



T.C.

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SODYUM BENZOATIN KOLON EPİTELYAL BARIYER
KOMPONENTLERİNİN EKSPRESYONUNA VE TRANSEPİTELYAL
ELEKTRİK REZİSTANSA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özge YILMAZ

MANİSA-2023



T.C.

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SODYUM BENZOATIN KOLON EPİTELYAL BARIYER
KOMPONENTLERİNİN EKSPRESYONUNA VE TRANSEPİTELYAL
ELEKTRİK REZİSTANSA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özge YILMAZ

MANİSA-2023

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Osman ÇAKMAK



TEŞEKKÜR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlığı eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmamda bana geniş imkânlar sağlayan, tez yazım sürecimde bana yol gösteren ve kıymetli fikirlerini esirgemeyen Prof. Dr. Özge Yılmaz ve Prof. Dr. Hasan Yüksel'e,

Uzmanlık eğitimimin sürecinde bana değerli bilgi ve tecrübelerini aktaran, görüşlerine başvurmam gerektiğinde bana vakit ayıran tüm değerli hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Elgin Türköz Uluer ve Arş. Gör. Muhammed Yusuf Pekmezci'ye

Çalışmamızın temelini oluşturan Caco-2 hücre serisinin teminini sağlayan Prof. Dr. Cansın Saçkesen'e

Yardıma ihtiyacım olduğunda desteğini bulabildiğim, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm değerli asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Beni yetiştiren, hayatım boyunca bana yol gösteren, sevgilerini ve desteklerini daima hissettiğim aileme,

Asistanlık sürecimde desteğini hiç esirgemeyen üzerimde büyük emeği olan sevgili eşim Büşra Çakmak'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu proje Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022/085 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER.....	VII
TABLolar.....	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	X
I.GENEL BİLGİLER	1
1.1. İntestinal Bariyer	1
1.1.1. Hücre dışı elemanlar	2
1.1.2. Hücresel elemanlar	3
1.2. İntestinal Epitel.....	4
1.2.1. İntestinal epitelin işlevleri	5
1.2.2. Tight junctions (Sıkı bağlantılar)	6
1.2.2.1. Okludin	7
1.2.2.2. Klaudin.....	8
1.2.2.3. Junctional Adezyon Molekülü (JAM).....	8
1.2.2.4. Trisellulin	8
1.2.2.5. Zonula Okludens	9
1.2.3. Adherens Junctions (AJ).....	9
1.2.3.1. Cadherinler	9
1.3. İntestinal Geçirgenlik.....	10

1.3.1. İntestinal geçirgenlik ve ilişkili hastalıklar	11
1.3.1.1. İnflamatuar barsak hastalığı (İBH)	12
1.3.1.2. Ankilozan Spondilit (AS)	12
1.3.1.3. Sistemik lupus eritematozus (SLE)	12
1.3.1.4. Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM)	13
1.3.1.5. Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) ve Obezite	13
1.4. Sodyum Benzoat.....	13
1.4.1. Sodyum benzoat farmakokinetiği	14
1.4.2. Sodyum benzoat kullanımı ile ilişkili patolojiler	14
II. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
2.1. Hücre Kültürü	17
2.2.1. Caco-2 hücre serisi	17
2.2. Sodyum Benzoatın Uygulanması	17
2.3. Western Blot Uygulaması.....	17
2.3.1 Protein İzolasyonu ve Kantifikasyonu	17
2.3.2. Tamponların Hazırlanması.....	20
2.3.3. Jel Hazırlama ve Elektroforez	22
2.3.4. Membrana Transfer ve Blotlama.....	24
2.4. TEER Ölçümü	26
2.5. İstatistiksel Analiz.....	27
III. BULGULAR	28
3.1. Western Blot Uygulaması.....	28

3.2. Kantifikasyon.....	29
3.3. Gruplar arasında TEER Ölçümlerinin Karşılaştırılması	29
IV. TARTIŞMA	34
V. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
VI. ÖZET	38
VII. ABSTRACT	40
VII. KAYNAKLAR	42



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İntestinal epitel	5
Şekil 1.2. İntestinal bariyer – hücreler arası bağlantıların organizasyonu.....	7
Şekil 2.1. Ponceau S boyasıyla boyanan membranlardaki total protein bantları.....	25
Şekil 2.2. EVOM2 cihazı ile TEER ölçümü	27
Şekil 3.1. GAPDH	28
Şekil 3.2. E-Cadherin	28
Şekil 3.3. N-Cadherin.....	29
Şekil 3.4. α -SMA.....	29

TABLULAR

Tablo 2.1. Blank optik yoğunluk değerleri.....	18
Tablo 2.2. OD değerlerine göre hesaplanmış sodyum benzoat konsantrasyonları	19
Tablo 2.3. Ana Jel Tamponu	20
Tablo 2.4. Stacking Jel Tamponu	20
Tablo 2.5. Running Tamponu	21
Tablo 2.6. Transfer Tamponu	21
Tablo 2.7. Tris Tamponlu Salin (TBS)	22
Tablo 2.8. TBST	22
Tablo 2.9. Ponceau Boyası	22
Tablo 2.10. Separating Jel	23
Tablo 2.11. Stacking Jel.....	24
Tablo 2.12. Antikor seyreltme oranları.....	26
Tablo 3.1. Kontrol grubu, 1/1.000 ve 1/10.000 konsantrasyonda Na Benzoat uygulanan gruplarda 0. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması.....	30
Tablo 3.2. Kontrol grubu, 1/1.000 ve 1/10.000 konsantrasyonda Na Benzoat uygulanan gruplarda 24. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması.....	30
Tablo 3.3. Tüm çalışma gruplarında 0. ve 24. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması.....	31

Tablo 3.4. Gruplar arasında E-cadherin ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması 32

Tablo 3.5. Gruplar arasında N-cadherin ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması 32

Tablo 3.6. Gruplar arasında α -SMA ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması 33



KISALTMALAR VE SİMGELER

AJ	: Adherens Junctions
APS	: Ammonium Persulfate
AS	: Ankilozan Spondilit
BCA	: Bicinchoninic Acid
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
DM	: Diyabetes Mellitus
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	: Food and Drug Administration
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GIS	: Gastrointestinal Sistem
GRAS	: Generally Recognised as Safe
IFN-γ	: İnterferon Gama
Ig	: İmmunoglobulin
IL	: İnterlökin
İBH	: İnflamatuar Barsak Hastalığı
JAM	: Junctional Adezyon Molekülü
kDa	: Kilodalton
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
RPIM	: Roswell Park Memorial Institute

SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
TBS	: Tris Buffered Saline
TBST	: Tris Buffered Saline with Tween 20
TEER	: Transepithelial Electrical Resistance
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktör Beta
TJ	: Tight Junctions (Sıkı Bağlantılar)
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
ZO	: Zonula Okludens

I.GENEL BİLGİLER

1.1. İntestinal Bariyer

Deri, solunum sistemi ve gastrointestinal sistem gibi epitelyal organlar, vücudun dış çevreyle etkileşime giren büyük bir bölümünü oluşturur. Söz konusu organlar içinde gastrointestinal sistem, ortalama 32 m²lik alanıyla önemli bir emilim ve savunma yüzeyi sağlar. Bu toplam alanın 2 m²'si kolon epitelyal yüzey alanından oluşmaktadır [1]. Bağırsak içeriğinin taşıdığı çeşitli biyolojik ve kimyasal etkenler aracılığıyla gelişebilecek inflamasyondan, epitelyal bariyer bütünlüğünü sürdürerek organizmaya koruma sağlamaktadır. Mukoza boyunca alımı kontrol etme ve lümenin zararlı maddelerin zarar görmesini önleme yeteneği, intestinal bariyer fonksiyonu olarak tanımlanır [2].

İntestinal bariyer, mukozal yüzey aracılı savunma mekanizması ve epitelyal hücrelerini birbirine bağlayan bağlantı kompleksleri tarafından korunur. Sindirim ve pasaj işleminin gerçekleştiği intestinal lümen sayesinde; mide asidi, pankreas ve safra salgıları ile bakteri ve antijenler parçalanarak patojen yükü azaltılır. Lümen içeriğindeki mikroflorayı oluşturan, intestinal alanda kolonize hücreler sayesinde diğer patojenlerin aşırı üremesinin önüne geçilir [3].

Mevcut fizyolojik savunma mekanizmaları sayesinde sağlıklı bir proksimal GİS'e dahil olan duodenum, jejunum ve proksimal ileumda mikrobiyal yoğunluk düşük derecede tutulur [4]. Buna karşılık, distal ileum ve kolonda, 400 farklı anaerobik ve aerobik bakteri türünden oluşan büyük bir bakteri mikrobiyotası bulunmaktadır. Distal alandaki bu bakteri sayısı 10¹⁴ gibi yüksek rakamlar ile ifade edilmektedir [5].

1.1.1. Hücre dışı elemanlar

Bağırsak epitelini örten ve esas olarak Goblet hücreleri tarafından salgılanan mukus, su ve yaklaşık 100 mikron kalınlığında bir glikokaliks tabakası ile birlikte “*mikro iklim*” olarak adlandırılır.

Bu alanın dış tabakası mukus ve su içeriğinden oluşan “*stirred mucus layer*”, antibakteriyel peptitten zengin mukusun tutulmasına katkıda bulunur ve mukozal yapışmayı ve mikroorganizmalar tarafından transepitelyal geçişi önler [6]. Bu katmanda lamina propriadaki plazma hücreleri tarafından üretilen sekretuar IgA yer alır [7]. Ayrıca, Paneth hücreleri tarafından sekrete edilen fosfolipitler, negatif yüklü mukopolisakkaritler, ribonükleazlar, defensinler, cathelicidinler ve antimikrobiyal peptitler mukozal defans elemanları olarak görev yapar [6]. Antimikrobiyal peptitler, bakteriyel membran hasarını takiben lizisi indükler [8]. Cryptidin 2 ve 3 peptitleri, intestinal kanala su salgısını artırarak epitel yüzeyinde fiziksel bir klirens sağlayarak mikroorganizmaların uzaklaştırılmasına yardımcı olurlar. [9]. Defensinler, ek olarak mikrobiyotanın modülasyonu ve bu sayede adaptif bağışıklıkta rol oynar [10]

Mukus ve su içerikli tabakanın altında ise daha yoğun ve “*non-stirred mucus layer*” olarak adlandırılan glikokaliks tabaka epitel dokuya yapışık olarak karşımıza çıkar. Glikokaliks tabaka aracılığı ile besin ürünlerinin absorpsiyonu sağlanır. Epitel dokunun sıvı kaybının önüne geçilir. İntestinal içerik ve sindirim enzimleri ile meydana gelen fiziksel ve kimyasal hasara karşı koruma sağlanır [11]. Glikokaliks tabaka ayrıca enteral besinlerin antijenik etkilerine karşı koruma sağlar. Epitel yenilenmesi ve farklılaşmasında rol alır [12].

Enterositler tarafından bağırsak lümenine salgılanan su ve klor aracılığı ile bağırsak içeriği üzerinde seyreltici bir etki sağlanır. Bu sayede bakteri kolonizasyonu bloke edilir ve epitel bariyere bakteri invazyonun önüne geçilir [13]. Sekresyon özelliği ile işlev gören intestinal peristaltizm sayesinde lümen

içeriğinin pasajı gerçekleştirilir. Bu sayede olası patolojik ve toksik etkenlerin yüzey ile temas ettiği süre azaltılır.

1.1.2. Hücresel elemanlar

İntestinal mikrobiyota, epitelyal bariyer metabolizmasında, proliferasyonunda ve bariyerin sürdürülmesinde önemli bir rol alır. Lümen içeriğindeki besinler ile enerji kaynağı bulan mikrobiyota içindeki farklı bakterilerin rekabeti sayesinde intestinal pH belirli bir düzeyde tutulur. Türler arası etkileşim sonucunda bakteriyel yük belirli bir düzeyde tutulur ve faydalı bakterilerin miktarı optimize edilerek patojen olanların kolonizasyonu kısıtlanır [14].

Mikrobiyota diyet içeriğindeki elementleri metabolize ederek biyoaktif ürünlere dönüştürür. Normalde organizma tarafından metabolize edilemeyen selüloz, hemiselüloz, pektin, oligosakkaritler ve sindirime dirençli nişasta gibi karbonhidrat türevlerini asetik, propiyonik ve bütirik asitler gibi kısa zincirli yağ asitlerine metabolize eder [15]. Biotin, tiamin, kobalamin, niasin ve pantotenik asit sentezinde ayrıca vitamin B ve K sentezinde önemli rol oynayarak organizmaya faydalı etkiler sağlar [16]. Bunlara ek olarak mikrobiyotanın santral sinir sistemi ve enterik sinir sistemine etki edebilen kimyasallar üretme kapasitesi mevcuttur [17].

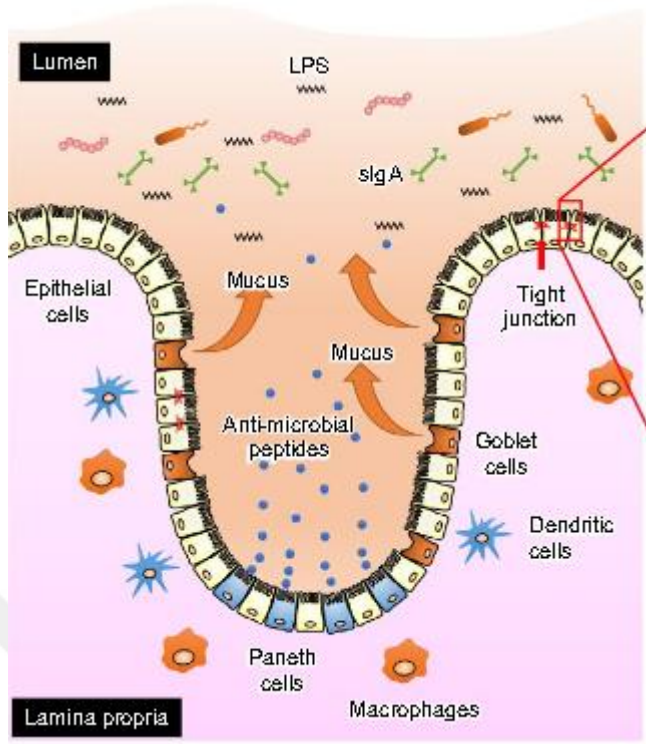
İntestinal Epitel tek bir katmandan meydana gelen her 3 ile 5 gün arasında döngüsünü tamamlayarak yenilenen hücrelerden oluşmaktadır. Epitel döngüsünü sağlayan pluripotent kök hücreler, Lieberkühn kriptlerinden kaynaklanır ve buradan farklılaşmaya başlayarak apikal uca yerleştiklerinde dönüşümlerini tamamlar [18]. Toplamda 5 hücre tipinden oluşur. Enterositler, endokrin hücreler, M hücreleri, G hücreleri ve Paneth hücrelerinden oluşan epitel tabakası 20 mm kalınlığında tek sıra halinde dizilir. Tek katlı epitel dokunun %80'i enterositler tarafından oluşturulur. Lümen içeriğinin dokulara geçişini önleyen ana fiziksel bariyeri zonula adherens ve zonula okludens adlı

bağlantılar ile sağlarlar. Her iki bağlantı tipi de farklı yüzdelerde cadherin, claudin ve zonulin proteinlerinden meydana gelir [19].

1.2. İntestinal Epitel

Bağırsak epiteli ince ve kalın bağırsak arasında hücresel kompozisyon ve yapı bakımından büyük ölçüde farklılık gösteren bir tek sıralı hücre tabakasıdır. İnce bağırsakta epitel yapı villus adı verilen ve organ yüzeyinde çıkıntı yapan yapıların üzerine uzanır. Bu sayede mukozal yüzey alanı artırılır. Kolonda ise söz konusu villuslar izlenmez. Bu farklılaşma sayesinde kolon duvarında nispeten düz bir yapı elde edilerek yarı katı dışkının pasajının neden olabileceği potansiyel hasarı sınırlayan bir mukozal yüzey meydana gelir. Epitel doku tek katlı olsa da düz bir hat şeklinde izlenmez, bunun yerine Lieberkühn kripleri olarak adlandırılan dallanmış girintiler içerir [20]. Kriplerin bazal kısmında bulunan intestinal kök hücrelerden köken alan transient proliferatif hücreler, uç kısma doğru son halleri olan intestinal epitel hücrelerine diferansiye olur. Ömrünü tamamlayan hücreler ise apoptoza uğrayarak kript yapısının tepe kısmından dökülür [21].

Barsak epiteli farklı hücre tiplerinden oluşmuştur ve her biri özelleşmiş fonksiyonel niteliklere sahiptir. Hücre tiplerinin dağılımı ince ve kalın bağırsak arasında farklılık gösterir. Genel olarak kolonda bulunan hücreler ince bağırsakta da mevcuttur. Enterositler, enteroendokrin hücreler, goblet hücreleri ve tuft hücreleri her ikisinde de bulunurken Paneth hücreleri ve M hücreleri ince bağırsakta izlenmektedir.



Şekil 1.1. İntestinal epitel

1.2.1. İntestinal epitelin işlevleri

İntestinal hücreler ve aralarında oluşan bağlantılar aracılığı ile bariyer, emilim ve endokrin sinyalizasyon olarak 3 ana grupta tanımlanabilir.

İlk işlev epitel hücrelerin primer olarak sağladığı absorpsiyondur. İntestinal epitel hücrelerin apikal membranında bulunan taşıyıcılar sayesinde glukoz, peptit, aminoasit, vitamin ve minerallerin hücre içine ve oradan organizmaya transportu gerçekleştirilir. Hücreler arasında bulunan boşluklar aracılığıyla ise sıkı bağlantıların geçirgenliği ile düzenlenen paraselüler transport sağlanır.

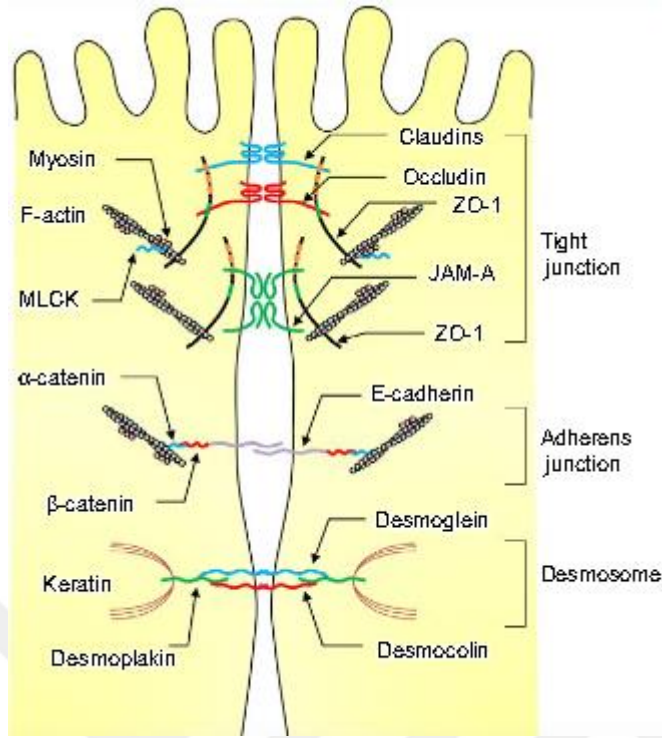
İkinci işlev bariyer özelliğın sağlanması ve sürdürülmesidir. Bariyer işlevi hücreler arası bağlantıyı tesis eden sıkı bağlantılar ile sağlanır. Bu sayede suda çözünen küçük boyutlu maddelerin geçişine olanak sağlanırken patojen mikroorganizmalar ve alerjen maddelerin geçişi engellenir.

Üçüncü işlev ise enteroendokrin hücreler aracılığı ile lümendeki besinlerin tanınması, barsak segmentine uygun olarak salgılanacak enzim ve hormonların üretilmesidir.

1.2.2. Tight junctions (Sıkı bağlantılar)

Epitelyal hücreler tight junction (TJ) adı verilen protein yapıları bağlantılar sayesinde birbirine bağlanır ve bu sayede dış ortamdaki maddelerin iç dokulara geçişini engelleyen bir “mühür” elde edilir. Paraselüler alandaki boşluğu kapatan, hücreler polariteyi koruyan TJ'lar sayesinde hücreler arasındaki bütünlük ve sızdırmazlık sağlanarak epitel bütünlüğü idame ettirilir [22]. Sıkı bağlantılar kolondaki sıralı epitel hücrelerinin apikolateral membran yüzeylerinde yer alır. 5 ila 7 membran füzyon bölgesinde kurulan bağlantılar “*kissing points*” olarak isimlendirilir [23]. TJ'lar sıvıların ve iyonların akışını regüle eder ve hücre polaritesinin idamesinde rol alır [24].

Bugüne kadar TJ yapısını oluşturan 4 adet integral transmembran protein tanımlanmıştır. Bunlar ‘okludin’, ‘kludin’, ‘junctional adezyon molekülü (JAM)’ ve ‘tricelulin’ dir [25–28]. Ağırlıklı olarak epitelyal ve endotelial hücrelerde bulunmakla birlikte nöronlar, makrofajlar, dentritik hücreler ve lökositlerde de eksprese edildiği bilinmektedir [29, 30].



Şekil 1.2. İntestinal bariyer – hücreler arası bağlantıların organizasyonu

1.2.2.1. Okludin

İlk olarak 1993 yılında kanatlı hayvan dokularında izole edilmiş ve sonrasında fare epitel ve endotelinde gösterilmiştir. Tespit edilen ilk integral membran TJ proteinidir [25]. Keşfinden sonra yapılan araştırmalar ile proteinin memeli türleri arasında %90'a varan oranda benzerlik taşıdığı ve TJ stabilitesinde önemli rol aldığı gösterilmiştir [31, 32].

Okludinin uygun ve doğru bir TJ oluşumu ve fonksiyonunun idamesindeki önemi birçok çalışma ile doğrulanmıştır. Örneğin okludin üretme yeteneği genetik olarak engellenen farelerde TJ'lar morfolojik olarak sağlam olarak görünmelerine rağmen TJ bütünlüğünün hızlı bozulduğu ve çeşitli epitelyal dokularda kronik inflamasyon bulguları geliştiği izlenmiştir [33]. Aynı şekilde okludinin down-regülasyonu ile endotelial permeabilite artışı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar mevcuttur [34].

1.2.2.2. Klaudin

Klaudinler 20-27 kDa boyutunda okludinler ile sekans benzerliği barındırmayan membran proteinleridir [26]. Bir intraselüler ve iki ekstraselüler parçadan oluşur. Ekstraselüler parçalar ile komşu hücreler ile bağlantı sağlarlar. Klaudin tipine göre bariyer veya belirli moleküllerin geçişini sağlayan porlar oluşturular [35].

Klaudinler plazma zarı içinde polimerize olur ve karşı hücredeki klaudinler ile dimerik bağlar kurarak iki hücreyi birbirine bağlar. Klaudin ailesi en az 24 üyeden oluşmaktadır. Bilindiđi kadarıyla bağırsaklarda klaudin 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 ve 14 bariyer oluşturan klaudinler, diğer taraftan klaudin 2, 10, 15, 17 ise por oluşturan klaudinler olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir [36].

Klaudin ailesi proteinleri TJ'ların temel bileşenleridir. Paraselüler alandan iyonların geçişini kontrol ederek epitel dokunun iyonik homeostazını sağlar [37]. Örneğin klaudin 2 ve klaudin 15 üretme yeteneği engellenen farelerde ince bağırsak lümenindeki sodyum düzeyinin dengelenemediği raporlanmış. Düşük absorpsiyon, intestinal sıvı kaybı ve son olarak erken ölüm ile giden bir klinik raporlanmışır [38].

1.2.2.3. Junctional Adezyon Molekülü (JAM)

JAM epitelyal ve endotelyal hücreler tarafından üretilen immunglobulin (Ig) alt ailesidir. İntestinal permeabilite ve inflamasyonda görev alırlar [39].

1.2.2.4. Trisellulin

Epitel hücreleri sadece 2 hücre arasında bağlantı kurmaz. Trisellulin interselüler bileşkelerde, 3 komşu hücreyi birleştirerek bariyer oluşumunu ve stabilitesini sağlar. Kurulan bu bağlantı ile makromoleküllerin geçişine engel olunur ancak iyon geçirgenliği korunur [40].

1.2.2.5. Zonula Okludens

ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 olarak řu ana kadar belirlenen 3 adet protein mevcuttur. Bu proteinler TJ'a özgün olarak saptanan ilk proteinlerdir. Transmembran TJ proteinleri olan klaudin, okludin ve JAM, ZO proteinleri aracılığı ile sitoskeletal aktomyozin liflere bağlanır.

ZO proteinleri hücresele geçirgenlik, adhezyon, TJ oluşumu ve stabilizasyonunda temel bir rol üstlenir [41].

1.2.3. Adherens Junctions (AJ)

TJ'lar paraselüler iyon ve solüt madde transportunun ana düzenleyicisi olarak görev yaparken AJ'ların ana görevi iki hücre arasındaki adezyonun sağlanmasıdır. TJ'lar apikolateral alanda yerleşirken AJ'lar bu yapıların altında bazolateral yüzeyde yerleşim göstermektedir.

AJ'lar bitişik hücreler arası bağlantıyı sağlar. AJ'ların ana komponenti olan E-cadherin, tip 1 cadherin transmembran glikoproteinidir. Hücreler arası bağlantıyı oluşturan ekstraselüler ve aktin iskelet ile bağlantıyı sağlayan sitoplazmik iki parçadan oluşur.

Mikrotübül ađ ve aktin hücre iskeleti ile arayüz oluşturan p120 catenin, b-catenin ve a-catenin aracılığı ile sitoplazmik parçanın yapılandırılması ve stabilizasyonu sağlanır [42].

1.2.3.1. Cadherinler

Cadherinler, hücreler arasında sıkı bağlantıların oluşmasını sağlayan bir grup glikoprotein proteindir. Cadherinler, hücrelerin tutunmasına yardımcı olan desmosom ve adherens bağlantılarında önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, hücrelerin göç etmesi, şekil değiştirmesi ve organların gelişimi sırasında da önemlidirler. Cadherinlerin işlevleri, hücreler arasındaki bağlantıları güçlendirerek dokuların sağlamlılığını ve yapısal bütünlüğünü korumaya yardımcı olur.

E-Cadherin AJ'ı oluşturan ana transmembran proteindir. Diğer hücredeki eşleniği ile birleşerek hücreler arası teması sağlar. Ekstraselüler cadherin bölgeleri kalsiyum iyonları varlığında homofilik adezyon olarak adlandırılan duruma erişip birbirleriyle stabil temaslar oluşturur.

Epitel dokuda eksprese olan E-cadherine karşılık mezenkimal dokularda N-cadherin adherens junction komponenti olarak karşımıza çıkar. N-cadherin (Neural cadherin), implantasyon sonrası embriyoda yaygın olarak eksprese edilir ve yetişkinlik boyunca sürekli ekspresyon ile mezoderimde yüksek seviyelerde gözlenir. İlk olarak nöronlarda fonksiyonu tanımlanan bu proteinin sonrada kalp kası ve kanser metastazında da rol oynadığı saptanmıştır [43, 44].

1.3. İntestinal Geçirgenlik

İntestinal bariyer sabit bir yapı değildir. Çeşitli fizyolojik, ilaç ve hastalık aracılı uyarılara cevap olarak düzenlenen dinamik bir oluşumdur. Geçirgenlik özellikleri moleküllerin yapısal özellikleri, boyutu ve yüküne göre şekillenmektedir.

Barsak epitelinden besinlerin, su ve iyonların geçişi barsak lümeni ile mukoza arasında gerçekleşen aktif ve pasif süreçler sonunda sağlanır. Aktif süreçlerin ana elemanı olan enterositler iyon kanalları, taşıyıcı moleküller ve pompalar aracılığı ile sekresyon ve absorpsiyon dengesini düzenleyerek homeostazı sağlarlar. Bu süreçler paraselüler ve transselüler yolaklar aracılığı ile sağlanır.

Paraselüler yolak, tight junctionlar ile bağlı olan hücreler arasında oluşan çeşitli boyuttaki porlar aracılığı ile gerçekleşen akımı ifade eder. Bu yol moleküllerin pasif olarak gerçekleşen transepitelyal akımının %85'inden sorumludur. Paraselüler yolak intestinal geçirgenliğin belirleyicisi ve lümendeki antijenlere karşı efektif bir bariyer olarak görev alır [45].

Transselüler yolak ise moleküllerin enterosit membranı boyunca transportunu sağlar. Küçük hidrofilik ve lipofilik moleküller enterosit zarının lipit çift tabakası da pasif difüzyon yolu ile taşınır. Buna karşın iyonlar, aminoasitler ve spesifik antijenler ise aktif taşıma mekanizmaları olan endositoz, transsitoz ve ekzositoz aracılığı ile lümeden organizmaya taşınır. Benzer şekilde bakteriyel proteinler ve toksinler gibi büyük moleküller endositoz ve transsitoz mekanizmaları aracılığı ile hücre içine alınır ve immün sistem hücrelerine sunulur [2].

Geçirgenlik derecesi proksimal ve distal bölgelerde, kripler ve villuslar arasında farklılık gösterir ancak epitelden maddelerin geçişini düzenleyen mekanizmalar barsak boyunca benzer özellikler gösterir. Bu değişimler endositoz, hücre içi sinyalizasyon, aktin hücre iskeleti ve hücreler arası etkileşimleri içerir.

Geçirgenlikteki hızlı değişimler hücre iskeleti aracılığı ile miyozin hafif zincir kinaz fosforilasyonu ve TJ protein endositozu işlemleri ile düzenlenir [46]. Uzun vadede değişimler ise TJ protein ekspresyonu, epitel hücre düzenlenmesi ve apoptozu sayesinde gerçekleştirilir [47, 48].

İmmün sistem aracılığı ile salgılanan tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), IL-8, IL-10 intestinal bariyeri TJ üzerinden düzenler. Artmış sitokin düzeyleri intestinal geçirgenliği artırarak etki gösterir [49, 50].

1.3.1. İntestinal geçirgenlik ve ilişkili hastalıklar

Mukozal hasarlanma sonucunda intestinal geçirgenliğin artmasına binaen bakteriler ve bakterilerin ürettiği yan ürünler barsak lümeninden translokasyon ile organizmaya geçmektedir [51]. Bozulmuş intestinal bariyerin intestinal geçirgenlik ve inflamasyonu artırdığı bilinmektedir. Günümüzde "geçirgen barsak sendromu" olarak bu durum çeşitli gastrointestinal ve sistemik hastalık ile ilişkili görülmektedir [52].

1.3.1.1. İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH)

Bu hastalık grubu altında yer alan crohn ve ülseratif kolit, kesin etyolojileri halen bilinmeyen kronik hastalıklar olarak karşımıza çıkmaktadır. immunolojik, genetik, çevresel faktörler, barsak mikrobiyotası ile ilgili değişiklikler patogeneizde yer alan en olası faktörlerdir [53].

İBH'nda görülen intestinal geçirgenlik artışı hastalık seyrinde gelişen inflamatuvar yanıt, disbiyozis ve TJ modifikasyonları sonucunda ortaya çıkmaktadır. TNF- α , Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β), IL-17, IL-22 ve IL-23 İBH patogenezinde intestinal mukozada artmış inflamatuvar yanıtlar oluşturmaktadır [54].

İBH olan olguların barsak mikrobiyotasında invazif Echerichia coli gibi proinflamatuvar bakteriler, Ruminococcus gibi mukolitik bakterilerde artış ve bunun sonucunda izlenen mikrobiyota çeşitliliğinde azalma izlenmektedir [55]. TNF- α ve IL-13 gibi sitokinlerin ise ülseratif kolit patogenezinde intestinal hücre apoptozuna ve TJ komplekslerinin yıkımına neden olduğu gösterilmiştir [56].

1.3.1.2. Ankilozan Spondilit (AS)

Spondiloartrit grubundan bir hastalık olan AS hastalarında bazen İBH'na ilerleyen subklinik intestinal inflamasyon ve sağlıklı kişilere göre artmış mikrobiyota çeşitliliği gösterilmiştir [57, 58].

Patojenik ve patojenik olmayan bakteriyel uyarım sonucunda epitelyal TJ geçirgenliğini düzenleyen zonulin yolağı aktive olmakta ve intestinal geçirgenlik artmaktadır [59, 60].

1.3.1.3. Sistemik lupus eritematozus (SLE)

SLE, cilt, böbrek ve merkezi sinir sisteminde çoklu organ hasarına neden olabilen, otoantikor ve immün komplekslerin oluşumu ile karakterize kronik otoimmün bir hastalıktır [61]. Bu hastalardaki bozulmuş intestinal bariyer fonksiyonu ile geçirgenlik artışı sonucunda gelişen ve "sızdıran barsak" olarak

adlandırılan klinik durum ile patojen, toksin ve bakteriler barsak lümeninden organizmaya transloke olur [62].

1.3.1.4. Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM)

T1DM patogenezi, disbiyozis [63, 64], enterovirüs enfeksiyonları [65] ve intestinal geçirgenlik [66] ile ilişkili görülmektedir.

Yaşamın erken dönemlerinde geçirilen enterovirüs enfeksiyonlarının intestinal bariyer hasarına neden olarak T1DM gelişimi için predispozan faktör olan otoantikor gelişimi ile ilişkili görülmektedir [67, 68].

1.3.1.5. Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) ve Obezite

Kronik hiperglisemi gen transkripsiyonu üzerine direkt etki ile intestinal bariyer fonksiyonundan bozulmaya neden olur [69]. Hiperglisemi sonucunda barsak geçirgenliği artışı ve buna bağlı olarak bakteriyel translokasyon ve metabolik endotoksemi gelişir [70].

Yüksek yağlı diyet sonucunda barsak mikrobiyotasında inflamatuvar ve invazif bakteri artışı olmaktadır [71]. Disbiyozis ve fazlalık yağ dokunun etkisi ile ortaya çıkan inflamasyon intestinal geçirgenlik artışına neden olmakta, inflamatuvar sitokinlerin aşırı salgısı ile metabolik ve immün homeostaz bozulmaktadır [72].

1.4. Sodyum Benzoat

Benzoik asit (E211: sodyum benzoat) gıdalarda koruyucu olarak kullanım alanına sahiptir. Eczacı Michel de Nostredame tarafından 1556'da Tesbih çalısı olarak bilinen *Styrax officinalis* adlı bitkinin reçinesinden elde edilmiştir. 1875 yılında ise Leopold Salkowski tarafından maya ve küflere karşı etkinliği bulunduğundan sonra 1900'lü yılların başından beri endüstriyel gıda koruyucu olarak kullanım alanı bulmuştur.

Sodyum benzoat kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan en eski kimyasal koruyucular arasındadır ve FDA tarafından gıdalarda kullanımına izin

verilen ilk maddedir. Genel olarak meyve ve sebze sularında, gazlı meşrubatlarda, alkollü ve alkolsüz içeceklerde, konservelerde, soslarda; küf, maya, bakteri oluşumunu inhibe etmek için kullanılmaktadır [73].

Koruyucu maddeler sıklık ile kombinasyon olarak gıdalarda kullanılmaktadır. Yapılan bir başka çalışmada ise alkolsüz içecek ve meyve sularında, sodyum benzoat ve askorbik asitin birlikte kullanıldığı kombinasyonların metal gıda ambalajları ile reaksiyonu sonucunda benzen oluşumu gösterilmiştir [74].

FDA tarafından GRAS (Generally recognised as safe) kategorisinde sınıflandırılan sodyum benzoatın ürünlerdeki kullanım üst sınırı %0.1 olarak tanımlanmıştır [75]. Ancak farklı ülkelerde farklı miktarlarda kullanıldığı bilinmektedir [76]. Ülkemizde ise en çok % 0.1 oranında kullanılabilir. [76].

1.4.1. Sodyum benzoat farmakokinetiği

Oral olarak alınan sodyum benzoat sindirim sisteminde hızlı bir şekilde emilmektedir. Oral alımdan sonra 1-2 saat içinde tepe plazma konsantrasyonuna ulaşmakta ve ana olarak karaciğerde metabolize edilmektedir [77, 78]. Karaciğerde amino asit glisine bağlanarak metabolize edilir ve idrardan hippurik asit olarak atılır. Günlük ortalama 400-800 mg civarı glisin, hippurik asit olarak idrarla atılmaktadır [79].

Artmış glisin atılımı, glisinin esas olduğu metabolik süreçlerde karaciğerin işlevinin bozulduğunu gösterir. Düşük glisin seviyeleri, idrar ile atılan kreatinin, glutamin, üre ve ürik asit seviyelerini azaltarak plazma konsantrasyonlarında artışına neden olabilmektedir [79].

Sodyum benzoat içeren gıdalar glisin metabolizma yükünü arttırmakta ve idrarla atılan hippurik asit miktarında artışa neden olmaktadır [80].

1.4.2. Sodyum benzoat kullanımı ile ilişkili patolojiler

Sodyum benzoat güvenli bir madde olarak kabul edilmesine rağmen, kısa süreli maruziyette, ciltte ve solunum yollarında tahrişe neden

olabilmektedir, ancak uzun süreli veya tekrarlanan temas ile yüksek cilt duyarlılığına neden olabilmektedir [81]. Yüksek dozdaki sodyum benzoat uygulanması ise dokularda artmış histamin ve prostaglandin salınımına, ülserlere ve mide mukus salgısında değişimlere neden olmaktadır [82, 83].

Oral veya inhalasyon yolu ile maruziyette ise kronik ürtiker şiddetinde , astım, rinit, dermatit bulgularında artışa neden olduğu bildirilmiştir [84].

Sodyum benzoat ile yapılan fareler üzerindeki bir çalışmada beyindeki glutatyon düzeyini azalttığı ve malondialdehit seviyesini artırdığı saptanmıştır. Çalışmadaki farelerde hafıza ve motor koordinasyonun bozduğu ve nörolojik hasara neden olduğu bildirilmektedir. Çocuklarda hiperaktivite ve dikkat eksikliğinin sodyum benzoat maruziyeti ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir [85].

Wistar albino fareler ile yapılan başka bir toksikoloji çalışmasında ise yüksek dozlarda sodyum benzoata maruz bırakılan farelerde hepatosit hücre membran hasarları, mitokondrial krista kayıpları , karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları saptanmıştır [86].

Hamile fareler ve gestasyon süresinin sonunda yenidoğanları üzerine yapılan başka bir çalışmada ise gebelik süresi boyunca %0.5, %1 ve %1.5 konsantrasyonlarda sodyum benzoata maruz bırakılan farelerin karaciğer dokularında doz bağımlı genotoksik etkilenme gösterilmiş, DNA çift zincir kırıkları saptanmıştır [87].

Yumurtalarının şeffaf olması nedeni ile zebra balığı kullanılarak yapılan bir organogenez deneyi sırasında sodyum benzoat maruziyetinden kaynaklanan bağırsak kusurları, böbrek gelişim anomalileri ve perikardiyal kese ödemi izlenmiştir. Erken embriyogenez döneminde sodyum benzoata maruziyet sonrasında nörotoksisite ve teratojenitenin indüklendiği yönünde bulgular saptanmıştır [88].

Sodyum benzoat ve potasyum benzoatın periferik lenfosit hücrelerine in vitro etkisini inceleyen bir başka çalışmada ise sodyum benzoatın artmış

DNA hasarına neden olduğu, sodyum ve potasyum benzoatın mutajenik ve sitotoksik olduğu yönünde sonuçlar elde edilmiştir [89].



II. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Caco-2 kolon kanser hücreleri 25 cm²lik hücre kültür flaskında, %10 Fetal Buzağı Serumu, %1 L-Glutamin ve % 1 Penisilin- Streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde iç ortamı 37 °C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. İki günde bir besiyerleri değiştirilerek, kültür kabını kaplayınca (konfluent olunca) %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile 37°C ile 5 dakika bırakılarak hücreler alındı. 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra pasajlandı.

2.2.1. Caco-2 hücre serisi

Esas olarak insan kolon karsinomundan türetilen epitelyal hücre hattı Caco-2 (Cancer coli) , bağırsak epitelyal bariyerinin bir modeli olarak geniş çapta kullanılmaktadır. En avantajlı özelliklerinden biri, küçük bağırsağın fırça kenar tabakası gibi birçok özelliği olan bir hücre tabakasına spontan olarak farklılaşabilme yeteneğidir [90]. Bu seri intestinal epitel bariyer işlevinin değerlendirilmesi için kabul edilmiş bir referans modeldir [91].

2.2. Sodyum Benzoatın Uygulanması

Sodyum benzoat (Sigma 71300) 1/1.000 ve 1/10.000 oranlarında (g/L) hücre kültürü medyumunda çözündürülerek 0,22 mikron filtrelerden geçirilerek sterilize edildi. Her iki konsantrasyon 24 saat boyunca hücrelere uygulandı.

2.3. Western Blot Uygulaması

2.3.1 Protein İzolasyonu ve Kantifikasyonu

Uygulama sürelerinin sonunda hücreler T75 kültür kabındayken 3 kez soğuk PBS ile yıkandı. PBS içerisinde hücre kazıyıcı ile (Nest-710001)

kaldırıldı ve 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildikten sıvı faz uzaklaştırdı ve -80°C'de saklandı.

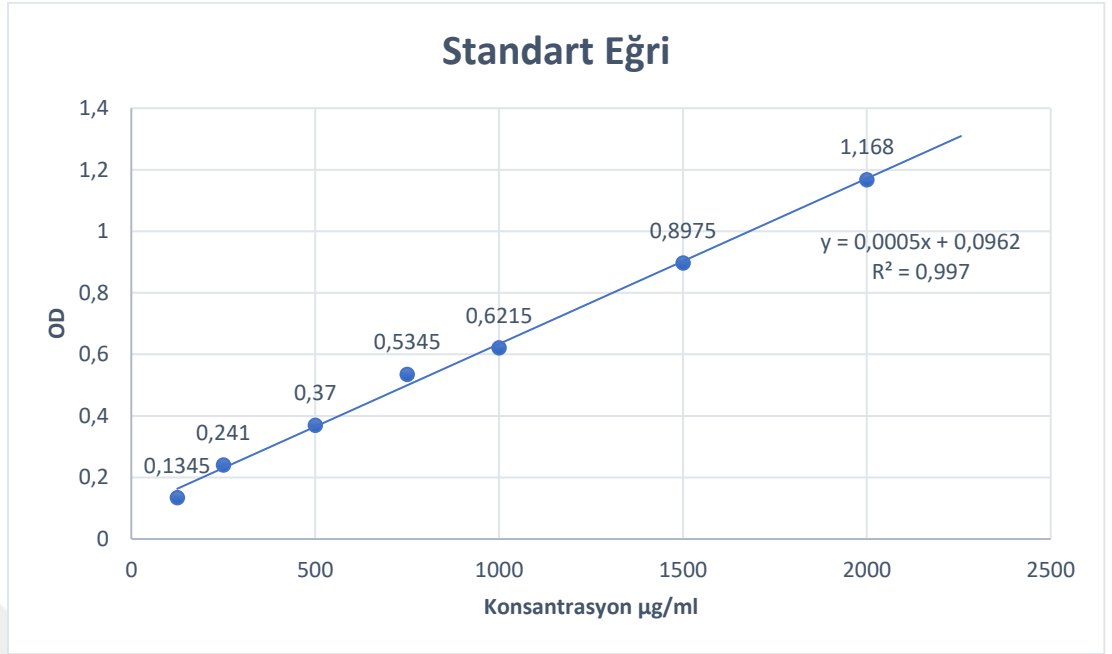
-80°C'den çıkarılan örnekler çözünmeden üzerlerine Proteaz inhibitör kokteyli (Clontech-PT5140-2) içeren 2 ml soğuk xTractor (Takara-635625) lizis tamponu eklendi, 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve 10 dakikada bir vortekslendi. Sonrasında 30 dk +4°C'de 16000G'de santrifüj edildi. Süpernatant içindeki çözülmüş proteinler yeni bir tüpe alındı ve pellet atıldı.

Protein konsantrasyonu, BCA Assay tekniğiyle üreticinin belirlediği protokole uygun olarak belirlendi (Takara-T9300A). Bunun için 125-2000 µg/ml arasında 7 farklı konsantrasyonda BSA standardı xtractor buffer ile seyreltilerek hazırlandı. Blank olarak bufferın kendisi kullanıldı. 20'şer µl örnek proteinler ve standartlar 96 gözlü şeffaf kuyucuğa 2 tekrar şeklinde yüklendi. Üzerine 250 µl 1X CBB boya solüsyonu eklendi ve 30 dk oda 37°C'de inkübe edildi.

Süre sonunda spektrofotometrede 595 nm okuma yapıldı ve blank optik yoğunluk (OD) değeri tüm standart ve örneklerden çıkartıldı ve standart eğri çizildi.

Konsantrasyon µg/ml	125	250	500	750	1000	1500	2000
OD (Blanked)	0.1345	0.241	0.37	0.5345	0.6215	0.8975	1.168

Tablo 2.1. Blank optik yoğunluk değerleri



Şekil 2.1. Blank optik yoğunluk değerleri eğrisi

Standart eğriye göre $y=0,0005x + 0,0962$ formülü ve R^2 değeri 0,997 olarak hesaplandı. Bu formüle göre örneklerin OD değerlerine göre protein konsantrasyonları hesaplandı.

Deney Grubu	Kısaltma	Konsantrasyon (µg/ml)
Kontrol	C	320.6
Sodyum Benzoat -1/1.000	1	361.6
Sodyum Benzoat -1/10.000	2	484.6

Tablo 2.2. OD değerlerine göre hesaplanmış sodyum benzoat konsantrasyonları

Hesaplanan değerlere göre tüm örnekler 100 µg/ml konsantrasyona gelecek şekilde xtractor buffer ile seyreltildi. Örnekler üzerine her ml için 0,34 µl %10 β-merkaptoetanol içeren 4X laemmlı tamponu eklenerek 95°C'de 5 dakika su banyosunda denatüre edildiler. Eklenen tampon sonucunda örnek konsantrasyonu 80 µg/ml olarak kaydedildi ve -20°C'de saklandı.

2.3.2. Tamponların Hazırlanması

Aşağıda tabloları verilen tampon çözeltiler çalışmalara başlamadan önce ayrı ayrı hazırlandı, pH değerleri tablodaki değerlere göre ayarlandıktan sonra çözeltiler 24 saat dinlendirildi ve ertesi gün pH değerleri tekrar kontrol edilerek gösterilen değerde sabitlendi.

SDS (%10)	16 ml
Tris base	72,684 gr
ddH ₂ O	180 ml
pH	8,8 (HCl ile)
ddH ₂ O	200 ml'ye tamamla

Tablo 2.3. Ana Jel Tamponu

SDS (%10)	16 ml
Tris base	12,10 gr
ddH ₂ O	160 ml
pH	6,8 (HCl ile)
ddH ₂ O	200'ye tamamla

Tablo 2.4. Stacking Jel Tamponu

Tris Base	250mM	30,285 gr
Glisin	1,92M	144,13 gr
SDS	1%	10 gr
pH	8,3	

Tablo 2.5. Running Tamponu

Tris-base	250mM	30,285 gr
Glisin	1,9M	144,13 gr
pH	8,3	
Soğuk Methanol/ethanol	20%	1X'e seyreltirken eklenir

Tablo 2.6. Transfer Tamponu

Tris-base	24g
NaCl	88g
dH2O	900 ml
pH 7,6 - (12N HCl ile titrasyon)	
1L'ye tamamla	

Tablo 2.7. Tris Tamponlu Salin (TBS)

TBST

100 ml 10X TBS
900 ml ddH2O
1ml Tween20

Tablo 2.8. TBST

Ponceau	0.10%
Asetik Asit	5%
dH2O	50 ml

Tablo 2.9. Ponceau Boyası

2.3.3. Jel Hazırlama ve Elektroforez

Hedef antijenlerin büyüklüğü değerlendirilerek jel konsantrasyonuna %10 olarak karar verildi. Buna göre aşağıda tablosu verilen separating jel

hazırlandı ve jel dökme aparatına yüklendi. Üzerine %60 izopropil alkol ile doldurularak jelin üst seviyesi düzlendi ve 30-45 dakika boyunca donması beklendi.

Bileşen	
Bis-akrilamid (1:30)	1,65 ml
ddH ₂ O	2,725 ml
Ana Jel Tamponu	0,625 ml
%10 APS (ul)	25 µl
TEMED (ul)	5 µl

Tablo 2.10. Separating Jel

Jelin donduğu doğrulandıktan sonra üzerindeki izopropil alkol filtre kağıdıyla emdirildikten sonra aşağıda tabloda karışımı verilen stacking jel hazırlandı ve yüzeye kadar doldurularak taraklarla birlikte jel 30-45 dakika donmaya bırakıldı.

Bileşen	
Bis-akrilamid (1:30)	1 ml
ddH ₂ O	5 ml
Stacking jel tamponu pH(6.8)	2 ml
%10 APS (ul)	50 µl

TEMED (ul)	10 µl
------------	-------

Tablo 2.11. Stacking Jel

Sonrasında taraklar çıkarıldı ve jel yıkandı. Aparatıyla birlikte yürütme tankına alınan jelin kabı 1X running tamponuyla dolduruldu.

Kuyucuklara protein boyut markerı 8 µl (Precision Plus Protein Dual Color, Biorad1610374), kontrol grubu ve diğer 6 grup 30 µl (2,4 µg total protein) sırasıyla yüklendi. Dış tank yarıya kadar running tamponuyla dolduruldu ve 90V'ta çalıştırıldı. Boya yürümesi takip edildi ve yaklaşık 20 dk sonra stacking jel seviyesini geçince voltaj 120V'a yükseltildi ve yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü. Markerın açıklığı takip edilerek hedef proteinlerin olduğu bölgelerde iyice ayrıldığı doğrulandığında yürüme durduruldu.

2.3.4. Membrana Transfer ve Blotlama

1X transfer tamponu soğuk olarak hazırlandı ve filtre kağıtları, nitroselüloz membran ve süngerler bu tamponda ıslatıldı. Sandviç kaset içerisine sırasıyla sünger-filtre kağıdı- jel- nitroselüloz membran ıslak ortamda eklendi ve jel ile membran üzerinde mini merdane gezdirilerek arada kalan sıvı ve hava alındı. Sonra tekrar filtre kağıdı ve sünger eklenerek sandviç kaset düzeneği sıkıca kapatıldı ve transfer tankına yüklendi. Katottan anota doğru akımın jelden membrana doğru denk geleceği şekilde kasetler transfer tankına yerleştirildi ve tank da içi buzlu su dolu daha büyük bir saklama kabına konuldu. Tankın en altına manyetik karıştırıcı yerleştirildi ve 350 mA akımda 90 dakika transfer gerçekleştirildi.

Transfer sonrası jel atıldı ve membran distile suyla yıkandı. Hazırlanan Ponceau boyası membrana damlatıldı ve birkaç dakika yavaşça çalkalandı. Ponceau boyası yıkandıktan sonra membran üzerinde protein bantları aşağıdaki görseldeki şekilde gözlenerek transferin gerçekleştiği doğrulandı.



Şekil 2.1. Ponceau S boyasıyla boyanan membranlardaki total protein bantları

Sonrasında membranlar işaretleneceği antikorlara göre farklı kaplara alındı ve TBST ile 5 dakika çalkalanarak Ponceau temizlendi. Blocking işlemi için %5 süt tozu (Santa Cruz sc-2324) içeren TBS içerisinde membranlar yavaş hızda 1 saat çalkalandı. Süre sonunda karışım dökülerek TBST ile bir kez yıkandı.

%1 BSA (Santa Cruz- 9048-46) içeren TBST içerisinde primer antikorlar aşağıdaki tabloya göre seyreltildi.

Antikor	Seyreltme Oranı
GAPDH	1/3000
Actin	1/500
E-cadherin	1/500
N-cadherin (CDH12)	1/500

Tablo 2.12. Antikor seyreltme oranları

Primer antikor karışımlarıyla birlikte membranlar +4°C'de gece boyu yavaş çalkalamada bırakıldı ve ertesi gün TBST ile 4 defa 10 dakika boyunca yüksek hızda çalkalanarak yıkandı.

%1 BSA içeren TBST ile 1/2000 oranında sulandırılan sekonder antikor (Biorad- 1706515) eklenerek oda sıcaklığında 2 saat yavaş çalkalamada membranlar inkübe edildi.

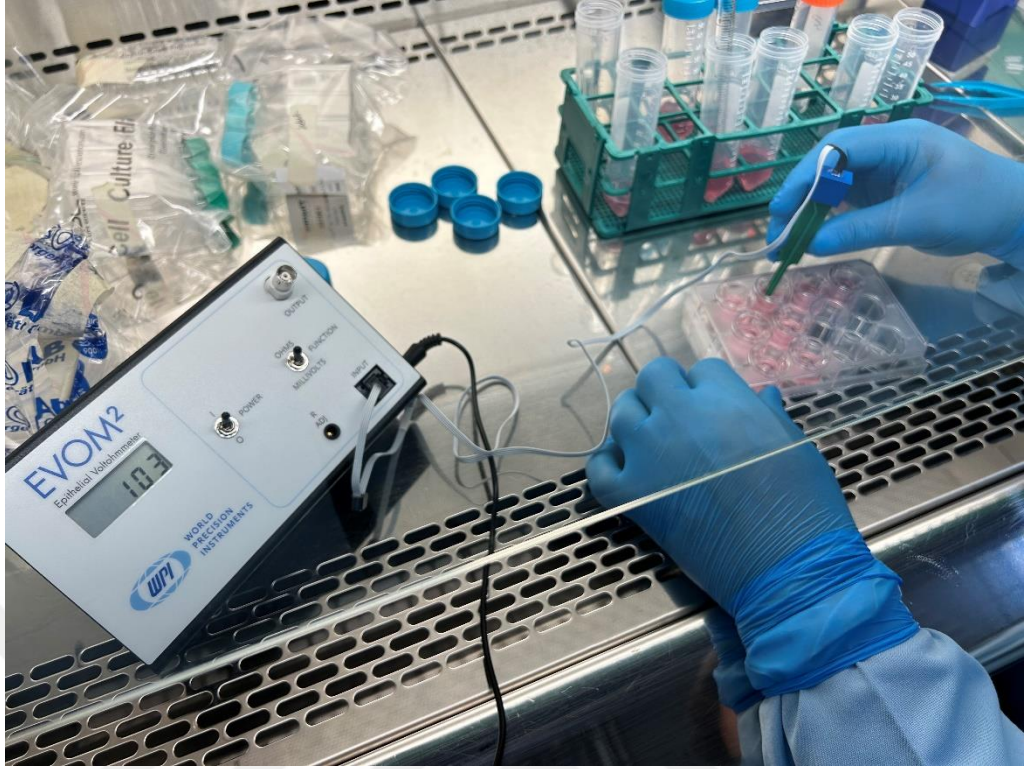
Sonrasında 4 defa 10 dakika boyunca TBST ile yıkanan membranlar üzerine kemilüminesans (ECL) luminol karışımı (Biorad-1705061) eklenerek 5 dakika sonra karanlık odalı kamerada fotoğrafı çekildi.

Çekilen ECL fotoğraflarında bantlar GAPDH'a göre normalize edildi ve gruplar arasındaki ifade farklılıkları ImageJ programıyla hesaplandı.

2.4. TEER Ölçümü

İnsan kolon epitel hücreleri, (CACO2) monolayer oluşturmak için 3 µm gözenek boyutuna sahip geçirgen 12 kuyucuklu transwell hücre plakasına her kuyucuğa 1.5 x 10⁵ yoğunlukta hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat hücrelerin tutunması için inkübe edildi.

24 saatin sonunda tüm hücrelerin transepitel elektrik direnci (TEER) değerleri EVOM2 aracılığıyla ölçüldü ve devamında kültür medyumları deney gruplarına belirtilen oranlarda deterjan ve sodyum benzoat içeren medyumla değiştirildi.



Şekil 2.2. EVOM2 cihazı ile TEER ölçümü

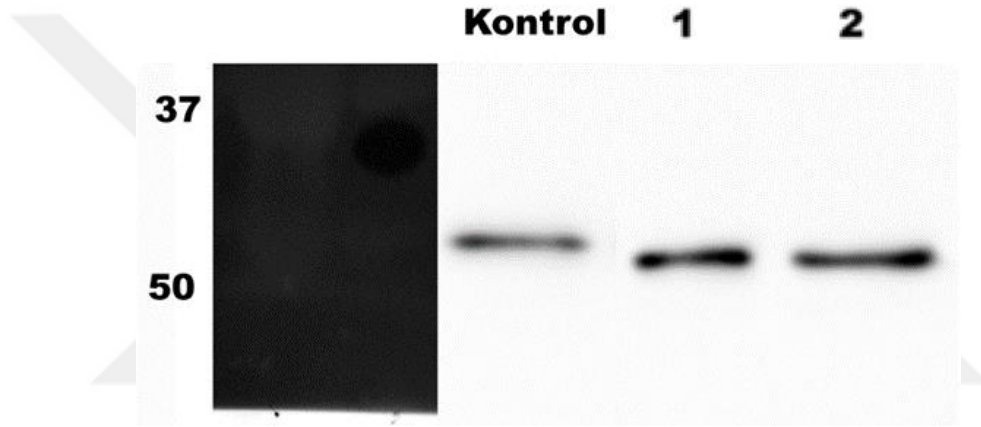
2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizler için Jamovi istatistik programı kullanıldı (The jamovi project (2022). Jamovi. (Version 2.3) [Computer software]. <https://www.jamovi.org> internet sitesinden indirildi.) TEER ölçümlerinin kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda benzoat uygulanan gruplar arasında karşılaştırılmasında student t-testi kullanıldı. Western blot ile elde edilen protein düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında student t testi kullanıldı, her konsantrasyonda 0. ve 24. saat karşıştırmalarında paired samples T testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

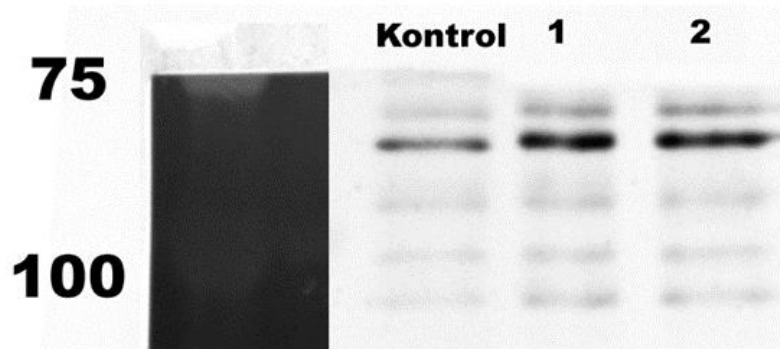
III. BULGULAR

3.1. Western Blot Uygulaması

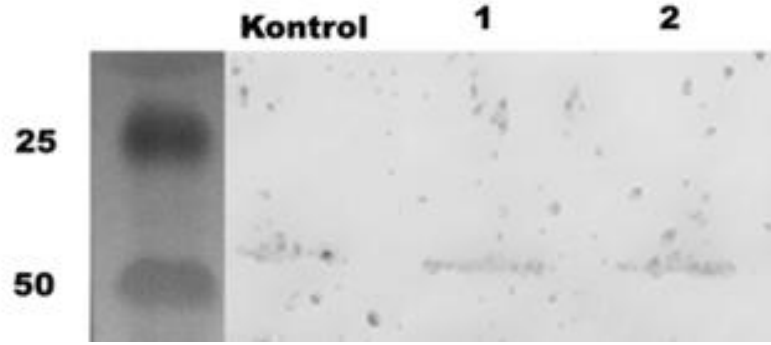
Uygulama sonucunda elde edilen jel görüntüleme fotoğrafları aşağıda listelenmiştir.



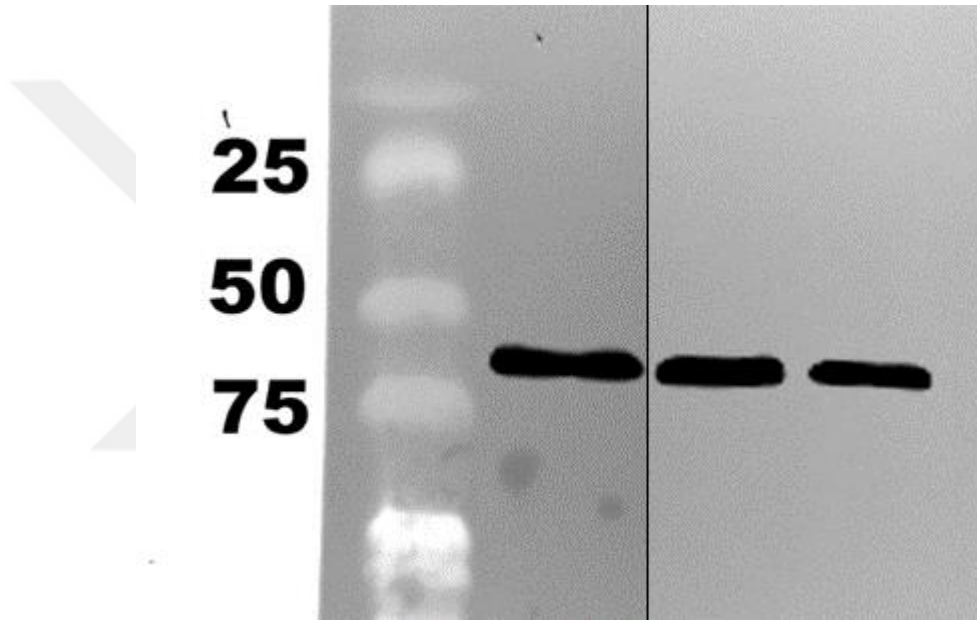
Şekil 3.1. GAPDH



Şekil 3.2. E-Cadherin



Şekil 3.3. N-Cadherin



Şekil 3.4. α -SMA

3.2. Kantifikasyon

ImageJ yazılımı ile GAPDH boyamalarına göre tüm gruplar normalize edildi. Daha sonra deney gruplarının Kontrol grubuna göre bağıl ifadeleri katsayı cinsinden hesaplandı.

3.3. Gruplar arasında TEER Ölçümlerinin Karşılaştırılması

Tablo 3.1. Kontrol grubu, 1/1.000 ve 1/10.000 konsantrasyonda Na Benzoat uygulanan gruplarda 0. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması

	TEER ölçümü (Ω)	P*
Kontrol	109 \pm 1.155 Ω	
Sodyum Benzoat - 1/1.000	104 \pm 0.577 Ω	0.013
Sodyum Benzoat - 1/10.000	104 \pm 0.577 Ω	0.034

*1/1000 ve 1/10.000 sodyum benzoat gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Araştırmanın başlangıcında kontrol grubundan alınan TEER ölçümü ortalama 109 \pm 1.15 idi. Sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer 104 \pm 0.577 iken sodyum benzoat 1/10.000 uygulanan grupta 104 \pm 0.577 idi. Sodyum benzoat uygulanan grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, bu gruplarda TEER düzeylerinin anlamlı düşük olduğu bulundu (P<0.05)

Tablo 3.2. Kontrol grubu, 1/1.000 ve 1/10.000 konsantrasyonda Na Benzoat uygulanan gruplarda 24. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması

	TEER ölçümü (Ω)	P*
Kontrol	108 \pm 1 Ω	
Sodyum Benzoat - 1/1.000	84.7 \pm 0.577 Ω	<.001
Sodyum Benzoat - 1/10.000	93 \pm 2 Ω	0.001

*1/1000 ve 1/10.000 sodyum benzoat gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Araştırmanın 24. saatinde kontrol grubundan alınan TEER ölçümü ortalama $108 \pm 1 \Omega$ idi. Sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer $84.7 \pm 0.577 \Omega$ iken sodyum benzoat 1/10.000 uygulanan grupta $93 \pm 2 \Omega$ idi. Sodyum benzoat uygulanan grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, bu gruplarda TEER düzeylerinin anlamlı düşük olduğu bulundu. ($P < 0.05$)

Tablo 3.3. Tüm çalışma gruplarında 0. ve 24. Saat TEER ölçümlerinin karşılaştırılması

	TEER ölçümü (Ω)		
	0.Saat	24. Saat	P*
Kontrol	$109 \pm 1.15 \Omega$	$108 \pm 1 \Omega$	0.383
Sodyum Benzoat -1/1.000	$104 \pm 0.577 \Omega$	$84.7 \pm 0.577 \Omega$	0.001
Sodyum Benzoat-1/10.000	$104. \pm 0.577 \Omega$	$93 \pm 2 \Omega$	0.011

*0 ve 24. Saat TER ölçümlerinin paired samples t testi ile karşılaştırılması

Araştırmanın 0. Ve 24. Saatinde elde edilen TEER ölçümü kontrol grubunda 0. saatte $109 \pm 1.15 \Omega$, 24. Saatte $108 \pm 1 \Omega$ olarak ölçüldü. TEER düzeyi değişimi istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($P > 0.05$). Sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer 0. saatte $104 \pm 0.577 \Omega$, 24. saatte $84.7 \pm 0.577 \Omega$ olarak ölçüldü. Sodyum benzoat 1/10.000 için bu değer 0. Saatte $104. \pm 0.577 \Omega$, 24. saatte $93 \pm 2 \Omega$ olarak ölçüldü. Sodyum benzoat uygulanan her iki grupta TEER düzeyinde anlamlı düşüş saptandı ($P < 0.05$).

Tablo 3.4. Gruplar arasında E-cadherin ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

	E-Cadherin bağıl değeri	P*
Kontrol	1	
Sodyum Benzoat - 1/1.000	1.482±0.00473	<.001
Sodyum Benzoat - 1/10.000	1.409±0.02551	0.001

*1/1000 ve 1/10.000 sodyum benzoat gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Kontrol grubuna göre alınan bağıl değerler ile sodyum benzoat grupları karşılaştırıldığında sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer 1.482±0.00473 iken sodyum benzoat 1/10.000 uygulanan grupta 1.409±0.02551 idi. Sodyum benzoat uygulanan grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, bu gruplarda E-Cadherin düzeyinde anlamlı artış olduğu saptandı. (P<0.05)

Tablo 3.5. Gruplar arasında N-cadherin ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

	N-Cadherin bağıl değeri	P*
Kontrol	1	
Sodyum Benzoat - 1/1.000	0.529 ± 0.00115	< .001
Sodyum Benzoat - 1/10.000	0.583 ± 0.00569	< .001

*1/1000 ve 1/10.000 sodyum benzoat gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Kontrol grubuna göre alınan bağıl değerler ile sodyum benzoat grupları karşılaştırıldığında sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer 0.529 ± 0.00115 iken sodyum benzoat 1/10.000 uygulanan grupta 0.583 ± 0.00569 idi. Sodyum benzoat uygulanan grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, bu gruplarda N-Cadherin düzeyinde anlamlı düşüş saptandı. ($P < 0.05$)

Tablo 3.6. Gruplar arasında α -SMA ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

	α -SMA bağıl değeri	P*
Kontrol	1	
Sodyum Benzoat - 1/1.000	0.606 ± 0.00600	$< .001$
Sodyum Benzoat - 1/10.000	0.509 ± 0.00100	$< .001$

*1/1000 ve 1/10.000 sodyum benzoat gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Kontrol grubuna göre alınan bağıl değerler ile sodyum benzoat grupları karşılaştırıldığında sodyum benzoat 1/1.000 için bu değer 0.606 ± 0.00600 iken sodyum benzoat 1/10.000 uygulanan grupta 0.509 ± 0.00100 idi. Sodyum benzoat uygulanan grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, bu gruplarda α -SMA düzeyinde anlamlı düşüş saptandı. ($P < 0.05$)

IV. TARTIŞMA

Tez projemizin bulguları, sodyum benzoat maruziyetinin kolon epitel hücrelerinde E-cadherin ekspresyonunda artma ile karakterize ve transepitelyal elektrik direncinde azalma ile gözlenen geçirgenlik artışına neden olduğunu desteklemektedir. Bu hasar hem düşük hem de yüksek doz maruziyetlerde gözlenmiştir. Bunun yanında, epitel hasarı ile ilişkili olduğu bilinen ve epitelyal mezenkimal dönüşümün göstergesi olan n-cadherin ve α -SMA'nın ekspresyonunun sodyum benzoat ile karşılaşan kolon epitel hücrelerinde düştüğü görülmüştür.

Gıda maddelerinin üretiminin endüstriyelmesi ile birlikte 1900'lü yılların başında beslenme ürünlerimize girmeye başlayan gıda katkı maddelerinin kullanımının artması ile paralel olarak otoimmün ve alerjik hastalık sıklığında artış dikkat çekmektedir [92–94].

Son zamanlarda bu dikkat çeken hastalık sıklığını açıklamak için epitel bariyer hipotezi ortaya atılmış ve epitelin bariyer fonksiyonunu bozan maddelere maruziyetin hastalık sıklığı ile paralel olarak arttığına dikkat çekilmiştir [95]. Bu patolojilerin gelişiminde gastrointestinal mukozal bütünlüğünün bozulması ve epitel geçirgenliğinin artması ana mekanizmayı oluşturmaktadır. Yüksek yağ içerikli, gıda katkı maddeleri içeren batı tipi diyetin yaygınlaşması ile birlikte intestinal bariyer fonksiyonda bozulma ve disbiyozis ortaya çıkmaktadır [96, 97].

Sodyum benzoat, bakteriyostatik ve fungistatik özellikleri nedeniyle tüm dünyada yiyecek preparatlarında kullanılan koruyucu bir maddedir. WHO uzman komitesi, sodyum benzoatın vücut ağırlığı olarak kg başına 5 mg'lık günlük tüketimini güvenli olarak bildirmiştir. Ancak, araştırmalar sodyum benzoatın çok yüksek konsantrasyonlarda (2119 mg/kg) kullanıldığını göstermektedir [98]. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada sodyum benzoatın ,

enflamasyona ve apoptozun indüklenmesine sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada düşük doz sodyum benzoatın da uzun süre uygulama ile testislerde apoptoz ve hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir [99]. Sodyum benzoatın, insan periferik lenfositlerine değişen dozlarda (6,25–100 µg /mL) uygulandığında kromozom anomaliliğine, kardeş kromatit değişimlerine neden olduğu in vitro olarak gösterilmiştir. Aynı çalışma ile SB'ın insan periferik lenfositlerde genotoksik ve sitotoksik olduğu belirtilmiştir [89]. Sodyum benzoatın aynı zamanda üre bozuklukları, akut hepatik ensefalopati ve multipl skleroz gibi hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur [100–103] Sodyum benzoatın epitelyal bariyer üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya ise literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamızda sodyum benzoatın kolon epitel bariyer ve epitel geçirgenlik üzerine etkileri incelenmiştir. Yüksek oranda diferansiyel olmuş bir monolayer epitelyum oluşturan, kolon mukozasının özelliklerini taşıyan ve intestinal bariyer fonksiyonu üzerine çeşitli çalışmalarda sıkça kullanılan kolon adenokarsinomu kökenli Caco-2 hücre hattında, bu gıda katkı maddesinin etkileri araştırılmıştır.

Sodyum benzoat üst kullanım sınırı olarak FDA tarafından %0,1 konsantrasyon belirlenmiştir. Turşu, mayonez ve hamur işlerinde bu dozda kullanımı tercih edilmekte iken gazlı içeceklerde ve meyve sularında %0,05- %0,02 dozlarda kullanılmaktadır.

Akut dönem maruziyette kolon epitel cevabını değerlendirmek üzere %0.1 (1000 µg /mL) ve %0.01(100 µg /mL) dozlarda uygulanan sodyum benzoat sonrasında 24. saatte yapılan TEER ölçümlerinde sodyum benzoatın transepitelyal elektrik direnci üzerinde anlamlı düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir. Mevcut kullanım bilgileri göz önüne alındığında, insan lenfositlerinde yapılmış olan sitotoksikite çalışması ile birlikte değerlendirildiğinde sodyum benzoata akut maruziyetin her iki dozda Caco-2

kolon kanseri hücrelerinde epitel bariyer hasarı oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda her iki konsantrasyondaki uygulama sonucunda E-cadherin seviyesinde artış, N-cadherin ve α -SMA düzeylerinde azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı. TEER değerindeki düşüş ile birlikte değerlendirildiğinde bu komponentlerin değişiminin epitel bariyer hasarına yanıt olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir. Literatürde sodyum benzoatın kolon kanser hücreleri üzerinde epitel bariyer komponent ekspresyonuna etkilerinin incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda elde edilen bilgilerden hareketle epitel bariyer komponentlerinin sodyum benzoat uygulaması ile ne şekilde değiştiği ileri çalışmalar için önerilebilir.

V. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Caco-2 kolon kanser hücrelerinin %0.1 (1000 µg /mL) ve %0.01(100 µg /mL) konsantrasyonlarda sodyum benzoat ile inkübasyonu sonucunda, transepitelyal elektrik direncinde düşüş ile birlikte epitelyal bariyer hasarı meydana geldiği belirlendi.
2. Caco-2 kolon kanser hücrelerinin %0.1 (1000 µg /mL) ve %0.01(100 µg /mL) konsantrasyonlarda sodyum benzoat ile inkübasyonu sonucunda E-cadherin seviyesinde artış, N-cadherin ve α-SMA düzeylerinde azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı. TEER değerindeki düşüş ile birlikte değerlendirildiğinde bu komponentlerin değişiminin epitel bariyer hasarına yanıt olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir.
3. Çalışmamızda elde edilen bilgilerden hareketle epitel bariyer komponentlerinin sodyum benzoat uygulaması ile ne şekilde değiştiği ileri çalışmalar için önerilebilir.
4. Kronik ve tekrarlayan sodyum benzoatın kolon epitel bariyer üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

VI. ÖZET

“SODYUM BENZOATIN KOLON EPİTELYAL BARIYER KOMPONENTLERİNİN EKSPRESYONUNA VE TRANSEPİTELYAL ELEKTRİK REZİSTANSA ETKİSİ”

Amaç: İnsan nüfusunun artması ve artan gıda ihtiyacını karşılamak için gelişen endüstriyel gıda üretim teknikleriyle birlikte, gıdalarda kullanılan katkı maddesi sıklığında da artış meydana gelmiştir. Sodyum benzoat, 1900'lerin başında antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin keşfinden itibaren aktif olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma, sodyum benzoatın yaygın kullanılan dozlarının kolon epitel bariyeri üzerindeki akut etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve yöntem : İntestinal bariyer işlevinin simülasyonu için Caco-2 hücre serisi tercih edildi. Sodyum benzoat, 1/1.000 ve 1/10.000 oranlarında seyreltilerek 24 saat boyunca inkübasyon sağlandı. Uygulama sonrasında, kültürlerde TEER ölçümü yapıldı. E-cadherin, N-cadherin ve α -SMA düzeyleri Western blot yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: Her iki sodyum benzoat konsantrasyonunun uygulanmasından sonra 24. saatte yapılan ölçümlerde TEER değerinde anlamlı azalma, E-cadherin değerinde anlamlı artış, ve N-cadherin ve α -SMA değerlerinde anlamlı azalma saptandı.

Sonuç: Sodyum benzoatın, gıda maddelerinde kullanımına izin verilen konsantrasyonlarda uygulandığında, akut maruziyette TEER düşüşüne sebep olduğu saptandı. TEER düzeyindeki düşüş, epitel bariyer fonksiyonlarında bozulmayla ilişkilendirildi. E-cadherin artışı ve N-cadherin ve α -SMA düzeylerindeki azalma, bozulan bariyer fonksiyonunu onarma çabası olarak gözlendi. Ancak, kronik ve tekrarlayan maruziyetin kolon epitel bariyer

üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Sodyum benzoat, e-cadherin, n-cadherin, alfa-SMA, TEER



VII. ABSTRACT

“THE EFFECT OF SODIUM BENZOATE ON THE EXPRESSION OF COLON EPITHELIAL BARRIER COMPONENTS AND TRANSEPITHELIAL ELECTRICAL RESISTANCE”

Introduction: The increasing human population and developing industrial food production techniques to meet the growing demand for food have led to an increase in the frequency of additives used in food. Sodium benzoate has been actively used since the discovery of its antibacterial and antifungal properties in the early 1900s. This study was conducted to examine the acute effects of commonly used doses of sodium benzoate on the colonic epithelial barrier.

Materials and methods: The Caco-2 cell line was chosen for simulating intestinal barrier function. Sodium benzoate was diluted at concentrations of 1/1,000 and 1/10,000 and incubated for 24 hours. After the application, TEER measurements were taken in the cultures. The levels of E-cadherin, N-cadherin, and α -SMA were measured using the Western blot method.

Results: After the application of both concentrations of sodium benzoate, a significant decrease in TEER value, a significant increase in E-cadherin value, and a significant decrease in N-cadherin and α -SMA values were observed in the measurements performed at 24 hours.

Conclusion: It was found that when sodium benzoate is applied at concentrations permitted for use in food, it causes a decrease in TEER in acute exposure. The decrease in TEER level was associated with a disturbance in epithelial barrier function. An increase in E-cadherin and a decrease in N-cadherin and α -SMA levels were observed as an effort to repair the disrupted barrier function. However, more detailed studies are

needed to evaluate the effects of chronic and repeated exposure on the colon epithelial barrier.

Keywords: Sodyum benzoate, e-cadherin, n-cadherin, alfa-SMA, TEER



VII. KAYNAKLAR

1. Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract - revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(6), 681-689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
2. Keita, A. V., & Söderholm, J. D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7), 718-733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x>
3. Quigley, E. M. M. (2016). Leaky gut - concept or clinical entity? *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(2), 74-79. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000243>
4. T, J., Oh, N., Je, J., J, L., & Sn, R. (1984). The normal cultivable microflora in upper jejunal fluid in healthy adults. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 19(2). Geliş tarihi gönderen <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6372075/>
5. Gorbach, S. L. (1996). Microbiology of the Gastrointestinal Tract. İçinde S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th bs). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Geliş tarihi gönderen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7670/>
6. Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(5), 356-368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
7. Brandtzaeg, P. (1995). Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 103(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1995.tb01073.x>
8. Elphick, D. A., & Mahida, Y. R. (2005). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, 54(12), 1802-1809. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.068601>
9. Lencer, W. I., Cheung, G., Strohmeier, G. R., Currie, M. G., Ouellette, A. J., Selsted, M. E., & Madara, J. L. (1997). Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8585-8589. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8585>
10. Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., ... Bos, N. A. (2010). Enteric defensins are essential regulators of

intestinal microbial ecology. *Nature Immunology*, 11(1), 76-83.
<https://doi.org/10.1038/ni.1825>

11. Sharma, A., Kwak, J.-G., Kolewe, K. W., Schiffman, J. D., Forbes, N. S., & Lee, J. (2020). In Vitro Reconstitution of an Intestinal Mucus Layer Shows That Cations and pH Control the Pore Structure That Regulates Its Permeability and Barrier Function. *ACS applied bio materials*, 3(5), 2897-2909. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00851>
12. Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J. R., Walland, A. C., Bornstein, V. U., Chen, K., ... Cerutti, A. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6157), 447-453. <https://doi.org/10.1126/science.1237910>
13. Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 30(2), 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>
14. Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080>
15. Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
16. LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
17. Forsythe, P., Sudo, N., Dinan, T., Taylor, V. H., & Bienenstock, J. (2010). Mood and gut feelings. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.05.058>
18. Gehart, H., & Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 19-34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
19. Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., ... Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 16(34), 4264-4271. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i34.4264>
20. Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677-696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
21. Beumer, J., & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(1), 39-53. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0278-0>

22. Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17, 375-412. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>
23. Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology*, 30(10), 805-817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>
24. Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(9), 564-580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
25. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123(6 Pt 2), 1777-1788. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>
26. Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539-1550. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>
27. Martìn-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., ... Dejana, E. (1998). Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *The Journal of Cell Biology*, 142(1), 117-127.
28. Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 171(6), 939-945. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>
29. Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T. M., Danninger, C., Probst, G., & Krizbai, I. A. (1999). Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Experimental Cell Research*, 250(2), 434-438. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4558>
30. Blank, F., Wehrli, M., Lehmann, A., Baum, O., Gehr, P., von Garnier, C., & Rothen-Rutishauser, B. M. (2011). Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology*, 216(1-2), 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.02.006>
31. Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., ... Tsukita, S. (1996). Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *The Journal of Cell Biology*, 133(1), 43-47. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.1.43>

32. Balda, M. S., Flores-Maldonado, C., Cereijido, M., & Matter, K. (2000). Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78(1), 85-96.
33. Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., ... Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4131-4142. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>
34. Zeiller, C., Mebarek, S., Jaafar, R., Pirola, L., Lagarde, M., Prigent, A.-F., & Némoz, G. (2009). Phospholipase D2 regulates endothelial permeability through cytoskeleton reorganization and occludin downregulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(7), 1236-1249. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.001>
35. Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68, 403-429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
36. Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(4), 631-659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
37. Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(3), 660-669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
38. Wada, M., Tamura, A., Takahashi, N., & Tsukita, S. (2013). Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology*, 144(2), 369-380. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.035>
39. Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., ... Parkos, C. A. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3067-3076. <https://doi.org/10.1084/jem.20071416>
40. Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D., & Brito, M. A. (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European Journal of Cell Biology*, 90(10), 787-796. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.06.005>
41. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., ... Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126(4), 741-754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>

42. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion - PubMed. (t.y.). Geliş tarihi 17 Aralık 2022, gönderen <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16834557/>
43. Buxton, R. S., & Magee, A. I. (1992). Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Seminars in Cell Biology*, 3(3), 157-167. [https://doi.org/10.1016/S1043-4682\(10\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4682(10)80012-1)
44. Radice, G. L. (2013). N-cadherin-mediated adhesion and signaling from development to disease: Lessons from mice. *Progress in molecular biology and translational science*, 116, 263-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00012-1>
45. Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(11), 799-809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
46. Utech, M., Mennigen, R., & Bruewer, M. (2010). Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 484987. <https://doi.org/10.1155/2010/484987>
47. Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., & Collins, J. E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(9), 1139-1162. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700316>
48. Schulzke, J.-D., Bojarski, C., Zeissig, S., Heller, F., Gitter, A. H., & Fromm, M. (2006). Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072, 288-299. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.027>
49. Wang, F., Graham, W. V., Wang, Y., Witkowski, E. D., Schwarz, B. T., & Turner, J. R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American Journal of Pathology*, 166(2), 409-419. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62264-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62264-x)
50. Al-Sadi, R., Boivin, M., & Ma, T. (2009). Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(7), 2765-2778. <https://doi.org/10.2741/3413>
51. Hollander, D., & Kaunitz, J. D. (2020). The "Leaky Gut": Tight Junctions but Loose Associations? *Digestive Diseases and Sciences*, 65(5), 1277-1287. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05777-2>
52. Choi, W., Yeruva, S., & Turner, J. R. (2017). Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Experimental Cell Research*, 358(1), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.036>

53. Zhang, Y.-Z., & Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(1), 91-99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>
54. de Mattos, B. R. R., Garcia, M. P. G., Nogueira, J. B., Paiatto, L. N., Albuquerque, C. G., Souza, C. L., ... Simioni, P. U. (2015). Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 493012. <https://doi.org/10.1155/2015/493012>
55. Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, *11*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
56. Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., ... Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, *129*(2), 550-564. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.002>
57. Ciccica, F., Rizzo, A., & Triolo, G. (2016). Subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. *Current Opinion in Rheumatology*, *28*(1), 89-96. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000239>
58. Costello, M.-E., Ciccica, F., Willner, D., Warrington, N., Robinson, P. C., Gardiner, B., ... Brown, M. A. (2015). Brief Report: Intestinal Dysbiosis in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *67*(3), 686-691. <https://doi.org/10.1002/art.38967>
59. El Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G. V., ... Fasano, A. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, *123*(5), 1607-1615. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36578>
60. Fasano, A. (2011). Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, *91*(1), 151-175. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2008>
61. Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., van Vollenhoven, R., ... Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews. Disease Primers*, *2*, 16039. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>
62. Azzouz, D., Omarbekova, A., Heguy, A., Schwudke, D., Gisch, N., Rovin, B. H., ... Silverman, G. J. (2019). Lupus nephritis is linked to disease-activity associated expansions and immunity to a gut commensal. *Annals of*

the Rheumatic Diseases, 78(7), 947-956.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214856>

63. Leiva-Gea, I., Sánchez-Alcoholado, L., Martín-Tejedor, B., Castellano-Castillo, D., Moreno-Indias, I., Urda-Cardona, A., ... Queipo-Ortuño, M. I. (2018). Gut Microbiota Differs in Composition and Functionality Between Children With Type 1 Diabetes and MODY2 and Healthy Control Subjects: A Case-Control Study. *Diabetes Care*, 41(11), 2385-2395.
<https://doi.org/10.2337/dc18-0253>

64. Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J. M., Tinahones, F. J., Cardona, F., Soriguer, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine*, 11, 46. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-46>

65. Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., ... Dahl-Jørgensen, K. (2015). Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes*, 64(5), 1682-1687. <https://doi.org/10.2337/db14-1370>

66. Mønsted, M. Ø., Falck, N. D., Pedersen, K., Buschard, K., Holm, L. J., & Haupt-Jørgensen, M. (2021). Intestinal permeability in type 1 diabetes: An updated comprehensive overview. *Journal of Autoimmunity*, 122, 102674. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102674>

67. Mäkelä, M., Vaarala, O., Hermann, R., Salminen, K., Vahlberg, T., Veijola, R., ... Ilonen, J. (2006). Enteral virus infections in early childhood and an enhanced type 1 diabetes-associated antibody response to dietary insulin. *Journal of Autoimmunity*, 27(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.04.003>

68. Rodriguez-Calvo, T. (2019). Enterovirus infection and type 1 diabetes: unraveling the crime scene. *Clinical and Experimental Immunology*, 195(1), 15-24. <https://doi.org/10.1111/cei.13223>

69. Thaïss, C. A., Levy, M., Grosheva, I., Zheng, D., Soffer, E., Blacher, E., ... Elinav, E. (2018). Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6382), 1376-1383. <https://doi.org/10.1126/science.aar3318>

70. Massier, L., Chakaroun, R., Tabei, S., Crane, A., Didt, K. D., Fallmann, J., ... Kovacs, P. (2020). Adipose tissue derived bacteria are associated with inflammation in obesity and type 2 diabetes. *Gut*, 69(10), 1796-1806. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320118>

71. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates

with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546.

<https://doi.org/10.1038/nature12506>

72. Scheithauer, T. P. M., Rampanelli, E., Nieuwdorp, M., Vallance, B. A., Verchere, C. B., van Raalte, D. H., & Herrema, H. (2020). Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes.

Frontiers in Immunology, 11, 571731.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571731>

73. Bruna, G., Thais, A., & Cardoso, L. (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17, 306-310. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16321>

74. Gardner, L. K., & Lawrence, G. D. (1993). Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 693-695. <https://doi.org/10.1021/jf00029a001>

75. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. (t.y.). Geliş tarihi 01 Ocak 2023, gönderen

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1733>

76. World Health Organization, & Safety, I. P. on C. (2000). *Benzoic acid and sodium benzoate*. World Health Organization. Geliş tarihi gönderen

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42310>

77. Kubota, K., & Ishizaki, T. (1991). Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans.

European Journal of Clinical Pharmacology, 41(4), 363-368.

<https://doi.org/10.1007/BF00314969>

78. Nair, B. (2001). Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *International Journal of Toxicology*, 20 Suppl 3, 23-50. <https://doi.org/10.1080/10915810152630729>

79. Beyoğlu, D., & Idle, J. R. (2012). The glycine deportation system and its pharmacological consequences. *Pharmacology & Therapeutics*, 135(2), 151-167. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.05.003>

80. Penner, N., Ramanathan, R., Zgoda-Pols, J., & Chowdhury, S. (2010). Quantitative determination of hippuric and benzoic acids in urine by LC-MS/MS using surrogate standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(4), 534-543.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52(4), 534-543.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.016>

81. Shahmihammadi, M., Javadi, M., & Nassiri-Asl, M. (2016). An Overview on the Effects of Sodium Benzoate as a Preservative in Food Products. *Biotechnology and Health Sciences*, *In press*.

<https://doi.org/10.17795/bhs-35084>

82. Kreindler, J. J., Slutsky, J., & Haddad, Z. H. (1980). The effect of food colors and sodium benzoate on rat peritoneal mast cells. *Annals of Allergy*, 44(2), 76-81.
83. Schaubschläger, W. W., Becker, W. M., Schade, U., Zabel, P., & Schlaak, M. (1991). Release of mediators from human gastric mucosa and blood in adverse reactions to benzoate. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 96(2), 97-101. <https://doi.org/10.1159/000235478>
84. E, N., Mc, C., A, F., & A, T. (2004). Sodium benzoate-induced repeated episodes of acute urticaria/angio-oedema: randomized controlled trial. *The British journal of dermatology*, 151(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06095.x>
85. Khoshnoud, M. J., Siavashpour, A., Bakhshizadeh, M., & Rashedinia, M. (2018). Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(2). <https://doi.org/10.1002/jbt.22022>
86. Bakar, E. (2015). The Effects of Citric Acid and Sodium Benzoate on Liver and Kidney Tissue.
87. Saatci, C., Erdem, Y., Bayramov, R., Akalın, H., Tascioglu, N., & Ozkul, Y. (2016). Effect of sodium benzoate on DNA breakage, micronucleus formation and mitotic index in peripheral blood of pregnant rats and their newborns. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1179-1183. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1224979>
88. Tsay, H.-J., Wang, Y.-H., Chen, W.-L., Huang, M.-Y., & Chen, Y.-H. (2007). Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 29(5), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.05.001>
89. Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Unal, F., Yılmaz, S., & Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(4), 763-769. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.040>
90. Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. İçinde K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Ed.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer. Geliş tarihi gönderen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>
91. Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., & Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 26(8), 1243-1246. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009>

92. Sadighara, P., Safta, M., Limam, I., Ghanati, K., Nazari, Z., Karami, M., & Abedini, A. (2023). Association between food additives and prevalence of allergic reactions in children: a systematic review. *Reviews on Environmental Health*, 38(1), 181-186. <https://doi.org/10.1515/reveh-2021-0158>
93. Lerner, A., & Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(6), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>
94. Manzel, A., Muller, D. N., Hafler, D. A., Erdman, S. E., Linker, R. A., & Kleiweiefeld, M. (2014). Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(1), 404. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0404-6>
95. Pat, Y., & Ogulur, I. (2021). The epithelial barrier hypothesis: a 20-year journey. *Allergy*, 76(11), 3560-3562. <https://doi.org/10.1111/all.14899>
96. Camilleri, M., Lyle, B. J., Madsen, K. L., Sonnenburg, J., Verbeke, K., & Wu, G. D. (2019). Role for diet in normal gut barrier function: developing guidance within the framework of food-labeling regulations. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(1), G17-G39. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00063.2019>
97. Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., ... Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*, 63(1), 116-124. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304119>
98. Benzoate and Synthetic Color Risk Assessment of Fast Food Sauces Served at Street Food Joints of Lucknow, India. (t.y.). <https://doi.org/10.3923/ajft.2008.183.191>
99. El-Shennawy, L., Kamel, M. A. E.-N., Khalaf, A. H. Y., & Yousef, M. I. (2020). Dose-dependent reproductive toxicity of sodium benzoate in male rats: Inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 98, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.014>
100. Brahmachari, S., Jana, A., & Pahan, K. (2009). Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(9), 5917-5927. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803336>
101. Brahmachari, S., & Pahan, K. (2007). Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(1), 275-283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.275>

102. Husson, M.-C., Schiff, M., Fouilhoux, A., Cano, A., Dobbelaere, D., Brassier, A., ... de Lonlay, P. (2016). Efficacy and safety of i.v. sodium benzoate in urea cycle disorders: a multicentre retrospective study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0513-0>
103. Misel, M. L., Gish, R. G., Patton, H., & Mendler, M. (2013). Sodium benzoate for treatment of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology & Hepatology*, 9(4), 219-227.

