, ülseratif kolitte sigara içmenin koruyucu etkisi geçicidir, çünkü sigarayı bıraktıktan sonra hastalığa yakalanma riski hiç sigara içmemiş hastalara kıyasla artar (Berkowitz ve diğerleri, 2018).

Başka bir çalışmada ise sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, daha önce sigara içenlerde ülseratif kolit gelişme riski anlamlı olarak daha yüksek, ancak halen sigara içenlerde önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Halihazırda sigara içenler arasında, temel değerlendirmeden sonra sigarayı bırakan kişilerde ülseratif kolit gelişme riski, sigara içmeye devam edenlere göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Park ve diğerleri, 2019).

Son zamanlarda yapılan iki meta-analiz çalışması, alkolsüz içecek tüketimi ve sükröz alımının, sırasıyla %69 ve %10 artmış ülseratif kolit gelişimi riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Başka bir meta-analiz çalışmasında meyve ve sebze tüketimi, ülseratif kolit gelişme olasılığının azalmasıyla ilişkili bulunmuştur. Yedi epidemiyolojik çalışmanın meta-analizinde et alımı (özellikle kırmızı et) ile ülseratif kolit riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Keshteli ve diğerleri, 2019).

Prospektif bir kohort çalışmasının iç içe vaka kontrol çalışması Avrupa'da yedi bölgede, dokosaheksaenoik asidin aksine linoleik asiti ülseratif kolit gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Hart, 2009). Ayrıca, Danimarkalı yetişkinler arasında yapılan geniş bir prospektif kohort çalışmasında diyetin omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri içeriği, ülseratif kolit gelişme olasılığının azalmasıyla ilişkilirken, diyetdeki araşidonik asit ülseratif kolit gelişme riskini arttırmıştır (Keshteli ve diğerleri, 2019).

Bebeklik dönemindeki inek sütü proteini aşırı duyarlılığı, kontrollerle karşılaştırıldığında ülseratif kolitin olası bir nedeni olarak öne sürülmüştür (Gajendran ve diğerleri, 2019). Bir meta-analizin sonuçları, emzirmenin daha düşük Crohn hastalığı ve ülseratif kolit riskleri ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemiştir (Klement ve diğerleri, 2004).

İlaç kullanımı ile ülseratif kolit oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. 10 yıl boyunca, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan yaklaşık 24.000 hastayı içeren bir popülasyona dayalı çalışmada, kullanılan antibiyotik sayısı ile inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimi arasında frekansa bağlı potansiyel bir ilişki rapor edilmiştir (Nguyen ve diğerleri, 2020).

Apendektomi ve ülseratif kolit arasındaki ters ilişki birçok çalışmada doğrulanmıştır. İspanya'da yapılan bir vaka kontrol çalışmasına göre hem apendektominin hem de sigara içmenin ülseratif kolit için koruyucu etkisi saptanmıştır (López-Serrano ve diğerleri, 2010). Toplam 1.270.332 katılımcıyla elli bir çalışmanın dahil edildiği bir metaanalizde birleştirilmiş olasılık oranına göre, apendektominin ülseratif kolit gelişme ihtimalini azalttığı gösterilmiştir. 20 yaşından önce apendektomi yapılan kişilerde de benzer bir model görülmüştür (Abdali ve Narula, 2021).

### 2.3.4. Oksidatif Stres ve İmmünolojik Faktörler

Ülseratif kolit ile ilişkili önemli patojenik faktörlerden biri oksidatif strestir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, hücresel proteinlere, membran lipitlerine ve DNA'ya doğrudan oksidatif hasar verebilir ve hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit dahil olmak üzere ROS'un sürekli üretimi, bu toksik türleri ortadan kaldıran endojen antioksidanları azaltabilir (Amirshahrokhi, 2019).

Ülseratif kolitte reaktif oksijen türlerinin artması, lipid peroksidasyonuna yol açan tükenmiş katalaz ve glutatyon antioksidanlarıyla sonuçlanır (Shahid ve diğerleri, 2022). Katalaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye adaptif yanıtta çok önemli bir rol oynar. Katalaz ve glutatyon peroksidaz ROS'a karşı savunmanın ikinci kademesinde bulunur. Mutasyon çalışmaları akatalazemik farelerin oksidatif hasara karşı daha fazla duyarlılık gösterdiğini doğrulamıştır (Tehrani ve Moosavi-Movahedi, 2018).

Nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B) proteinleri, doğal ve adaptif bağışıklık tepkileri, apoptoz, hücre proliferasyonu, inflamasyon ve malign transformasyon dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci düzenleyen transkripsiyon faktörleridir (Viennois ve diğerleri, 2013).

Bağırsak epitel hücreleri, lenfositler ve makrofajlar tarafından düzensiz sitokin üretimi ve sinyal mekanizmaları, inflamatuvar bağırsak hastalığının patogeneğinde rol oynamıştır ve transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B, bu karmaşık senaryoda ana düzenleyici bileşenlerden biri olarak ortaya çıkmıştır (Atreya ve diğerleri, 2008). NF- $\kappa$ B, inflamatuvar genlerin ekspresyonunu indüklemenin yanı sıra COX-2 gibi koruyucu moleküllerin ekspresyonunu aynı anda uyarır (Sartor, 2006). COX-2 ekspresyonunda belirgin artışlar, iltihaplanma bölgesinde lokal olarak meydana gelir. Ülseratif kolitli hastalarda artan COX-2 ekspresyonu gözlenmiştir (Vardeh ve diğerleri, 2009 ; Ya Sklyarov ve diğerleri, 2011).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) lokal inflamasyon bölgelerinde üretilen proinflamatuvar bir sitokindir (Dinarello, 2000). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 ve MCP-1 (monosit kemoatraktan protein-1) dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin, nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, bağırsak mukozasında oksidatif ve inflamatuvar hasarlara neden olabilir. Bu biyolojik süreçler, ülseratif kolit gelişiminde yer alan anahtar bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B tarafından kontrol edilir (Amirshahrokhi, 2021).

Ülseratif koliti olan sıçanlarda, aktive edilmiş lökositler, oksidatif stresi indükleyen proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimine neden olmaktadır ve bu fosforile edilmiş NF- $\kappa$ B

ve MDA içeriklerinin artmasıyla kanıtlanmıştır. MDA, membran lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biridir (Wang ve diğerleri, 2019). Yapılan çalışmalarda kolit modellerinde MDA düzeyinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Dogan ve diğerleri, 2014).

İnterferon (IFN)- $\gamma$ , birçok farklı hücre tipi üzerinde pleiotropik etkileri olan inflamatuvar bağırsak hastalığında merkezi bir patogeneze faktörüdür (Haep ve diğerleri, 2015).

Biyobelirteç 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OhdG), endojen oksidatif hasarın DNA'ya etkisini ölçmek için ve karsinogenezi başlatma ve ilerletme faktörü olarak çok önemli bir belirteçtir dolayısıyla kanser gelişimine yol açan inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkilidir (Valavanidis ve diğerleri, 2009 ; Wojcik-Grzybek ve diğerleri, 2022).

IL-10, monositik hücreler üzerinde önemli etkileri olan en önemli anti-inflamatuvar ve immünoşüpresif sitokinlerden biri olarak bilinir (Fickenscher ve diğerleri, 2002). IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinler ülseratif kolitin kontrolü üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Wang ve diğerleri, 2020). Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF)- $\beta$  ve IL-10, herhangi bir düzensiz bağırsak immün yanıtı için tedavide önemli hedefler sağlayabilir (Garside, 1999).

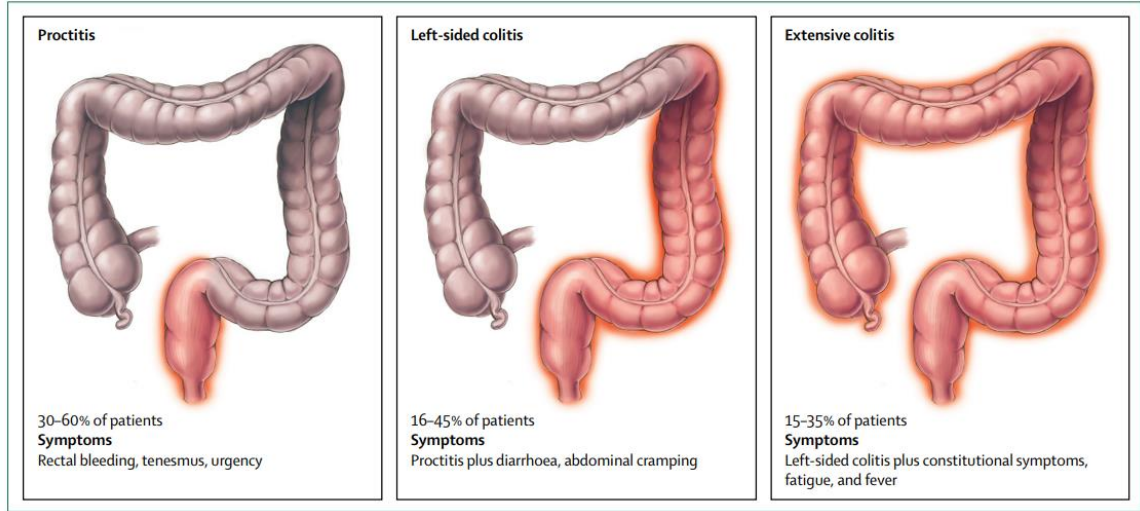
Apoptoz, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patofizyolojisinde yer alır. İnflamatuvar yanıt, apoptoza yol açan mukozal bariyer fonksiyonunu ve bağırsak bütünlüğünü değiştirir (Shahid ve diğerleri, 2022). Kaspaz-3, apoptozun ana aracısı olarak tanımlanmıştır (D'amelio ve diğerleri, 2010).

## **2.4. Tanı ve Klinik Bulgular**

Ülseratif kolit, kolonik mukozayı etkileyen en sık kanlı dışkı ve ishal ile kendini gösteren kronik bir hastalıktır. Hastaların %15 kadarı başlangıçta şiddetli hastalık ile başvurur. Semptomlar yorgunluk, bağırsak hareketlerinde artış, mukus akıntısı, gece dışkılama ve krampları içerebilir. Ayrıca şiddetli hastalıkta ateş ve kilo kaybı görülebilir. Ülseratif kolit kolon tutulumunun derecesine göre sınıflandırılır (Şekil 2).

Klinik tablo hastalığın yayılımına göre değişebilir. Proktitli hastalarda ağırlıklı olarak sıkışma ve tenesmus görülebilirken pankolit sırasında kanlı ishal ve karın ağrısı daha belirgin olabilir. Proktit veya sol taraflı kolit olan hastaların %10 kadarında paradoksal kabızlık görülebilir.

Fizik muayenede abdominal hassasiyet ve anemi bulguları olabilir. Abdominal distansiyon ve perküsyonda timpan ses alınması hızlı radyolojik değerlendirme gerektiren kolon dilatasyonunu gösterebilir. Ülseratif kolitli hastalarda ishalden kaynaklanan tahriş nedeniyle anal fissürler veya cilt lezyonları oluşabilir, ancak anal veya perianal fistüllerin varlığı Crohn hastalığı için şüphe uyandırmalıdır (Ungaro ve diğerleri, 2017).



**Şekil 2.** Montreal sınıflandırmasına göre ülseratif kolit fenotipleri (Ungaro ve diğerleri, 2017).

Hastalığın sınıflandırılması prognoz ve tedavi seçimi açısından önem taşımaktadır. Hastalık aktivitesi değerlendirilmesinde Truelove-Witts sınıflaması, Montreal sınıflandırması ve Mayo skoru sık kullanılanlardır (Tablo 1, Tablo 2).

**Tablo 1.** Ülseratif kolit için Truelove ve Witts kriterleri (Joseph ve diğerleri, 2019).

<b>Değişken</b>	<b>Hafif</b>	<b>Orta</b>	<b>Şiddetli</b>
Günlük Bağırsak Hareketleri	<4	>6	>10
Kanlı Dışkı	Aralıklı	Sık	Sürekli
Vücut Sıcaklığı	Normal	>37.5 °C	>37.5 °C
Nabız	Normal	>90 atış/dak	>90 atış/dak
Hemoglobin	Normal	<10.5 g/dL	Transfüzyon gerektiren
Eritrosit Sedimentasyon Oranı	≤30 mm/saat	>30 mm/saat	>30 mm/saat
Görüntülemeye kolonik bulgular	Normal	Ödemli duvar, parmak izi	Genişleme
Klinik belirtiler	Normal	Karında hassasiyet	Karın distansiyonu ve hassasiyeti

**Tablo 2.** Mayo skorlamasının bileşenleri (Lewis ve diğerleri, 2008).

<b>Dışkı sıklığı</b>
0 = Normal
1 = 1-2 dışkı/gün normalden fazla
2 = 3-4 dışkı/gün normalden fazla
3 = >4 dışkı/gün normalden fazla
<b>Rektal kanama</b>
0 = Yok
1 = Zamanın yarısından daha az dışkı ile görünür kan
2 = Zamanın yarısı kadar veya daha fazla dışkı ile görünür kan
3 = Tek başına kan geçişi
<b>Endoskopide mukozal görünüm</b>
0 = Normal veya inaktif hastalık
1 = Hafif hastalık (Eritem, Azalmış vasküler patern, hafif fragil)
2 = Orta derecede hastalık (Belirgin eritem, vasküler patern yok, fragil, erozyonlar)
3 = Şiddetli hastalık (spontan kanama, ülserasyon)
<b>Hastalık aktivitesine hekim değerlendirmesi</b>
0 = Normal
1 = Hafif
2 = Orta
3 = Şiddetli

#### 2.4.1. Laboratuvar Bulguları

Biyokimyasal belirteçler inflamasyonu ölçmek ve hastalık aktivitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. CRP klinik pratikte en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biridir. Yüz bir hastanın (67 hasta aktif hastağı olan, 34 hasta remisyonda) dahil edildiğı bir çalışmada CRP seviyeleri ülseratif kolit hastalarında klinik ve endoskopik aktivite açısından uyumlu bulunmuştur (Karoui ve diğerleri, 2011).

Fekal kalprotektin, inflamatuvar barsak hastalığı aktivitesinin izlenmesi için sıklıkla kullanılan bir biyobelirteçtir. Fekal kalprotektin, granüositlerdeki sitozolik proteinlerin %60'ını

temsil eder. Bu proteinin artan fekal konsantrasyonları, gastrointestinal mukozaya nötrofil migrasyonu ile orantılıdır.

228 ülseratif kolit hastası ve 52 sağlıklı kontrolün kaydedildiği bir çalışmada, fekal kalprotektin konsantrasyonunun modifiye Baron Skoruna göre değerlendirilmiş endoskopik hastalık şiddetiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Fekal kalprotektin, farklı endoskopik aktivite dereceleri arasında ayırım yapmaya izin veren noninvaziv tek belirteçtir. Çalışma, fekal kalprotektinin ülseratif kolitte noninvaziv aktivite izleme için yararlı bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir (Schoepfer ve diğerleri, 2013).

Laktoferrin bir demir bağlayıcı glikoproteindir ve polimorfonükleer nötrofillerin sekonder granüllerinin önemli bir bileşenidir. Bağırsak iltihabı sırasında lökositler mukozayı istila eder ve bu dışkıya laktoferrin salgılanmasında artışa neden olabilir. Ülseratif kolit relapsının tahmini için fekal kalprotektin ve laktoferrinin önemini değerlendirmek amacıyla yapılan bir prospektif çalışmada, fekal kalprotektinin ülseratif kolit relapsını öngörmeye fekal laktoferrinden daha yüksek bir hassasiyet ve özgüllük gösterdiği sonucuna varılmıştır (Yamamoto ve diğerleri, 2014).

On dokuz çalışmanın (n=2499 hasta) dahil edildiği bir metaanalizde; CRP, fekal kalprotektin ve fekal laktoferrin için birleştirilmiş duyarlılık ve özgüllük tahminlerine göre fekal kalprotektinin hem ülseratif kolit hem de chrohn hastalığı için CRP'den daha duyarlı bir biyobelirteç olduğu saptanmıştır (Mosli ve diğerleri, 2015).

Ülseratif kolitte serolojik belirteçler için birkaç potansiyel rol vardır. En önemlisi hastalık özgüllüğü ve prognozunda patognomonik bir belirteç olması, ikincisi inflamatuvar bağırsak hastalıklarını diğer sindirim sistemi bozukluklarından ayırt edebilmeyi sağlaması, üçüncüsü ise hastalık mekanizmasını ve immün etkileşimleri anlamada yardımcı olmasıdır.

Perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikorların prevalansı (pANCA) ülseratif kolitli hastalarda %50-80 arasında değişir ve bu nedenle pANCA ülseratif kolitte serolojik bir belirteç olarak kullanılır.

Son zamanlarda, *Escherichia coli* hücre duvarının dış membranı (OMP-C) veya *Pseudomonas fluorescens*'in (I2 peptid) RNA'dan türetilmiş immünolojik olarak ilişkili bakteriyel sekansı ile reaksiyona giren diğer serolojik belirteçler inflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarında tanımlanmıştır, ancak bunlar ülseratif kolitten daha çok Crohn hastalığıyla ilişkilendirilmiştir ve inflamatuvar bağırsak hastalığı alt tipleri arasında ayırım yapmada faydalı olamamıştır (Hanauer, 2004).

## 2.4.2. Endoskopik Bulgular

Endoskopi, ülseratif kolitin değerlendirilmesinde çok önemli bir rol oynar (Travis ve diğerleri, 2012). Biyopsi ile kolonoskopi, hastalık kapsamının ve aktivitesinin belirlenmesi için en doğru değerlendirme yöntemidir. Ülseratif kolit, kolonik mukozanın yaygın bir hastalığı olduğundan, takip sırasında mukozal hastalık aktivitesini doğru bir şekilde değerlendirmek için fleksibl kolonoskopiler önerilmektedir. Ülseratif kolit Hastalık Aktivite indeksi ve Mayo skoru gibi ülseratif kolitte kullanılan çoğu aktivite skoru, ülseratif kolitin hastalık şiddetini değerlendirmek için klinik ve endoskopik parametreleri birleştirir. Ancak, bu 2 skorlama yöntemi ve toplamda henüz resmi olarak onaylanmamış farklı tasarlanmış 14 endoskopik skorlama yöntemi vardır (Lemmens ve diğerleri, 2013).

## 2.4.3. Görüntüleme Yöntemleri

Ülseratif kolit vakalarında radyografik yöntemler önemli tanı araçları haline gelmiştir. Görüntüleme, tutulumun kapsamını, hastalığın ciddiyetini belirlemek ve hastalıkla ilgili komplikasyonları ve bağırsak dışı inflamatuvar bağırsak hastalığı belirtilerini tespit etmek için non-invaziv bir şekilde kullanılabilir. Abdominal röntgenler ve baryumlu lavmanlar spesifik klinik ortamlarda hala önemini korurken, inflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarında aktif ince barsak hastalığını dışlamak için bilgisayarlı tomografi enterografisi veya manyetik rezonans enterografisi artık birinci basamak araştırmalar olarak kullanılmaktadır ve aktif kolonik inflamasyonu tespit etmek için kullanılabilirler. Ek olarak, bilgisayarlı tomografi kolonografi ve manyetik rezonans kolonografi, ülseratif kolitte potansiyel uygulamaları olan yeni ortaya çıkan tekniklerdir (Deepak ve Bruining, 2014).

Bağırsak ultrasonu da inflamatuvar bağırsak hastalıklarında hastalık aktivitesini değerlendirmek ve tedavi kararlarına rehberlik etmek amacıyla kullanılan non-invaziv bir yöntemdir. Kullanımı kolaydır, ucuzdur ve sınırlama olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca, bağırsak ultrasonu iyi bir doğruluk sunmaktadır, bu nedenle hastaların takibinde bir endikasyon olabilir. Fransa'da inflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarında ülke çapında yapılan bir araştırmada, bağırsak ultrasonu çok yüksek kabul edilebilirlik göstermiştir ve diğer tanı

yöntemlerine göre tercih edilen görüntüleme olmuştur. Bağırsak ultrasonunun aktif ülseratif kolitteki tipik bulgusu mukoza ve submukozayı da içeren (yetişkinlerde >4,0 mm ve çocuklarda >3,0 mm) bağırsak duvarı kalınlaşmasıdır (Maaser ve diğerleri, 2020).

## 2.5. Komplikasyonlar

İBH, artan kolorektal karsinom riskiyle bağlantılıdır. İBH ile ilişkili öncü bir lezyon olan displazi ve karsinoma genel popülasyona göre daha genç yaşta ortaya çıkmaktadır (Bernstein ve diğerleri, 2001).

İBH'li hastaların üçte birinden fazlası, bağırsak dışı komplikasyonlardan etkilenir. En yaygın belirtiler, hem Crohn hastalığında hem de ülseratif kolitte artropatiler, mukokutanöz ve oftalmolojik belirtilerin yanı sıra hepatobiliyer sistemi etkileyen durumları içerir. Bununla birlikte, İBH'li hastalarda pulmoner veya nörolojik belirtiler gibi daha az sıklıkta görülen belirtiler de dikkate alınmalıdır. Demir eksikliği anemisi ve osteoporoz gibi bağırsak dışı komplikasyonlar, bağırsak hastalığının veya hastalığa özgü tedavinin sonuçlarıdır (Ott ve Schölmerich, 2013).

## 2.6. Tedavi

İBH tedavisi ilk olarak hastalığın remisyonunu sağlamayı ve ikinci olarak remisyonu sürdürmeyi amaçlar (Aardoom ve diğerleri, 2019).

Kolonda bakteriyel azoredüktazlar tarafından 5-aminosalisilik asit (5-ASA) ve sülfapiridin salmak üzere parçalanan bir ön ilaç olan sülfasalazin, 1940 yılında İBH tedavisi için bir ilaç olarak geliştirilmiştir ve aynı zamanda romatoid artrit tedavisinde kullanılabilir. Sülfasalazin, mide bulantısı, anoreksiya, hemoliz ve baş ağrısı gibi bazı yan etkilere neden olabilmektedir (Zheng ve diğerleri, 2017). Buna göre, sadece sülfasalazin tedavisi tamamen tatmin edici değildir (Shin ve diğerleri, 2017).

Steroidler uzun yıllardır ülseratif kolit tedavisinde ana ilaç olarak kullanılmaktadır. Steroidler, ÜK için remisyon indüksiyon tedavisinde etkilidir ve %80'lik bir etkinlik oranı ve %50'lik bir remisyon oranı ile başladıktan 1 ay sonra olumlu sonuçlar verir. Steroid kullanan

ÜK hastaları ve özellikle uzun süre yüksek doz steroid kullananlar, ciddi komplikasyonlar olarak azalmış glikoz toleransı, azalmış kemik yoğunluğu, katarakt ve aterosklerozun ilerlemesi daha az ciddi etkiler olarak artan vücut ağırlığı ve akne dahil olmak üzere ters ilaç reaksiyonları ve komplikasyonları için risk altındadır (Okayasu ve diğerleri, 2019).

Azathioprine, uzun süre remisyonda kalmak isteyen ÜK hastaları için etkili ve uygun maliyetli bir ilaçtır. Azathioprine tedavisi, kapsamlı bir tedavi öncesi klinik ve laboratuvar değerlendirmesi ve genetik analiz gerektirir. Hem hastalar hem de doktorlar kanser gibi potansiyel sonuçların farkında olmalı ve düzenli olarak test edilmelidir (Mallick ve Malik, 2022).

Anti-TNF, İBH tedavisinde kullanımı ilk kez onaylanan biyolojikler grubunda yer alan ajanlardan biridir. Günümüzde, daha geniş bir biyolojik spektrum mevcuttur. Bu ajanlar, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından düzenlenen sıkı bir üretim ve pazar yetkilendirme sürecinden sonra doktorlar tarafından kullanılabilir (Aardoom ve diğerleri, 2019).

Akut şiddetli ülseratif kolit ve tıbbi olarak dirençli ÜK, ÜK hastalarında cerrahi için ana endikasyonları temsil eder. Akut şiddetli ülseratif kolit'in birinci basamak tedavisi, intravenöz kortikosteroid tedavisinden oluşur. Bununla birlikte, hastaların %30'a kadarı konservatif tedavilere yanıt veremez ve kolektomi gerektirir. Dirençli ÜK'ye genellikle kötüleşen hasta durumu eşlik eder ve kötü postoperatif sonuçların bilinen bir risk faktörüdür; bu nedenle, hasta durumunu iyileştirmek ve postoperatif komplikasyonları en aza indirmek için genellikle aşamalı bir prosedür tercih edilir (Spinelli ve diğerleri, 2022).

## 2.7. Neohesperidin Dihidrokalon

Neohesperidin dihidrokalon (NHDC,  $C_{28}H_{36}O_{15}$ , E959), turunçgil kabuklarından ekstrakte edilen bir flavonoid olan hesperidin'in katalitik alkali hidrojenasyonu ile ticari olarak sentezlenir. NHDC sakkarozun 250-1800 katı tatlılığa sahiptir. NHDC'nin hücreler ve hayvanlar üzerinde hiçbir toksisitesi olmadığı bulunmuştur, bununla birlikte antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik özellikleri rapor edilmiştir. Doğal olarak üretilen kalonların ve hesperidin'in de bu faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Oral tüketimden sonra, NHDC, bağırsak mikrobiyotası tarafından dihidrokafeik asit olarak da adlandırılan 3-(3,4-dihidroksifenil) propiyonik aside parçalanır (Choi ve diğerleri, 2021).

Tatlılığı, ferahlatıcı tadı, ağızda kalan tadın sürerliği ve acılığa karşı korumadaki mükemmel etkisi, antioksidan aktivitesi ve antiinflamatuvar ve anti-apoptotik özellikleri nedeniyle yiyeceklerde (ekmek, meyve suyu vb.) ve beslenme araştırmalarında ve tıbbi araştırmalarda büyük ilgi görmüştür (Zhang ve diğerleri, 2021).

NHDC, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından tüketimi güvenli kabul edilmektedir (Hallagan ve diğerleri, 2020). NHDC (E 959), gıda katkı maddelerine ilişkin Yönetmeliğin No 1333/2008'in Ek II'sine göre Avrupa Birliği'nde bir gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır. Rapor edilen kullanım seviyelerinde gıda katkı maddesi NHDC'ye diyetle maruz kalmanın bir güvenlik endişesi yaratmadığı belirtilmiştir (Younes ve diğerleri, 2022).

## 2.8. Literatür Taraması

Abe ve diğerleri (2018) yaptığı çalışmada, kuzeydoğu Asya'ya özgü bir narenciye meyvesi olan yuzu'nun (*Citrus junos*, Tanaka) fare dekstran sülfat sodyum (DSS) kaynaklı kolit modeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Analiz edilen yuzu kabuğu özütünde narirutin ( $774\pm 12$   $\mu$ ), hesperetin 7-(2,6-dirhamnosilglukozit) ( $356\pm 5$   $\mu$ M), naringin ( $513\pm 10$   $\mu$ M), hesperidin ( $1118\pm 15$   $\mu$ M), neohesperidin ( $635\pm 9$   $\mu$ M) ana biyoaktif bileşikler olarak belirlenmiştir. DSS içeren içme suyu verilen fareler, önemli kilo kaybı, kolon kısalması, ishal ve görünür dışkı kanı göstermiştir. Buna karşılık, dekstran sülfat sodyum almadan önce 14 gün boyunca %5 yuzu kabuğu içeren bir diyetle beslenen fareler, bu fenotiplerde önemli bir azalma göstermiştir. Yuzu kabuğu özütünün, lipopolisakkarit ile uyarılan farelerde ve murin makrofaj hücre hattında, NF- $\kappa$ B aktivasyonunun baskılanması yoluyla TNF- $\alpha$  üretimini baskıladığı bulunmuştur. Ayrıca yuzu kabuğu ekstresinin orta düzeyde antioksidan etkiye sahip olduğu doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, yuzu kabuğunun, in vivo olarak lipidlere karşı inflamasyonu ve oksidatif stresi koordineli bir şekilde baskılayarak dekstran sülfat sodyumun neden olduğu kolit patolojilerini azalttığını göstermektedir.

Xu ve diğerleri (2009) hesperidin'in farelerde dekstran sülfat sodyum kaynaklı deneysel ülseratif kolit üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sülfasalazin (pozitif kontrol) ve Hesperidin, 10, 40 ve 80 mg/kg dozlarında, dekstran sülfat sodyuma maruz kalma ile eş zamanlı olarak başlayarak, 7 gün boyunca günde bir kez oral olarak uygulanmıştır. Ülseratif kolit semptomu, hastalık aktivite indeksi ve kolonun ıslak ağırlığı ile değerlendirilmiştir. Olası mekanizmaları gözlemek için serumdaki miyeloperoksidaz aktivitesi, malondialdehit içeriği ve interlökin-

4 ve interlökin-6 seviyeleri ölçülmüştür. Hesperidin'in oral uygulaması serumda hastalık aktivite indeksi, miyeloperoksidaz aktivitesi, malondialdehit içeriği ve interlökin-6 düzeyini anlamlı olarak azaltırken ( $p < 0.01$ ), serumda interlökin-4 düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar, Hesperidin'in dekstran sülfat sodyumun neden olduğu deneysel koliti iyileştirebileceğini ve kolitin önlenmesinde ve tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir.

Guo ve diğerleri (2019) hesperidin'in farelerde ve Caco-2 hücrelerinde dekstran sülfat sodyum ile indüklenen kolit üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla yaptığı çalışmada farelere, dekstran sülfat sodyum tedavisinden sonra 10, 20 ve 40 mg/kg hesperidin diyetleri verilmiştir. İn vitro deneyler için Caco-2 hücreleri, hesperidin olmadan veya hesperidin ile 48 saat TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  ile işlenmiştir. Deney sonuçlarına göre hesperidin takviyesi, dekstran sülfat sodyumun neden olduğu koliti iyileştirmiştir. Spesifik olarak hesperidin, MDA aktivitesini azaltarak ve süperoksit dismutaz ve glutatyon aktivitelerini artırarak bağırsak iltihabını iyileştirmiştir. Hesperidin ayrıca Nrf2 antioksidan yolunu düzenlemiştir ve HO-1 ve NQO1'in protein ifadesini arttırmıştır. Ek olarak, hesperidin, kolon dokularındaki inflamatuvar faktörlerin seviyelerini önemli ölçüde azaltıp anti-inflamatuvar faktörlerin seviyelerini arttırmıştır. Daha ileri analizler, hesperidin'in sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu ve bağırsak geçirgenliğini geliştirebildiğini ve ayrıca Treg popülasyonunu arttırdığını göstermektedir. Caco-2 hücrelerinde, hesperidin'in transepitelyal elektrik direncinde TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  kaynaklı azalmayı ve morfolojik bozulmayı önlediği gösterilmiştir.

Shafik ve diğerleri (2019) hesperidin'in kolit üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığı çalışmada hesperidin'in ülseratif kolit patogenezi üzerinde modülatör etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Nitrik oksit ve peroksinitrit seviyelerinde belirgin azalmalar, toplam antioksidan kapasiteyi artırma ve süperoksit dismutaz enzimini aktive etme ile kanıtlandığı gibi redoks potansiyelini başarıyla geri kazandırmıştır. Ayrıca hesperidin, ülseratif kolit hastalık aktivite indeksini hafifletmiştir ve histopatolojik tabloyu iyileştirmiştir.

Han ve diğerleri (2018) NHDC türevlerinin, hücrel oksidatif stresi azaltarak adipoz kaynaklı kök hücrelerin adipojenik farklılaşmasını inhibe etmede etkili bir rol oynadığını göstermiştir.

Hu ve diğerleri (2014) yaptığı çalışmada fare modelinde, Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>)'ün intraperitoneal enjeksiyonuna karşı NHDC'nin akut oksidatif hasar üzerindeki olası hepatoprotektif etkileri araştırılmıştır. CCl<sub>4</sub>'ün intraperitoneal enjeksiyonu serum aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT) aktivitelerinde önemli bir artışla

sonuçlanmıştır. Katalaz, toplam süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP-X) ve glutatyon (GSH) gibi hepatik antioksidan seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır. NHDC'nin art arda altı gün boyunca ön tedavisi, bu değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirmiştir. NHDC ile ön işlem ayrıca NF- $\kappa$ B, IL-6, kaspaz-3 ve kaspaz 8'in CCl<sub>4</sub> ile indüklenen protein ekspresyonlarını azaltarak düzenlemiştir. NHDC'nin ön tedavisi, doza bağlı bir şekilde CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu oksidatif hasarı etkili bir şekilde hafifletmiştir.

Shi ve diğerleri (2015) yaptığı çalışmada, farelerde parakuat (PQ) kaynaklı akut karaciğer hasarına karşı yapay tatlandırıcı NHDC'nin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Tek doz parakuat akut karaciğer toksisitesine neden olmuştur. Tutarlı bir şekilde, parakuat, glutatyon peroksidaz (GP-X), glutatyon-S-transferaz (GST) ve katalaz aktivitelerini, glutatyon (GSH) seviyesini ve antioksidan kapasiteyi azaltmıştır. Bununla birlikte, NHDC, bu parametreleri tersine çevirerek farelerde parakuat kaynaklı hepatik toksisiteyi iyileştirmiştir. Ek olarak, NHDC, parakuat kaynaklı nükleer faktör-kappa B ekspresyonunu ve mitokondriyal güdümlü apoptotik sinyalleşmeyi önemli ölçüde inhibe etmiştir.

Suarez ve diğerleri (1996) Wistar sıçanlarla yaptığı çalışmada etanol ile indüklenmiş akut gastrik ülser üzerinde, neohesperidin dihidrokalkon hem 100 hem de 150 mg/kg dozlarda antiülser aktiviteye sahipti. Bununla birlikte, aynı dozlarda hesperidin etkisizdi.

Osman ve diğerleri (2021) tarafından yapılan bir çalışmada metotreksat ile böbrek hasarı tetiklenen sıçan modelinde empagliflozin ve NHDC'nin nefroprotektif etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Sıçan modeli tek doz metotreksat (20 mg/kg) uygulanarak geliştirilmiştir. Empagliflozin ve NHDC, sırasıyla 10 - 30 mg/kg ve 40 - 80 mg/kg şeklinde 14 ardışık gün boyunca iki doz olarak uygulanmıştır, referans standart olarak N-asetilsistein (150 mg/kg) kullanılmıştır. Empagliflozin ve NHDC ile ön tedavi, renal fonksiyon biyobelirteçlerinde, histopatolojik yıpranmada ve renal oksidatif parametrelerde önemli azalmayla sonuçlanmıştır. Ayrıca, Empagliflozin ve NHDC ön işlemi belirgin bir şekilde proinflamatuvar biyobelirteçler olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu seviyesinde ve NF- $\kappa$ B, Keap1, HSP70 ve kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesinde belirgin düşüşler, Nrf2, PPAR $\gamma$  ve HO-1 ekspresyon seviyelerinde dikkate değer artışlar sağlamıştır. Empagliflozin ve NHDC oksidatif stresi, renal dokuda serbestleşmeyi, inflamatuvar mediatörlerin proliferasyonunu ve apoptotik reaksiyonları sınırlayabilir. Empagliflozin ve NHDC'nin, metotreksatın neden olduğu böbrek hasarına karşı koruma sağlamak veya en azından yan etkilerini azaltmak adına daha ileri klinik uygulamalar için ümit verici olduğu sonucuna varılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan, ağırlıkları 250 - 350 g arasında değişen toplam 28 adet dişi Wistar albino türü sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan 16.02.2023 tarih ve 64583101/2023/23 sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır. Tüm hayvan deneyleeri ADÜ Veterinerlik Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında Mart 2023 tarihinde yapılmıştır. Hayvanların, deney öncesinde kafeslerde, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanan oda sıcaklığı 24-26°C arasında tutulan kontrollü bir odada bulunmaları sağlandı. Ratlar özel olarak kafeslerde temizlik ve hijyen koşullarına özen gösterilerek beslendi. 28 adet sıçan 4 gruba ayrıldı. Deneyin uygulanışı ve makroskopik değerlendirilmesi Resim 1 ve Resim 2 de gösterilmiştir.

##### 3.1.2. Deney Grupları

Gruplara aynı şekilde standart sıçan yemi ve su verilerek beslenmeleri sağlandı. Hayvanların her gün altları temizlenerek gerekli bakımları yapıldı. Sıçanlarda kolit oluşturmak için, ketamin ile anestezi sonrası 8 cm uzunluğunda bir kanül ile % 0,9 NaCl içinde 1 ml %5 asetik asit intrarektal olarak uygulandı (Iseri ve diğerleri, 2009). Kolit oluşumu sonrasında sıçanlar bir süre daha baş aşağı pozisyonda tutuldu.

Uygulanacak olan NHDC Sigma – Aldrich'den (W381101) temin edildi. NHDC 0.5% karboksimetil selüloz içinde çözündürülerek gavaj ile 150 mg/kg vücut ağırlığı / gün NHDC (Suarez ve diğerleri, 1996) olacak şekilde verildi.

Çalışmada kullanılacak sıçanlar rastgele olarak aşağıda belirtilen 4 gruba ayrılarak randomizasyon sağlanmıştır. Örneklem büyüklüğü Power-test ile G-Power 3.1 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. 4 bağımsız grup karşılaştırılacağı için tek-yönlü varyans analizi (one-way ANOVA ya da Kruskal-Wallis testi) yapılacağı göz önünde bulundurularak, etki büyüklüğü: 0.4, hata olasılığı: 0.05, güç: 0.95 olarak belirlenince toplam örneklem büyüklüğünün 112 birey olacağı bulunmuştur. Power-test sonucu elde edilen örneklem büyüklüğü çok fazla olduğu için, örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için benzer çalışmalara başvurulmuştur. Bu çalışmalar esasınca grup başına 7 olmak üzere, toplam 28 adet sıçan kullanılmıştır.

**Grup 1. Kontrol Grubu (n=7):** Kontrol grubundaki hayvanlar, kolit ve tedavi grupları için referans sağlayacak olan gruptur. Bundan dolayı bu gruptaki sıçanlar diğer grupları oluştururken olduğu gibi randomize şekilde seçilmiştir, hangi gruptan olacağı rastgele belirlenmiştir. Herhangi bir grubun üyesi olan sıçanların herhangi bir farklılığı, anormalitesi veya patolojisinin olmadığı deneyden önce deney hayvanları laboratuvarı tarafından belirlenmiştir. Bu gruptaki hayvanların, hareket alanları, aydınlık/karanlık döngüleri ve beslenme düzenleri diğer gruplar ile aynıdır. Beslenmeleri standart sıçan yemi ile ad libitum olarak sağlanmıştır, içtikleri su günlük değiştirilerek katkısız çeşme suyu şeklinde sağlanmıştır. Oda koşulları deney hayvanlarına uygun sıcaklık (24-26°C) ve nemde (%50), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüye göre düzenlenmiştir. Hayvanların herhangi bir stres yaratıcı koşul ile karşılaşması önlenmiştir, korku, susuzluk, nem azlığı/fazlalığı, açlık, sıcaklık azlığı/fazlalığı, işlem harici insan teması gibi girişimlerden kaçınılmıştır. Deney hayvanları üzerinde her türlü girişim deney hayvanı kullanımı sertifikasına sahip yetkili personel tarafından uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlar, diğer gruplardaki hayvanlarda olduğu gibi kolite maruz bırakılmamıştır. Deney sonuna kadar bu grupta bir kayıp yaşanmamıştır. Bu gruptaki hayvanlara karboksimetil selüloz'un kolit üzerine etkisinin elimine edilmesi amacıyla 7 gün boyunca gavaj ile 0,5% CMC diğer gruplara eşit hacimde verilmiştir. Deney başladıktan 7 gün sonra sıçanlar anestezi (50 mg/kg ketamin HCL + 5 mg/kg ksilazin) altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Kan örnekleri kalpten enjektörle (2 cc) alınarak, kolon dokuları laparotomi yöntemiyle histopatolojik analizler için alınmıştır.

**Grup 2. Kolit Grubu (n=7):** Kolit grubundaki sıçanlar diğer grupları oluştururken olduğu gibi randomize şekilde seçilmiştir, hangi gruptan olacağı rastgele belirlenmiştir. Herhangi bir grubun üyesi olan sıçanların herhangi bir farklılığı, anormalitesi veya patolojisinin olmadığı deneyden önce deney hayvanları laboratuvarı tarafından belirlenmiştir. Bu gruptaki

hayvanların, hareket alanları, aydınlık/karanlık döngüleri ve beslenme düzenleri diğer gruplar ile aynıdır. Beslenmeleri standart sıçan yemi ile ad libitum olarak sağlanmıştır, içtikleri su günlük değiştirilerek katkısız çeşme suyu şeklinde sağlanmıştır. Oda koşulları deney hayvanlarına uygun sıcaklık (24-26°C) ve nemde (%50), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüye göre düzenlenmiştir. Hayvanların herhangi bir stres yaratıcı koşul ile karşılaşması önlenmiştir, korku, susuzluk, nem azlığı/fazlalığı, açlık, sıcaklık azlığı/fazlalığı, işlem harici insan teması gibi girişimlerden kaçınılmıştır. Deney hayvanları üzerinde her türlü girişim deney hayvanı kullanımı sertifikasına sahip yetkili personel tarafından uygulanmıştır. Bu grupta başta 8 adet hayvan kullanılmış deney sırasında bir kayıp yaşanmış kalan 7 hayvan ile deney sonlandırılmıştır. Sıçanlarda kolit oluşturmak için, deneyin ilk günü ketamin ile anestezi sonrası 8 cm uzunluğunda bir kanül ile % 0,9 NaCl içinde 1 ml %5 asetik asit intrarektal olarak uygulandı. Kolit oluşumu sonrasında sıçanlar bir süre daha baş aşağı pozisyonda tutuldu. Bu gruptaki hayvanlara karboksimetil selüloz'un kolit üzerine etkisinin elimine edilmesi amacıyla 7 gün boyunca gavaj ile 0,5% CMC diğer gruplara eşit hacimde verilmiştir. Deney başladıktan 7 gün sonra sıçanlar anestezi (50 mg/kg ketamin HCL + 5 mg/kg ksilazin) altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Kan örnekleri kalpten enjektörle (2 cc) alınarak, kolon dokuları laparotomi yöntemiyle histopatolojik analizler için alınmıştır.

**Grup 3. Tedavi Grubu (n=7):** Tedavi grubundaki sıçanlar diğer grupları oluştururken olduğu gibi randomize şekilde seçilmiştir, hangi gruptan olacağı rastgele belirlenmiştir. Herhangi bir grubun üyesi olan sıçanların herhangi bir farklılığı, anormalitesi veya patolojisinin olmadığı deneyden önce deney hayvanları laboratuvarı tarafından belirlenmiştir. Bu gruptaki hayvanların, hareket alanları, aydınlık/karanlık döngüleri ve beslenme düzenleri diğer gruplar ile aynıdır. Beslenmeleri standart sıçan yemi ile ad libitum olarak sağlanmıştır, içtikleri su günlük değiştirilerek katkısız çeşme suyu şeklinde sağlanmıştır. Oda koşulları deney hayvanlarına uygun sıcaklık (24-26°C) ve nemde (%50), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüye göre düzenlenmiştir. Hayvanların herhangi bir stres yaratıcı koşul ile karşılaşması önlenmiştir, korku, susuzluk, nem azlığı/fazlalığı, açlık, sıcaklık azlığı/fazlalığı, işlem harici insan teması gibi girişimlerden kaçınılmıştır. Deney hayvanları üzerinde her türlü girişim deney hayvanı kullanımı sertifikasına sahip yetkili personel tarafından uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlarda deney sonlanana kadar herhangi bir kayıp yaşanmamıştır. Sıçanlarda kolit oluşturmak için, deneyin ilk günü ketamin ile anestezi sonrası 8 cm uzunluğunda bir kanül ile % 0,9 NaCl içinde 1 ml %5 asetik asit intrarektal olarak uygulandı. Kolit oluşumu sonrasında sıçanlar bir süre daha baş aşağı pozisyonda tutuldu. Asetik asit ile kolit oluşturulduktan sonra,

gavaj ile 150 mg/kg vücut ağırlığı / gün NHDC (Suarez ve diğerleri, 1996), 0,5% karboksümetil selüloz içinde çözülmüş olarak 7 gün boyunca (Dembinski ve diğerleri, 2016) diğer gruplara eşit hacimde verilmiştir. Deney başladıktan 7 gün sonra sıçanlar anestezi (50 mg/kg ketamin HCL + 5 mg/kg ksilazin) altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Kan örnekleri kalpten enjektörle (2 cc) alınarak, kolon dokuları laparotomi yöntemiyle histopatolojik analizler için alınmıştır.

**Grup 4. Koruyucu Tedavi (Pre Tedavi) Grubu (n=7):** Koruyucu Tedavi grubundaki sıçanlar diğer grupları oluştururken olduğu gibi randomize şekilde seçilmiştir, hangi gruptan olacağı rastgele belirlenmiştir. Herhangi bir grubun üyesi olan sıçanların herhangi bir farklılığı, anormalitesi veya patolojisinin olmadığı deneyden önce deney hayvanları laboratuvarı tarafından belirlenmiştir. Bu gruptaki hayvanların, hareket alanları, aydınlık/karanlık döngüleri ve beslenme düzenleri diğer gruplar ile aynıdır. Beslenmeleri standart sıçan yemi ile ad libitum olarak sağlanmıştır, içtikleri su günlük değiştirilerek katkısız çeşme suyu şeklinde sağlanmıştır. Oda koşulları deney hayvanlarına uygun sıcaklık (24-26°C) ve nemde (%50), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüye göre düzenlenmiştir. Hayvanların herhangi bir stres yaratıcı koşul ile karşılaşması önlenmiştir, korku, susuzluk, nem azlığı/fazlalığı, açlık, sıcaklık azlığı/fazlalığı, işlem harici insan teması gibi girişimlerden kaçınılmıştır. Deney hayvanları üzerinde her türlü girişim deney hayvanı kullanımını sertifikasına sahip yetkili personel tarafından uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlarda deney sonlanana kadar herhangi bir kayıp yaşanmamıştır. Bu gruptaki hayvanlara diğer hayvanlarda deneye başlanmadan 7 gün önce 7 gün boyunca gavaj ile 150 mg/kg vücut ağırlığı /gün NHDC (Suarez ve diğerleri, 1996) 0,5% karboksümetil selüloz içinde çözülmüş olarak diğer gruplara eşit hacimde verilmiştir. 8. Gün kolit ve tedavi grubu ile birlikte bu grupta da ketamin ile anestezi sonrası 8 cm uzunluğunda bir kanül ile % 0,9 NaCl içinde 1 ml %5 asetik asit intrarektal olarak uygulandı. Kolit oluşumu sonrasında sıçanlar bir süre daha baş aşağı pozisyonda tutuldu. Bu grup kolit oluşturulduktan sonraki 7. günde diğer gruplarla birlikte anestezi (50 mg/kg ketamin HCL + 5 mg/kg ksilazin) altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Kan örnekleri kalpten enjektörle (2 cc) alınarak, kolon dokuları laparotomi yöntemiyle histopatolojik analizler için alınmıştır.



**Resim 1.** Deneyin Uygulanışı.



**Resim 2.** Kontrol grubundaki hayvanların makroskobik değerlendirilmesi.

## 3.2.Yöntem

### 3.2.1. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Biyokimyasal analiz için kullanılacak dokular, hızla -80 °C'lik dondurucuya alınarak analiz gününe kadar muhafaza edildi. Analizlerin yapılacağı gün dokular oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra % 0.9'luk NaCl çözeltisinde yıkanarak 50 mM fosfat tamponunda (PBS), pH 7.0'da 0-4 °C'de (w/v = 1/9) doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenatlar 12.000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra kitlerde kullanılacak süpernatant kısım tüplere aktarıldı.

Doku 8-OhdG düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0031Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. 8-OhdG düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Doku CAT düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0869Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. CAT düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Doku COX-2 düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0296Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. COX-2 düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Doku IL-10 düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0108Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. IL-10 düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

Doku MDA düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0156Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. MDA düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar nmol/ml olarak ifade edildi.

Doku MPO düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0574Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. MPO düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Doku NF-κB düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0287Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. NF-κB düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Doku TGF-β1 düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E1688Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. TGF-β1 düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/L olarak ifade edildi.

Doku TNF-α düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0764Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. TNF-α düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/L olarak ifade edildi.

Serum TAS düzeylerinin ölçümü, Rel Assay Diagnostik test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. Kitin çalışma prensibine göre; numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. 660 nm'de absorbans değişimi numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Test, geleneksel olarak bir E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan standart solüsyon ile kalibre edilir. Sonuçlar mmolTroloxEquiv./L olarak ifade edilmiştir.

Serum TOS düzeylerinin ölçümü, Rel Assay Diagnostik test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. TOS yöntemi, asidik bir ortamda çeşitli oksitleyici türlerin varlığında ferröz iyonun ferrik iyonla oksidasyonuna dayanır ve ferrik iyonun ölçümü xilenol orange tarafından sağlanır. Sonuçlar μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L olarak ifade edilmiştir.

Oksidatif stres indeksi (OSI) hesabı:

$$OSI = \frac{TOS}{TAS \times 10}$$

formülüyle hesaplanmıştır.

Serum IFN- $\gamma$  düzeylerinin ölçümü, Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan (Cat. No.E0103Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. IFN- $\gamma$  düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar ng/L olarak ifade edildi.

Serum IL-6 düzeylerinin ölçümü, Bostonchem'den satın alınan (Cat. No.BLS-1158Ra) test kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. IL-6 düzeyleri, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanılarak kolorimetrik yöntemle belirlendi ve sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

### **3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi**

Nekropsisi yapılan her hayvanın makroskobik incelemeleri yapılarak kolon dokularından örnekler alınarak %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 24-48 saat aralığında tespit edildi. Doku küçültme işleminin ardından dokular 6-8 saat akan çeşme suyu altında yıkanıp rutin doku takip cihazında dereceli alkol (50°, 70°, 80°, 96° ve 99,6°) ve ksilol serilerinden geçirilip parafin emdirildikten sonra parafine bloklandı. Bloklanan dokulardan lamlara 4-5  $\mu$ m kalınlığında seri kesitler alındı ve bu kesitler ksilolde deparafinize edilerek, ardından rehidrasyon amacıyla dereceli alkol serilerinden geçirildi (99,6°, 96°, 80°, 70° ve 50°) ve distile suya alındı. Rutin olarak hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanan kesitler Entellan ve lamel ile kapatılarak histopatolojik olarak trinoküler araştırma mikroskopu ile incelendi ve mikrofotografaları çekildi (Olympus BX51, Tucsen 5MP dijital kamera).

### **3.2.3. İmmünohistopatolojik Değerlendirme Yöntemi**

İmmünohistokimyasal analizler ticari immünperoksidaz kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, #TP-125-HL) protokolünde tanımlandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kısaca; parafin kesitler ksilolde deparafinize edilip, dereceli alkollerden geçirilerek rehidre edildikten sonra ve ph 6.0 sodium sitrat solüsyonunda (Sigma-Aldrich, #C9999) 30 dakika kaynatılarak antijen-geri alma işlemi yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için 3% hidrojen peroksit ile 10 dakika süreyle inkübe edildi. Sonrasında, normal keçi serumuyla 7 dakika muamele edilip ve kesitler oda sıcaklığında nem kutusunda 60 dakika boyunca; anti-

kaspaz-3 antibody ile inkübasyona bırakıldı. Biotinlenmiş sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology) ile inkübe edildikten sonra, avidin-biotin-peroksidaz kompleksinde (Santa Cruz Biotechnology) 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilip ve PBS'de (fosfat tamponlu salin) durulandı. DAB kromojen ve Mayer's hemotoksilenle boyanarak, ksilen bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

### 3.2.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Verilerin analizi Graphpad Prism Version 8.0.2 programı ile yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Ayrılan grupların dağılımları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Veriler normallikten önemli ölçüde saptığında veriler log transform kullanılarak dönüştürüldü ve normallik açısından yeniden test edildi. Dönüştürülen veriler artık normallikten önemli ölçüde sapmıyorsa, dönüştürülen veriler üzerinde parametrik testler gerçekleştirildi. Log dönüşümü mümkün değilse veya dönüştürülen veriler hala normallikten önemli ölçüde sapıyorsa, dönüştürülmemiş veriler üzerinde parametrik olmayan testler gerçekleştirilmiştir.

Dağılımın veya log transform dağılımının normal çıktığı durumlarda, bir parametrik test olan “tek yönlü varyans analizi” (one-way ANOVA) yöntemi uygulanmıştır. Testin sonucunun istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) çıktığı durumlarda hangi grupların birbirinden farklılık gösterdiğini bulmak için post-hoc test olarak Tukey's HSD testi kullanılmıştır. Eğer ki Shapiro-Wilk testine göre grupların dağılımları normal değil ise, bu durumda parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılarak gruplar arasında anlamlı fark ( $p < 0.05$ ) olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildiği takdirde hangi grupların birbirinden farklılık gösterdiğinin tespiti post-hoc Dunn test ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

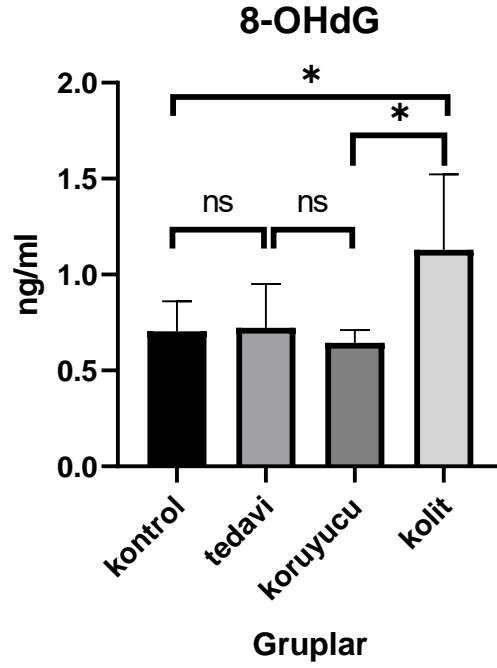
Çalışmamızda, Asetik asit ile oluşturulan deneysel kolit modelinde NHDC'nin sıçan bağırsağında tedavi edici etkisi incelenmiştir.

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi için; CAT, IL - 10, 8-OHdG, MDA, MPO, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ 1 ve COX-2, homojenize edilmiş kolon dokusundan alınan örnekler; TAS, TOS, IL - 6, IFN- $\gamma$  ise sıçanlardan alınan serum örnekleri uygun şekillerde işleme alınarak biyokimyasal kitler aracılığı ile biyokimyasal parametrelerin miktar ve aktivite değerleri saptanmıştır. Biyokimyasal parametre değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

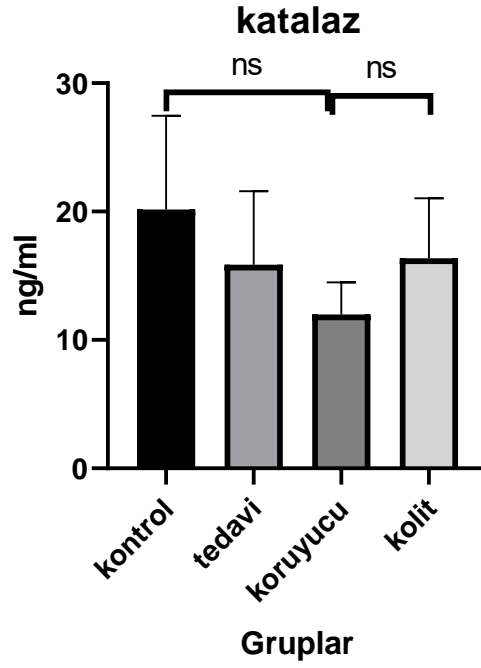
**Tablo 3.** Biyokimyasal parametre değerleri.

	Kontrol	Tedavi	Koruyucu	Kolit
8-OHdG (ng/ml)	0,7034 ± 0,1573	0,7225 ± 0,2283	0,6436 ± 0,06692	1,128 ± 0,3942
Katalaz (ng/ml)	20,17 ± 7,284	15,87 ± 5,720	11,98 ± 2,513	16,37 ± 4,666
COX-2 (ng/ml)	1,140 ± 0,3693	1,077 ± 0,3003	0,9314 ± 0,1432	1,768 ± 0,8499
IL-10 (pg/ml)	59,86 ± 23,72	46,38 ± 9,939	39,81 ± 4,631	91,63 ± 34,32
MDA (nmol/ml)	0,7165 ± 0,3196	0,5300 ± 0,1386	0,4383 ± 0,03085	0,9902 ± 0,5123
MPO (ng/ml)	7,973 ± 2,828	6,580 ± 2,434	6,024 ± 1,048	17,57 ± 9,537
NF-κB (ng/ml)	1,287 ± 0,5459	1,100 ± 0,3638	0,8821 ± 0,1253	2,060 ± 0,7682
TGF-β1 (ng/L)	220,5 ± 97,22	139,2 ± 84,50	124,8 ± 59,95	374,0 ± 231,5
TNF-α (ng/L)	46,54 ± 7,366	43,00 ± 9,231	41,00 ± 5,474	65,73 ± 18,27
TAS (mmolTrolox Equiv./L)	1,221 ± 0,1685	1,101 ± 0,1411	0,9943 ± 0,1936	0,8543 ± 0,1636
TOS (μmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv./L)	9,984 ± 1,499	13,49 ± 1,563	11,63 ± 1,749	16,43 ± 2,143
IFN-γ (ng/L)	25,08 ± 2,018	34,12 ± 6,105	36,31 ± 6,346	43,88 ± 5,578
IL-6 (pg/ml)	3,510 ± 0,8672	4,293 ± 0,4149	4,747 ± 0,5897	5,139 ± 0,6478
OSI (TOS/[TAS x 10])	0,817	1,225	1,169	1,923



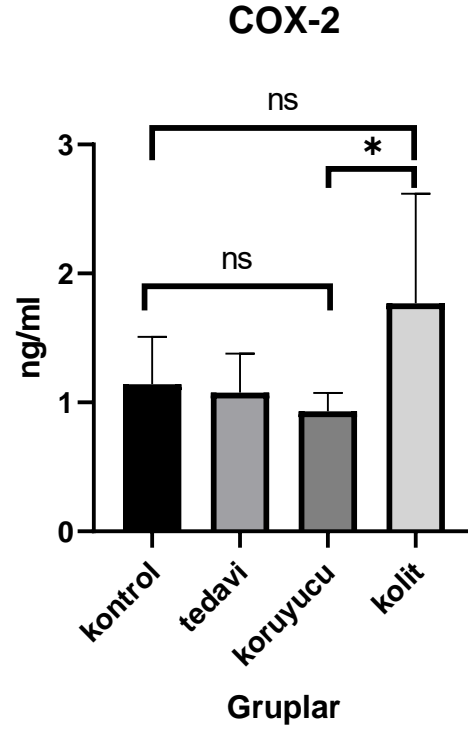
**Şekil 3.** 8-OHdG düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku 8-OHdG düzeyleri, koruyucu tedavi ve tedavi gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p < 0,05$ ). Koruyucu, kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin 8-OHdG oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 3).



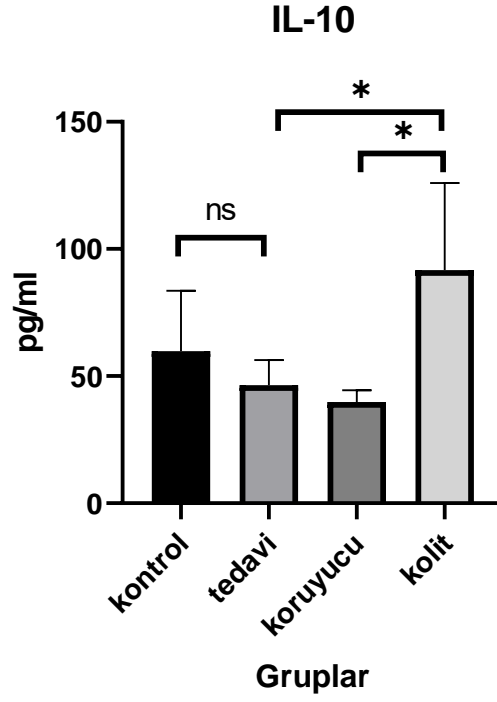
**Şekil 4.** Katalaz düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku katalaz düzeyleri kontrol grubunda kolit ve tedavi gruplarına göre daha yüksek olsa da gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark ( $p>0.05$ ) bulunamamıştır (Şekil 4).



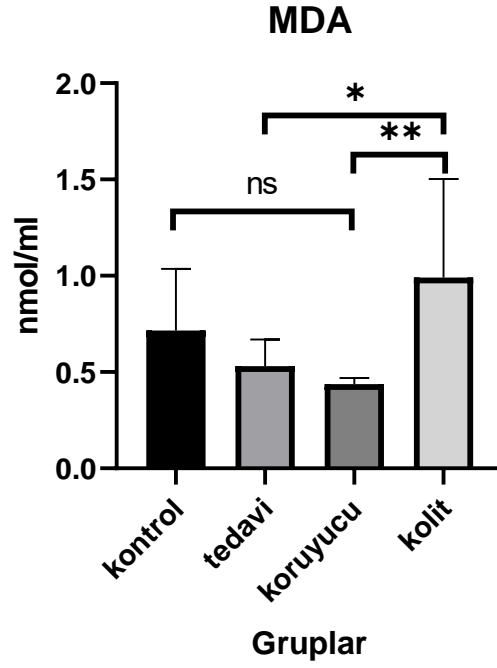
**Şekil 5.** COX-2 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku COX-2 düzeyleri koruyucu tedavi grubunda kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olarak daha az bulunsa da diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark ( $p > 0.05$ ) bulunamamıştır (Şekil 5).



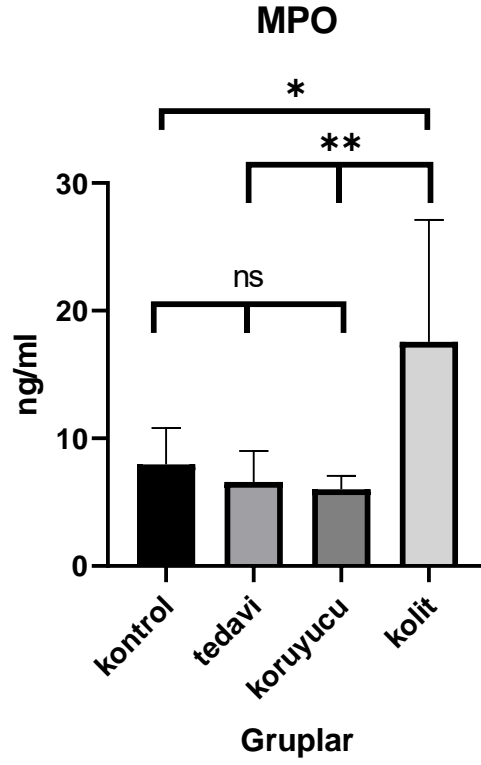
**Şekil 6.** IL-10 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku IL-10 düzeyleri, koruyucu tedavi ve tedavi gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin IL-10 oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 6).



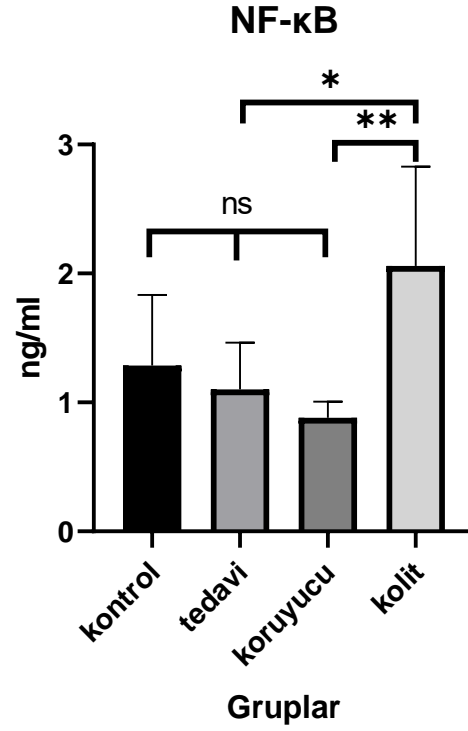
**Şekil 7.** MDA düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku MDA düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p < 0.01$ ) ve tedavi ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin MDA oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 7).



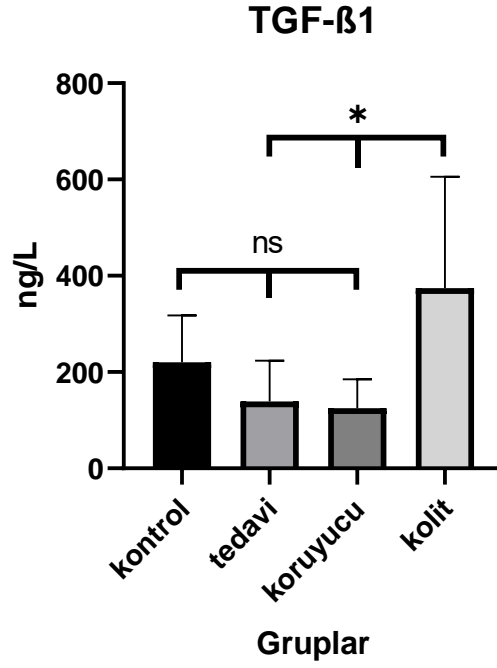
**Şekil 8.** MPO düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku MPO düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p < 0.01$ ), tedavi ( $p < 0,01$ ) ve kontrol ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Tedavi grupları arasında ve tedavi grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin MPO oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 8).



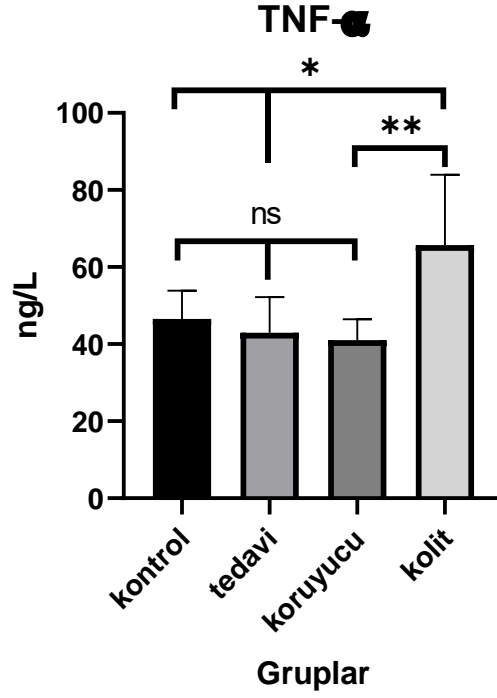
**Şekil 9.** NF-κB düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*:  $p<0.01$ , \*:  $p<0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku NF-κB düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p<0.01$ ) ve tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin NF-κB oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 9).



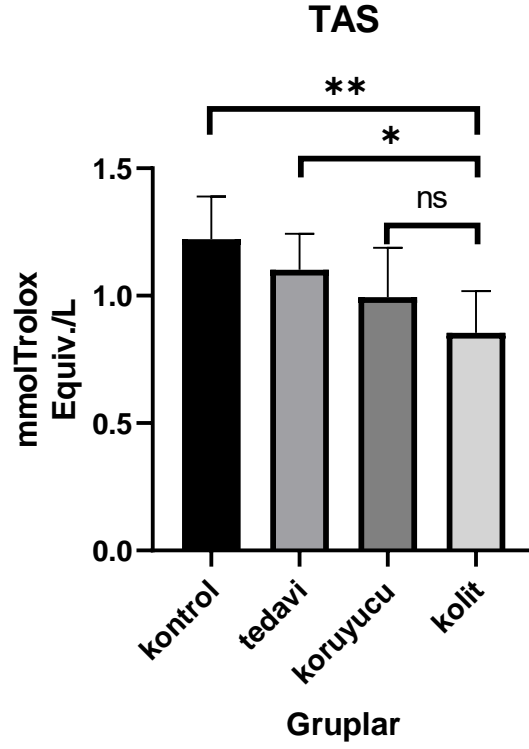
**Şekil 10.** TGF-β1 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku TGF-β1 düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p < 0.05$ ) ve tedavi ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin TGF-β1 oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 10).



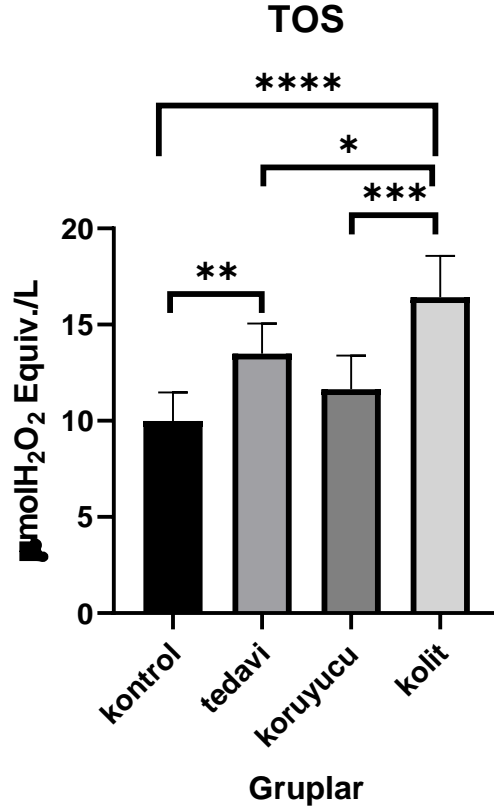
**Şekil 11.** TNF- $\alpha$  düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde doku TNF- $\alpha$  düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p < 0.01$ ), tedavi ( $p < 0,05$ ) ve kontrol ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Tedavi grupları arasında ve tedavi grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin TNF- $\alpha$  oluşumunu anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 11).



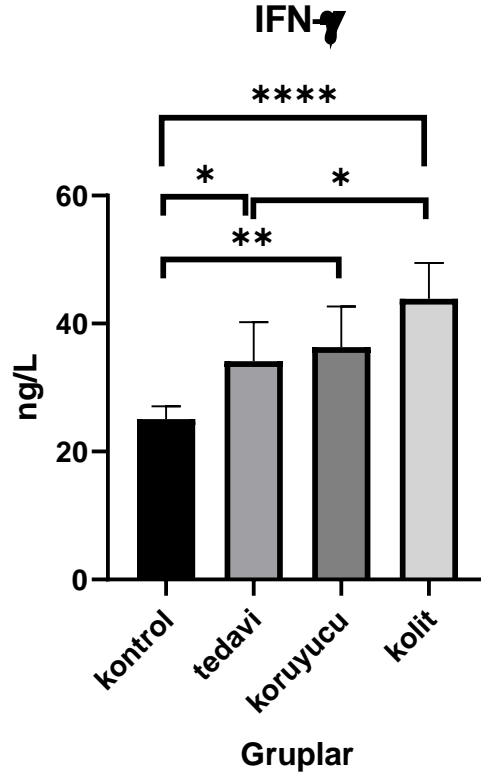
**Şekil 12.** TAS düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde serum TAS düzeyleri, kontrol ( $p < 0.01$ ) ve tedavi ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazladır. Tedavi grupları arasında ve tedavi grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin TAS düzeylerini anlamlı düzeyde arttırdığını göstermektedir (Şekil 12).



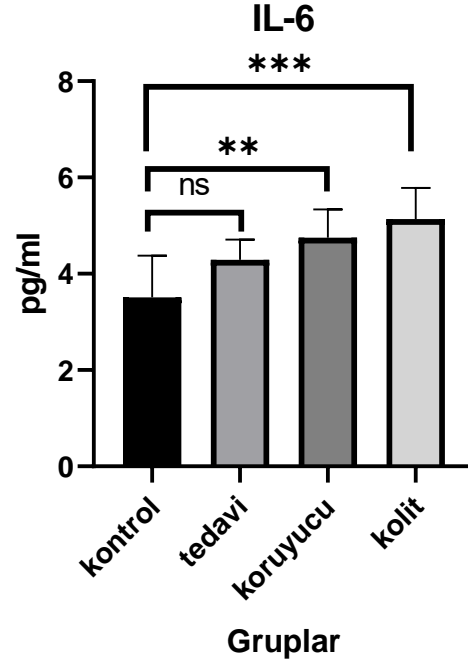
**Şekil 13.** TOS düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde serum TOS düzeyleri, kontrol ( $p < 0.0001$ ), koruyucu tedavi ( $p < 0.001$ ) ve tedavi ( $p < 0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdır. Tedavi grupları arasında ve koruyucu tedavi grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken ( $p > 0,05$ ), kontrol grubunda tedavi grubuna kıyasla TOS düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı şekilde daha azdır ( $p < 0.001$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin TOS düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 13).



**Şekil 14.** IFN- $\gamma$  düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*\*\*:  $p<0.0001$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*:  $p<0.05$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde serum IFN- $\gamma$  düzeyleri, kontrol ( $p<0.0001$ ) ve tedavi ( $p<0.05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdır. Tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ( $p>0.05$ ) ve koruyucu tedavi ve tedavi grubuna göre kontrol grubunda serum IFN- $\gamma$  düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha azdır (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ). Bu sonuçlar NHDC'nin IFN- $\gamma$  düzeylerini koruyucu tedavi grubunda olmasa da tedavi grubunda anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 14).



**Şekil 15.** IL-6 düzeylerinin gruplar arasında dağılımı (\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , ns: istatistiksel açıdan anlamlı değil).

Biyokimyasal analizde serum IL-6 düzeyleri, kontrol ( $p < 0.001$ ) grubunda kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az bulunsa da, NHDC'nin IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığına dair bir bulgu yoktur ( $p > 0.05$ ) (Şekil 15).

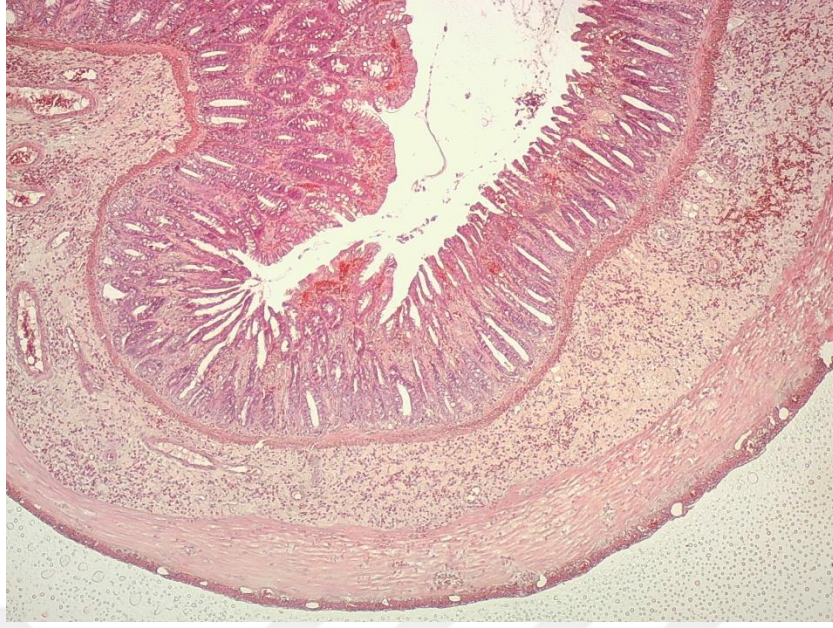
#### 4.2. Histopatolojik Bulgular

**Kontrol Grubu:** Bu grupta incelenen örneklerde; bağırsak mukozası yüzey epiteli ve kriptler arasında yaygın goblet hücreleri içeren ve lümeneye doğru papiller uzantılar yapan villuslar ile L. propriyada birkaç olguda az sayıda lenfoplazmasiter hücreler ile tek tük eozinofil lökositlerin yer aldığı normal kolon histolojisi izlenmiştir (Resim 3).



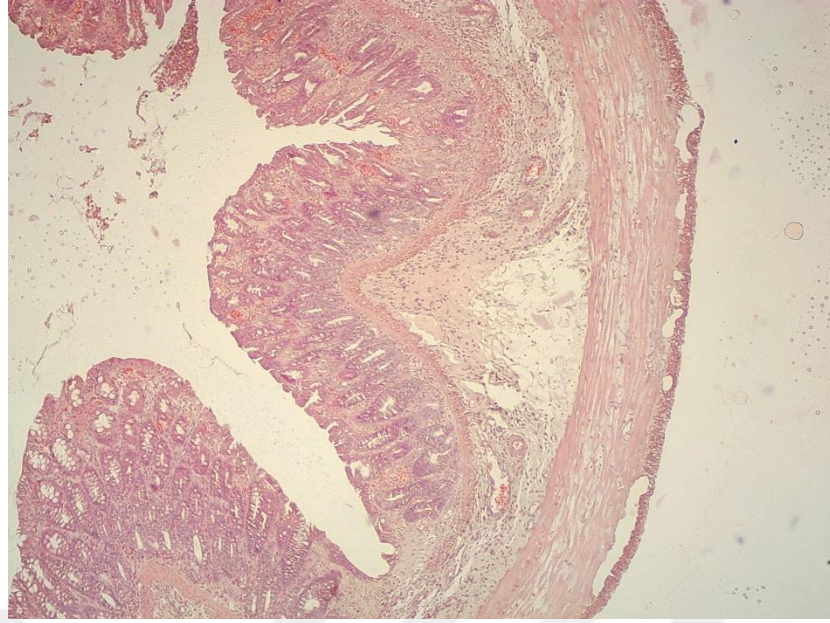
**Resim 3.** Kontrol grubu: Normal kolon yapısı ve epitel dokusu (H&E ×40).

**Kolit Grubu:** Bu grupta genel olarak lamina epitelyalisten başlayarak, lamina propriya ve submukozayı da içine alarak Tunika muskularisin değişen derecelerde etkilendiği, yer yer serozaya kadar uzanan yaygın ve ileri derecede nekrotik değişiklikler gözlemlendi. Nekroz dağılımı 4 olguda bağırsak yüzeyini tamamen içerisine almakla birlikte, 2 olguda fokal nekrozlarla karakterize ve sağlam epitel ve mukoza katmanlarından keskin sınırlarla ayrılmaktaydı. Nekrotik bölgelerde; yoğun ödem, çok sayıda polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu ve yaygın hemorajiler eşlik etmekte birlikte, nekrotik dokuların morfolojik olarak seçilemediği, amorf homojen eozinofilik görünüm aldıkları dikkati çekti. Şiddetli nekrozların şekillendiği olgularda, seroza ile nekrotik müsküler kat sınırında, çoğunluğu karyorektik nötrofil lökositler ve nekrotik hücrelere ait kromatin kalıntılarından oluşan geniş bir band izlendi. Bir olguda, epitel katmanın kaybolduğu, propriyada genç fibroblastlar ve neovaskülarizasyon ile karakterize granülasyon dokusu şekillendiği gözlemlendi. Yalnız iki olguda, histopatolojik değişikliklerin propriya ve submukozada hafif ve orta derecede hiperemi ile multifokal hemoraji, yine hafif polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu ile daha hafif düzeyde şekillendiği gözlemlendi (Resim 4).



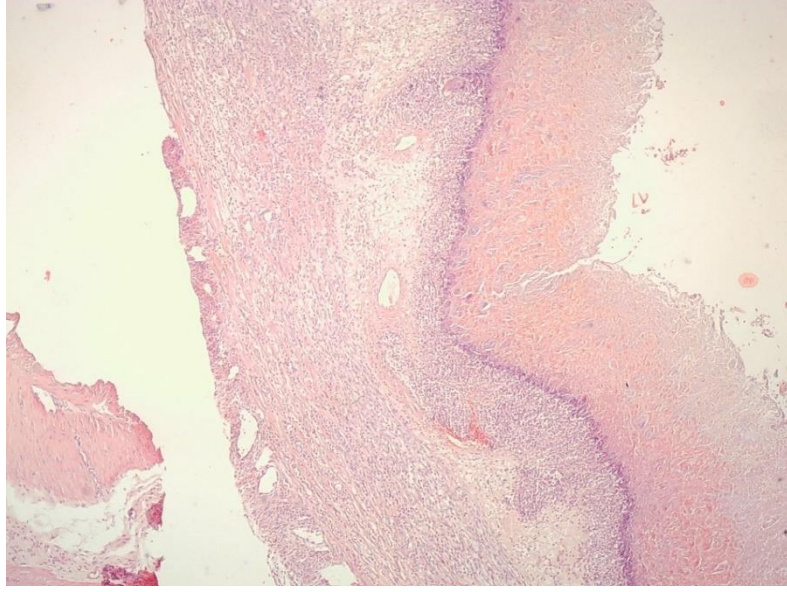
**Resim 4.** Kolit grubu (H&E  $\times 40$ ).

**NHDC Tedavi Grubu:** Bu grupta gözlenen histopatolojik değişiklikler epitel katman ve propriyada fokal olarak bir ya da iki alanda derinlere doğru ilerleyen tarzda nekrotik alanlar şeklinde iken, geri kalan epitel katı ve mukozanın etkilenmediği ve dereceli olarak normal görünümüne sahip olduğu tespit edildi (n=3). Bir olguda, bölgesel olarak şekillenen nekrotik değişikliklerin submukoza, tunika muskularis ve serozayı da aşarak çevrede bulunan mezenteriyal yağ dokuda enflamasyon oluşturduğu gözlemlendi. Bunun yanısıra, iki olguda nekroz bağırsak mukozasının yaklaşık yarısını içerecek şekilde segmental yapı göstermekteydi ve propriya ve submukozada aralarında çok sayıda eozinofil lökositlerin de yer aldığı yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonları mevcuttu. Diğer hafif derecede etkilenen olgular ise değişen derecelerde propriyal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hiperemi, ödem ve multifokal hemorajiler ile karakterizeydi (Resim 5).



**Resim 5.** NHDC Tedavi Grubu (H&E ×40).

**NHDC Koruyucu Tedavi Grubu:** Bu grupta submukoza ve tunika muskulariste daha yaygın olarak şekillendiği görüldü ve bir olgu haricinde tüm bağırsak katmanlarını içine alan nekrotik değişiklikler mevcut değildi. Bununla birlikte 3 olguda, submukozada yaygın enflamasyon ve hemorajiler ile musküler katta, miyofibrillerde pembe eozinofilik görünüm ile karakterize hyalin dejenerasyonu ve şiddetli nekroz izlendi. Diğer olgularda, epitel katı ve propriyal Lieberkuhn kriplerinin normal histolojiye sahip olduğu dikkati çekerken, propriyada makrofaj ve polimorf nükleer lökosit infiltrasyonlarına rastlandı (Resim 6).



**Resim 6.** NHDC koruyucu tedavi grubu (H&E  $\times 40$ ).

Kolit lezyonları değerlendirilirken mukoza epitel dejenerasyon ve nekrozu, enflamasyon, hiperemi, ödem, nekroz ve hemoraji kriterleri kullanılarak, lezyon şiddeti ve yaygınlığına göre (-) Yok; (+) Hafif; (++) Orta; (+++) Şiddetli; (++++) Çok Şiddetli şeklinde semikantitatif skorlama yapıldı.

**Tablo 4.** Kolonda değerlendirilen histopatolojik bulguların semikantitatif skorlanması.

Grup Adı	Epitel Dej/Nekrozu	İnflamasyon	Hiperemi	Ödem	Nekroz	Hemoraji
Kontrol 1	-	+	+	-	-	-
Kontrol 2	-	-	+	-	-	-
Kontrol 3	-	-	-	-	-	-
Kontrol 4	-	-	-	-	-	-
Kontrol 5	-	+	+	-	-	-
Kontrol 6	-	-	-	-	-	-
Kontrol 7	-	-	-	-	-	-
Kolit 1	+	++++	++	++++	++++	++++
Kolit 2	++++	++++	+++	+++	++++	++++
Kolit 3	+++	+++	++++	++++	++	+++
Kolit 4	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Kolit 5	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Kolit 6	+++	+++	+++	+++	++	+++
Kolit 7	+	++	+++	++	+	++
NHDC Tedavi 1	++	++	+++	+++	++	+++
NHDC Tedavi 2	+	++	++	+++	+	++
NHDC Tedavi 3	+	++	++	+++	+	++
NHDC Tedavi 4	++	+++	+++	+	++	++
NHDC Tedavi 5	+	+	++	++	+	+
NHDC Tedavi 6	-	+	++	++	-	++
NHDC Tedavi 7	+	+	+	-	-	+
NHDC Koruyucu 1	+	+++	+++	++	++	++
NHDC Koruyucu 2	-	+	++	++	+	+
NHDC Koruyucu 3	-	+	++	+	+	-
NHDC Koruyucu 4	++	++	++	++	+	++
NHDC Koruyucu 5	+	+++	++	+++	++++	++
NHDC Koruyucu 6	+	+	+++	++	+++	++
NHDC Koruyucu 7	+	+	++	++	++	+

(-) Yok; (+) Hafif; (++) Orta; (+++) Şiddetli; (++++)Çok Şiddetli.

### 4.3. İmmünohistopatolojik Bulgular

Kaspaz-3 antijen ekspresyon derecesinin çalışma gruplarında yeralan her bir olgu için semikantitatif olarak gösterilmesi amacıyla Allred skora metoda kullanıldı (Choudhury ve diğerleri, 2010; Hameed ve diğerleri, 2015). Buna göre; boyanma yoğunluğu skoru; 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun/koyu) olarak belirlendi. Boyanmanın doku içindeki yaygınlığı ise, boyanan hücrelerin incelenen alandaki tüm hücrelere oranına göre belirlendi: 0 (boyanma yok), 1 (>0 ile %1), 2 (>%1 ile %10), 3 (>%10 ile %30), 4 (>%30 ile %60), 5 (>%60 ile %100). Boyanma yoğunluğu skoru ile boyanma yaygınlığı değeri toplanarak herbir olgu için Allred

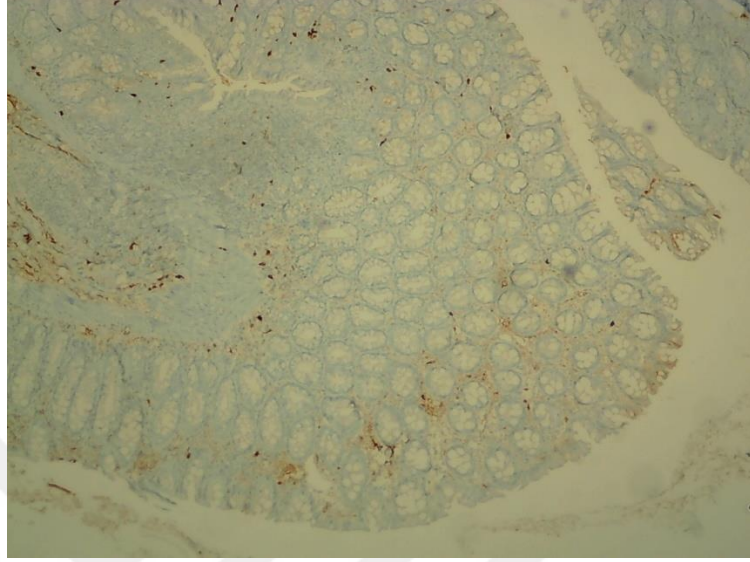
skoru belirlendi. Buna göre ise gruplar arasında kaspaz-3 immün boyanma özellikleri arasındaki skor farkları Tablo 5’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Kaspaz-3 skorlaması.

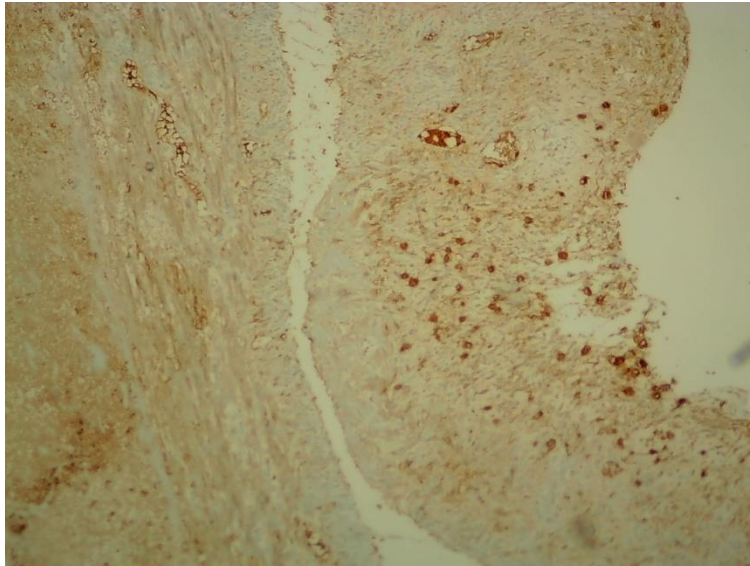
Grup Adı	Boyanma Yaygınlığı	Boyanma Şiddeti	Toplam Skor
Kontrol 1	0	0	0
Kontrol 2	0	0	0
Kontrol 3	1	1	2
Kontrol 4	0	0	0
Kontrol 5	1	1	2
Kontrol 6	0	0	0
Kontrol 7	0	0	0
Kolit 1	4	3	7
Kolit 2	4	3	7
Kolit 3	3	3	6
Kolit 4	5	3	8
Kolit 5	4	2	6
Kolit 6	3	2	5
Kolit 7	3	2	5
NHDC Tedavi 1	3	2	5
NHDC Tedavi 2	2	1	3
NHDC Tedavi 3	1	2	3
NHDC Tedavi 4	3	3	6
NHDC Tedavi 5	1	2	3
NHDC Tedavi 6	1	1	2
NHDC Tedavi 7	1	1	2
NHDC Koruyucu 1	2	1	3
NHDC Koruyucu 2	3	1	4
NHDC Koruyucu 3	1	1	2
NHDC Koruyucu 4	1	2	3
NHDC Koruyucu 5	2	1	3
NHDC Koruyucu 6	3	1	4
NHDC Koruyucu 7	1	1	2

Kaspaz-3 antijen ekspresyonlarının, kolonlarda nekrotik mukoza epiteli ve dejenere Lieberkuhn kriptlerinde koyu kahverenkli homojen sitoplazmik boyanmalar ile karakterize olduğu görüldü. Bununla birlikte genellikle submukoza ve tunika muskulariste histolojik olarak tanımlanan nekrotik alanlarda belirgin şekilde daha yüksek şiddet ve yaygınlıkta immünoekspresyonlar gözlemlendi. Yine L. propriya ve submukozadaki inflamatuvar hücrelerin sitoplazmalarında granüler boyanma ve bazı kapillar duvarları ve damar çevrelerinde ise linear

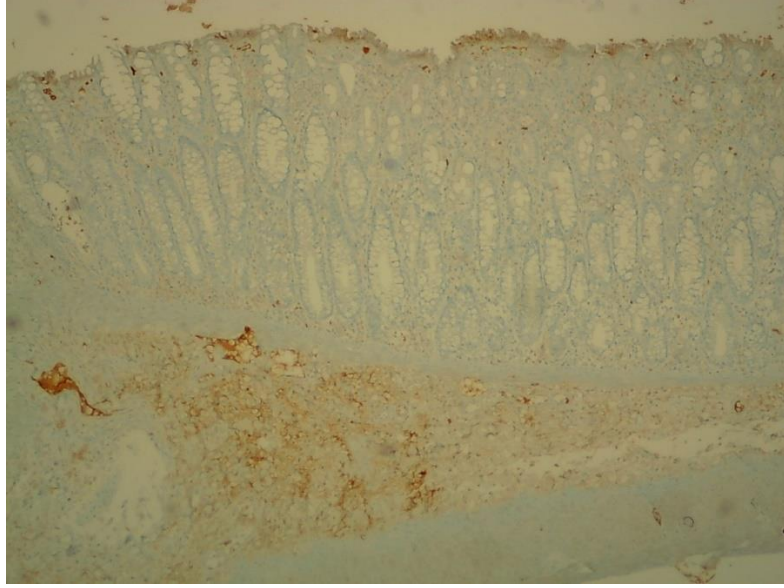
homojen kaspaz-3 antijen ekspresyonları tespit edilmiştir. Kaspaz-3 değerlendirilmesi Resim 7, Resim 8, Resim 9 ve Resim 10'da gösterilmiştir.



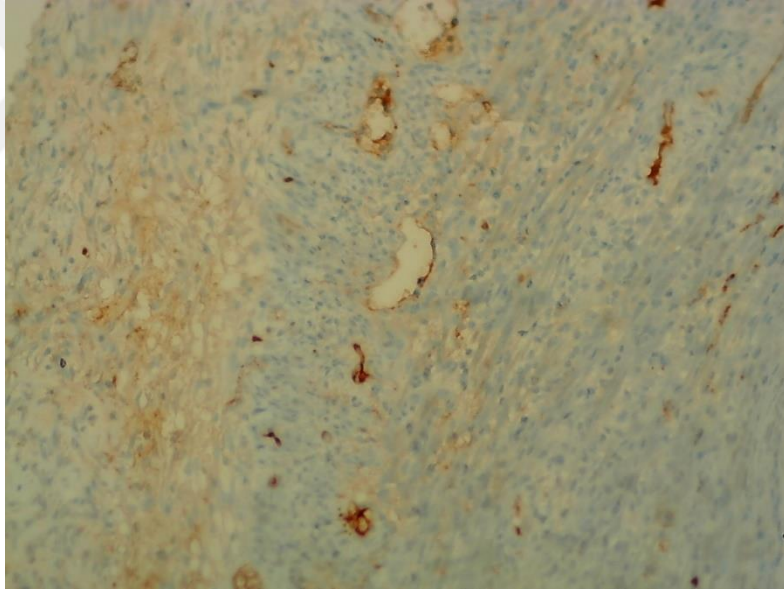
**Resim 7.** Kaspaz-3, Kontrol grubu.



**Resim 8.** Kaspaz-3, Kilit grubu.



**Resim 9.** Kaspaz-3, Tedavi grubu.



**Resim 10.** Kaspaz-3, Koruyucu tedavi grubu.

## 5. TARTIŞMA

Abe ve diğeri (2018) yaptığı çalışmada, kuzeydoğu Asya'ya özgü bir narenciye meyvesi olan yuzu'nun (*Citrus junos*, Tanaka) fare dekstran sülfat sodyum (DSS) kaynaklı kolit modeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Analiz edilen yuzu kabuğu özütünde narirutin ( $774\pm 12$   $\mu$ ), hesperetin 7-(2,6-dirhamnosilglukozit) ( $356\pm 5$   $\mu$ M), naringin ( $513\pm 10$   $\mu$ M), hesperidin ( $1118\pm 15$   $\mu$ M), neohesperidin ( $635\pm 9$   $\mu$ M) ana biyoaktif bileşikler olarak belirlenmiştir. DSS içeren içme suyu verilen fareler, önemli kilo kaybı, kolon kısalması, ishal ve görünür dışkı kanı göstermiştir. Buna karşılık, dekstran sülfat sodyum almadan önce 14 gün boyunca %5 yuzu kabuğu içeren bir diyetle beslenen fareler, bu fenotiplerde önemli bir azalma göstermiştir. Yuzu kabuğu özütünün, lipopolisakkarit ile uyarılan farelerde ve murin makrofaj hücre hattında, NF- $\kappa$ B aktivasyonunun baskılanması yoluyla TNF- $\alpha$  üretimini baskıladığı bulunmuştur. Ayrıca yuzu kabuğu ekstresinin orta düzeyde antioksidan etkiye sahip olduğu doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, yuzu kabuğunun, in vivo olarak lipidlere karşı inflamasyonu ve oksidatif stresi koordineli bir şekilde baskılayarak dekstran sülfat sodyumun neden olduğu kolit patolojilerini azalttığını göstermektedir. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p<0.01$ ) ve tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Ayrıca NF- $\kappa$ B düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p<0.01$ ) ve tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Çalışmamız da Abe ve diğerlerinin çalışmasına benzer şekilde flavonoid kökenli bir bileşik olan NHDC'nin kolit patolojilerini azalttığını göstermektedir.

Zhang ve diğeri (2021) *Agrocybe aegirita*'dan elde edilen flavonoidlerin dekstran sodyum sülfatın neden olduğu kolit üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *Agrocybe aegirita*'dan elde edilen flavonoidlerin farelerin kilo kaybını önlemiştir, kolonun kısalmasını önemli ölçüde azalmış ve doku hasarı ve kolon iltihabı seviyesini iyileştirmiştir. Ayrıca TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  seviyelerinin düşürülmesi ve IL-10 seviyelerinin artırılması dahil olmak üzere kolon inflamatuvar durumunu hafifletmiştir. Ek olarak *Agrocybe aegirita*'dan elde edilen flavonoidler, goblet hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde desteklemiştir ve bağırsak bariyer fonksiyonunu geliştirmiştir. Çalışmamızda da IL-10 düzeyleri, koruyucu tedavi ve tedavi gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p<0,05$ ).

Liu ve diğeri (2020) yaptıkları çalışmada aktif *Flos lonicerae* flavonoidlerini izole etmeyi ve bunların anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkilerini değerlendirmeyi ve ayrıca bu flavonoidlerin ÜK fare modelinde moleküler etkisini araştırmayı amaçlamıştır. *Flos lonicerae*'den toplam flavonoidler ve üç flavonoid (hiperosid, loniserin ve luteolin) izole edilmiştir. ÜK'nin sıçan modeli, 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) zehirlenmesi yoluyla oluşturulmuştur. Flavonoidler, süperoksit dismutaz (SOD), MPO, MDA, prostaglandin E2 (PGE2), TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , CRP gibi ilgili serum oksidatif ve proinflatuar belirteçlerin seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Ek olarak flavonoidler, NF- $\kappa$ B sinyal yolunun ifadesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. *F. lonicerae* flavonoidleri, NF- $\kappa$ B sinyal yolunun inhibisyonu ve anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkiler yoluyla sıçan ÜK modelinde güçlü anti-ÜK aktiviteleri göstermiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde flavonoid kökenli bir bileşik olan NHDC, MDA ve MPO düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır.

Polat ve Karaboğa (2019), yaptıkları çalışmada sıçanlarda indüklenmiş kolit modelinde hesperetin'in TNF- $\alpha$ , protein tirozin fosfataz, reseptör tip C (CD45), kaspaz-3 ve Bax ekspresyonları üzerine etkilerini araştırmıştır. Sıçanlara kolit indüksiyonundan 3 gün önce başlanarak 10 gün hesperetin tedavisi uygulanmıştır. Deney sonunda indirekt immünohistokimya kullanılarak kolon dokusunda TNF- $\alpha$ , CD45, kaspaz-3 ve Bax ekspresyonları belirlenmiştir. Kolit grubunda hem enflamasyon belirteçleri TNF- $\alpha$ , CD45 hem de apoptotik belirteçler kaspaz-3 ve Bax'ın immünreaktivitesinde artış saptanmıştır. Hesperetin tedavisi tüm parametrelerde anlamlı azalma sağlamıştır. Hesperetin tedavisinin, antiinflatuar ve antiapoptotik etkileri sayesinde kolon hasarını önlediği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde Kaspaz-3 skoru ise tedavi ve koruyucu tedavi gruplarında kolit grubuna göre belirgin olarak daha düşük bulunmuştur. Bu da NHDC'nin kolit üzerinde antiapoptotik etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Hu ve diğeri (2014) yaptığı çalışmada fare modelinde, CCl<sub>4</sub>'ün intraperitoneal enjeksiyonuna karşı NHDC'nin akut oksidatif hasar üzerindeki olası hepatoprotektif etkileri araştırılmıştır. Katalaz, toplam süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP-X) ve glutatyon (GSH) gibi hepatik antioksidan seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır. NHDC'nin art arda altı gün boyunca ön tedavisi, bu değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirmiştir. NHDC ile ön işlem ayrıca NF- $\kappa$ B, IL-6, kaspaz-3 ve kaspaz 8'in CCl<sub>4</sub> ile indüklenen protein ekspresyonlarını azaltarak düzenlemiştir. NHDC'nin ön tedavisi, doza bağlı bir şekilde CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu oksidatif hasarı etkili bir şekilde hafifletmiştir. Çalışmamızda NF- $\kappa$ B düzeyleri, koruyucu tedavi (p<0.01) ve tedavi (p<0,05) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli düzeyde azalmiştir. Kaspaz-3 skoru ise tedavi ve koruyucu tedavi gruplarında kolit grubuna göre belirgin olarak daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar NHDC'nin antiinflamatuvar özelliğinin bağırsak mukozasına etkili olduğunu göstermektedir.

Shi ve diğeri (2015) yaptığı çalışmada, farelerde parakuat (PQ) kaynaklı akut karaciğer hasarına karşı yapay tatlandırıcı NHDC'nin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Tutarlı bir şekilde, parakuat, glutatyon peroksidaz (GP-X), glutatyon-S-transferaz (GST) ve katalaz aktivitelerini, glutatyon (GSH) seviyesini ve antioksidan kapasiteyi azaltmıştır. Bununla birlikte, NHDC, bu parametreleri tersine çevirerek farelerde parakuat kaynaklı hepatik toksisiteyi iyileştirmiştir. Ek olarak, NHDC, parakuat kaynaklı nükleer faktör-kappa β ekspresyonunu ve mitokondriyal güdümlü apoptotik sinyalleşmeyi önemli ölçüde inhibe etmiştir. Çalışmamızda TAS düzeyleri, tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubunda göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulunmuştur. TOS düzeyleri ise, koruyucu tedavi ( $p<0.001$ ) ve tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az bulunmuştur. Bu durum NHDC'nin toplam antioksidan kapasiteyi arttırarak oksidan kapasiteyi azaltarak kolit üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu ortaya koymuştur.

Suarez ve diğeri (1996) Wistar sıçanlarla yaptığı çalışmada etanol ile indüklenmiş akut gastrik ülser üzerinde, neohesperidin dihidrokalkon'un hem 100 hem de 150 mg/kg dozlarda antiülser aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, aynı dozlarda hesperidinin etkisiz olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda NHDC asetik asitin oluşturduğu doku hasarını makroskobik ve mikroskobik olarak azaltmıştır.

Osman ve diğeri (2021) tarafından yapılan bir çalışmada metotreksat ile böbrek hasarı tetiklenen sıçan modelinde empagliflozin ve neohesperidin dihidrokalkonun nefroprotektif etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Empagliflozin ve NHDC ile ön tedavi, renal fonksiyon biyobelirteçlerinde, histopatolojik yıpranmada ve renal oksidatif parametrelerde önemli azalmayla sonuçlanmıştır. Ayrıca, Empagliflozin ve NHDC ön işlemi belirgin bir şekilde proinflamatuvar biyobelirteçler olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu seviyesinde ve NF- $\kappa$ B, Keap1, HSP70 ve kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesinde belirgin düşüşler, Nrf2, PPAR $\gamma$  ve HO-1 ekspresyon seviyelerinde dikkate değer artışlar sağlamıştır. Empagliflozin ve NHDC oksidatif stresi, renal dokuda serbestleşmeyi, inflamatuvar mediatörlerin proliferasyonunu ve apoptotik reaksiyonları sınırlayabilir. Empagliflozin ve NHDC'nin, metotreksatın neden olduğu böbrek hasarına karşı koruma sağlamak veya en azından yan etkilerini azaltmak adına daha ileri klinik uygulamalar için ümit verici olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  düzeyleri, koruyucu tedavi ( $p<0.01$ ) ve tedavi ( $p<0,05$ ) gruplarında kolit grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli düzeyde azalmiştir. Ayrıca MDA ve MPO düzeyleri de istatistiksel olarak anlamli şekilde azalmiştir. Bu durum NHDC'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özellik sergileyerek kolitin tedavisinde etkili olduğunu düşündürmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmada NHDC'nin ülseratif kolit oluşturulan sıçanlarda, MDA, MPO, TAS, TOS değerleri üzerinden koruyucu bir antioksidan etkisinin olduğu düşünülmüştür. NHDC verilen gruplarda TNF-  $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1, COX-2 ve IFN- $\gamma$  değerlerinin istatistiksel anlamlı düzeyde düşmesi antiinflamatuvar etkinliğini göstermektedir. Çalışmamızda biyokimyasal ve histolojik ve immünohistokimyasal bulgular NHDC'nin ülseratif kolit oluşturulan ratlarda olumlu sonuçlar sağladığını göstermiştir. NHDC'nin ülseratif kolit üzerindeki etkileri konusunda çalışmamız haricinde mevcut bir çalışma yoktur. Çalışmamızdan çıkan sonuçlardan diğer otoimmün, inflamasyona neden olan çölyak, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multiple skleroz, romatoid artrit gibi hastalıklarda da olumlu etkilere sahip olabileceği düşünülebilir. Bu hastalıklar için de gelecekte bilimsel araştırmalar gerçekleştirilebilir. Ayrıca çeşitli moleküler çalışmalarla NHDC'nin inflamasyon yolları üzerindeki etkisi araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Aardoom, M. A., Veereman, G., & de Ridder, L. (2019). A review on the use of anti-TNF in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2529.
- Abdali, D., & Narula, N. (2021). A165 does appendectomy prevent the subsequent development of ulcerative colitis?: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, 4(Supplement\_1), 174-175.
- Abe, H., Ishioka, M., Fujita, Y., Umeno, A., Yasunaga, M., Sato, A., ... & Nakajima, Y. (2018). Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) peel attenuates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis. *Journal of oleo science*, ess17184.
- Amirshahrokhi, K. (2019). Febuxostat attenuates ulcerative colitis by the inhibition of NF- $\kappa$ B, proinflammatory cytokines, and oxidative stress in mice. *International Immunopharmacology*, 76, 105884.
- Amirshahrokhi, K. (2021). Acrylamide exposure aggravates the development of ulcerative colitis in mice through activation of NF- $\kappa$ B, inflammatory cytokines, iNOS, and oxidative stress. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(3), 312.
- Atreya, I., Atreya, R., & Neurath, M. F. (2008). NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. *Journal of internal medicine*, 263(6), 591-596.
- Berkowitz, L., Schultz, B. M., Salazar, G. A., Pardo-Roa, C., Sebastián, V. P., Álvarez-Lobos, M. M., & Bueno, S. M. (2018). Impact of cigarette smoking on the gastrointestinal tract inflammation: opposing effects in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Frontiers in immunology*, 9, 74.
- Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E., & Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91(4), 854-862.
- Buran, T. (2017). İnflamatuar Barsak hastalığında epidemiyoloji, prevalans ve insidans. *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics*, 10(1), 15-7.

- Choi, S., Yu, S., Lee, J., & Kim, W. (2021). Effects of Neohesperidin Dihydrochalcone (NHDC) on Oxidative Phosphorylation, Cytokine Production, and Lipid Deposition. *Foods*, *10*(6), 1408.
- Choudhury, K. R., Yagle, K. J., Swanson, P. E., Krohn, K. A., & Rajendran, J. G. (2010). A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *58*(2), 95-107.
- D'amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*, *17*(7), 1104-1114.
- Deepak, P., & Bruining, D. H. (2014). Radiographical evaluation of ulcerative colitis. *Gastroenterology report*, *2*(3), 169-177.
- Dembiński, A., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Dembiński, M., Cieszkowski, J., Gosiewski, T., ... & Konturek, P. C. (2016). Synergic interaction of rifaximin and mutaflor (*Escherichia coli* Nissle 1917) in the treatment of acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology research and practice*, 2016.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, *118*(2), 503-508.
- Dogan, Z., Ergul, B., Sarikaya, M., Filik, L. E. V. E. N. T., Gonultas, M. A., Hucumenoglu, S., & Can, M. (2014). The antioxidant effect of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* in rat colitis model induced by acetic acid. *Bratislavske lekarske listy*, *115*(7), 411-415.
- EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Degen, G., Engel, K. H., ... & Vianello, G. (2022). Re-evaluation of neohesperidine dihydrochalcone (E 959) as a food additive. *EFSA Journal*, *20*(11), e07595.
- Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2014, November). Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 89, No. 11, pp. 1553-1563). Elsevier.
- Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S., & Sticht, H. (2002). The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in immunology*, *23*(2), 89-96.
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umapathy, C., ... & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-month*, *65*(12), 100851.

- Garside, P. (1999). Cytokines in experimental colitis. *Clinical and experimental immunology*, 118(3), 337.
- Guo, K., Ren, J., Gu, G., Wang, G., Gong, W., Wu, X., ... & Li, J. (2019). Hesperidin Protects Against Intestinal Inflammation by Restoring Intestinal Barrier Function and Up-Regulating Treg Cells. *Molecular nutrition & food research*, 63(11), 1800975.
- Haep, L., Britzen-Laurent, N., Weber, T. G., Naschberger, E., Schaefer, A., Kremmer, E., ... & Stürzl, M. (2015). Interferon gamma counteracts the angiogenic switch and induces vascular permeability in dextran sulfate sodium colitis in mice. *Inflammatory bowel diseases*, 21(10), 2360-2371.
- Hallagan, J. B., Hall, R. L., & Drake, J. (2020). The GRAS provision-the FEMA GRAS program and the safety and regulation of flavors in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111236.
- Hameed, K. S., Banumathi, A., & Ulaganathan, G. (2015). Performance evaluation of maximal separation techniques in immunohistochemical scoring of tissue images. *Micron*, 79, 29-35.
- Han, G. E., & Lee, J. H. (2018). The Anti-adipogenic Effects of Neohesperidin Dihydrochalcone Derivatives on Human Adipose-Derived Stem Cells. *The FASEB Journal*, 32, 656-11.
- Hanauer, S. B. (2004). Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 1(1), 26-31.
- Hart, A. R. (2009). Linoleic Acid, a Dietary N-6 Polyunsaturated Fatty Acid, and the Aetiology of Ulcerative Colitis-A European Prospective Cohort Study. *Gut*.
- Hu, L., Li, L., Xu, D., Xia, X., Pi, R., Xu, D., ... & Song, Y. (2014). Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in vivo and in vitro. *Chemico-biological interactions*, 213, 51-59.
- Iseri, S. O., Ersoy, Y., Ercan, F., Yuksel, M., Atukeren, P., Gumustas, K., & Alican, I. (2009). The effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(6), 1142-1148.
- Joseph, D., Feuerstein, M., Alan, C., Moss, M., Francis, A., & Farraye, M. M. (2019). Ulcerative colitis. Thematic Review Series on Gastroenterological Diseases. In *Mayo Clin. Proc* (Vol. 7, pp. 1357-1373).

- Karoui, S., Laz, S., Serghini, M., Bibani, N., Boubaker, J., & Filali, A. (2011). Correlation of C-reactive protein with clinical and endoscopic activity in patients with ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, *56*, 1801-1805.
- Keshтели, A. H., Madsen, K. L., & Dieleman, L. A. (2019). Diet in the pathogenesis and management of ulcerative colitis; a review of randomized controlled dietary interventions. *Nutrients*, *11*(7), 1498.
- Klement, E., Cohen, R. V., Boxman, J., Joseph, A., & Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, *80*(5), 1342-1352.
- Lemmens, B., Arijs, I., Van Assche, G., Sagaert, X., Geboes, K., Ferrante, M., ... & De Hertogh, G. (2013). Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, *19*(6), 1194-1201.
- Lewis, J. D., Chuai, S., Nessel, L., Lichtenstein, G. R., Aberra, F. N., & Ellenberg, J. H. (2008). Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, *14*(12), 1660-1666.
- Liu, D., Yu, X., Sun, H., Zhang, W., Liu, G., & Zhu, L. (2020). Flos Ionicerae flavonoids attenuate experimental ulcerative colitis in rats via suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *393*, 2481-2494.
- López-Serrano, P., Pérez-Calle, J. L., Pérez-Fernández, M. T., Fernández-Font, J. M., Boixeda de Miguel, D., & Fernández-Rodríguez, C. M. (2010). Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *45*(12), 1464-1471.
- Maaser, C., Petersen, F., Helwig, U., Fischer, I., Roessler, A., Rath, S., ... & Kucharzik, T. (2020). Intestinal ultrasound for monitoring therapeutic response in patients with ulcerative colitis: results from the TRUST&UC study. *Gut*, *69*(9), 1629-1636.
- Mallick, B., & Malik, S. (2022). Use of Azathioprine in Ulcerative Colitis: A Comprehensive Review. *Cureus*, *14*(5).
- Mosli, M. H., Zou, G., Garg, S. K., Feagan, S. G., MacDonald, J. K., Chande, N., ... & Feagan, B. G. (2015). C-reactive protein, fecal calprotectin, and stool lactoferrin for detection of endoscopic activity in symptomatic inflammatory bowel disease patients: a systematic

review and meta-analysis. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 110(6), 802-819.

- Nguyen, L. H., Örtqvist, A. K., Cao, Y., Simon, T. G., Roelstraete, B., Song, M., ... & Ludvigsson, J. F. (2020). Antibiotic use and the development of inflammatory bowel disease: a national case-control study in Sweden. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 5(11), 986-995.
- Okayasu, M., Ogata, H., & Yoshiyama, Y. (2019). Use of corticosteroids for remission induction therapy in patients with new-onset ulcerative colitis in real-world settings. *Journal of Market Access & Health Policy*, 7(1), 1565889.
- Osman, A. T., Sharkawi, S. M., Hassan, M. I., Abo-Youssef, A. M., & Hemeida, R. A. (2021). Empagliflozin and neohesperidin protect against methotrexate-induced renal toxicity via suppression of oxidative stress and inflammation in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 155, 112406.
- Ott, C., & Schölmerich, J. (2013). Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 10(10), 585-595.
- Owczarek, D., Rodacki, T., Domagała-Rodacka, R., Cibor, D., & Mach, T. (2016). Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 22(3), 895.
- Park, S., Chun, J., Han, K. D., Soh, H., Kang, E. A., Lee, H. J., ... & Kim, J. S. (2019). Dose-response relationship between cigarette smoking and risk of ulcerative colitis: a nationwide population-based study. *Journal of gastroenterology*, 54, 881-890.
- Polat, F. R., & Karaboğa, İ. (2019). Immunohistochemical examination of anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of hesperetin on trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(3), 151-158.
- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019, January). Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 1, pp. 155-165). Elsevier.
- Rubin, D. T., Ananthakrishnan, A. N., Siegel, C. A., Sauer, B. G., & Long, M. D. (2019). ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 114(3), 384-413.
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 3(7), 390-407.

- Schoepfer, A. M., Beglinger, C., Straumann, A., Safroneeva, E., Romero, Y., Armstrong, D., ... & Vavricka, S. R. (2013). Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the Lichtiger Index, C-reactive protein, platelets, hemoglobin, and blood leukocytes. *Inflammatory bowel diseases*, *19*(2), 332-341.
- Shafik, N. M., Gaber, R. A., Mohamed, D. A., & Ebeid, A. M. (2019). Hesperidin modulates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rats: Targeting sphingosine kinase-1-sphingosine 1 phosphate signaling pathway, mitochondrial biogenesis, inflammation, and apoptosis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *33*(6), e22312.
- Shahid, M., Raish, M., Ahmad, A., Bin Jordan, Y. A., Ansari, M. A., Ahad, A., ... & Al-Jenoobi, F. I. (2022). Sinapic acid ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats by suppressing inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *Molecules*, *27*(13), 4139.
- Shi, Q., Song, X., Fu, J., Su, C., Xia, X., Song, E., & Song, Y. (2015). Artificial sweetener neohesperidin dihydrochalcone showed antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptosis effects against paraquat-induced liver injury in mice. *International Immunopharmacology*, *29*(2), 722-729.
- Shin, M. R., Kim, K. J., Kim, S. H., Kim, S. J., Seo, B. I., An, H. J., & Roh, S. S. (2017). Comparative evaluation between sulfasalazine alone and in combination with herbal medicine on DSS-induced ulcerative colitis mice. *BioMed Research International*, *2017*.
- Spinelli, A., Bonovas, S., Burisch, J., Kucharzik, T., Adamina, M., Annese, V., ... & Panis, Y. (2022). ECCO guidelines on therapeutics in ulcerative colitis: surgical treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*, *16*(2), 179-189.
- Suarez, J., Herrera, M. D., & Marhuenda, E. (1996). Hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone on different experimental models of induced gastric ulcer. *Phytotherapy Research*, *10*(7), 616-618.
- Tehrani, H. S., & , A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *140*, 5-12.
- Travis, S. P., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M. T., Altman, D. G., Colombel, J. F., ... & Sandborn, W. J. (2012). Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*, *61*(4), 535-542.

- Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet*, 1756–70.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2), 120-139.
- Vardeh, D., Wang, D., Costigan, M., Lazarus, M., Saper, C. B., Woolf, C. J., ... & Samad, T. A. (2009). COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(2), 287-294.
- Viennois, E., Chen, F., & Merlin, D. (2013). NF-κB pathway in colitis-associated cancers. *Translational gastrointestinal cancer*, 2(1), 21.
- Wang, D., Zhang, Y., Yang, S., Zhao, D., & Wang, M. (2019). A polysaccharide from cultured mycelium of *Herichium erinaceus* relieves ulcerative colitis by counteracting oxidative stress and improving mitochondrial function. *International journal of biological macromolecules*, 125, 572-579.
- Wang, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Ma, W., Ning, K., Xiang, J. Y., ... & Xiang, H. (2020). Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(1), 335-349.
- Wilks, S. (1859). Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *Med Times Gazette*, 2(2), 264-265.
- Wojcik-Grzybek, D., Hubalewska-Mazgaj, M., Surmiak, M., Sliwowski, Z., Dobrut, A., Młodzinska, A., ... & Brzozowski, T. (2022). The Combination of Intestinal Alkaline Phosphatase Treatment with Moderate Physical Activity Alleviates the Severity of Experimental Colitis in Obese Mice via Modulation of Gut Microbiota, Attenuation of Proinflammatory Cytokines, Oxidative Stress Biomarkers and DNA Oxidative Damage in Colonic Mucosa. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 2964.
- Xu, L., Yang, Z. L., Li, P., & Zhou, Y. Q. (2009). Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Phytomedicine*, 16(10), 989-995.

- Ya Sklyarov, A., Panasyuk, N. B., & Fomenko, I. S. (2011). Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(1), 65.
- Yamamoto, T., Shiraki, M., Bamba, T., Umegae, S., & Matsumoto, K. (2014). Fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis during maintenance therapy. *International journal of colorectal disease*, 29, 485-491.
- Zhang, F. X., Cui, S. S., Li, M., Tan, X., Qiu, Z. C., & Li, R. M. (2021). Dissection of the potential pharmacological function of neohesperidin dihydrochalcone—a food additive—by in vivo substances profiling and network pharmacology. *Food & Function*, 12(10), 4325-4336.
- Zhang, J., Chen, X., Mu, X., Hu, M., Wang, J., Huang, X., & Nie, S. (2021). Protective effects of flavonoids isolated from *Agrocybe aegirita* on dextran sodium sulfate-induced colitis. *eFood*, 2(6), 288-295.
- Zheng, H., Chen, M., Li, Y., Wang, Y., Wei, L., Liao, Z., ... & Xie, Z. (2017). Modulation of gut microbiome composition and function in experimental colitis treated with sulfasalazine. *Frontiers in microbiology*, 8, 1703.