T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASETİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

AÇELYA GÜL KOYUNCU

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ELVAN YILMAZ AKYÜZ

BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
MAYIS/2022

İTHAF

"Bu tez çalışmasını her zaman ve her koşulda yanımda olan desteklerini ve anlayışlarını esirgemeyen canım annem, babam ve değerli eşime ithaf ediyorum."

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bu tez çalışma sürecinde de desteklerini esirgemeyen, akademik anlamda tecrübelerini her zaman paylaşan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Elvan YILMAZ AKYÜZ'e,

Meslekte bilim ışığında ilerlememi sağlayan ve hayatım boyunca her zaman destekleyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Binnur OKAN BAKIR'a,

Bu tez çalışmasının histopatolojik analizlerinde yardımını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Alev CUMBUL'a,

Biyokimyasal analizlerde ve istatistiksel analizlerde desteklerini esirgemeyen değerli hocam Müge KOPUZ ALVAREZ NOVAL'a,

Çalışmanın istatistiksel analizlerine katkıda bulunan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İrem Kaya CEBİOĞLU'na,

Bu süreçte anlayışlarını eksik etmeyen her an yanımda olan değerli annem, babam ve eşime,

Ayrıca çalışmayı maddi olarak destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 2021/079),

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
ÖZET xvi
ABSTRACT xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI 4
2.2.İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ 5
2.3. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI SEMPTOMLARI 6
2.4. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ PATOJENEZİ 7
2.4.1. Genetik Faktörler 8
2.4.2. Çevresel Faktörler 10
2.4.2.1. Bağırsak mikrobiyotası: 10
2.4.2.2. Diyet: 12
2.4.2.3. Sigara: 13
2.4.2.4. Diğer çevresel faktörler: 13
2.4.3. İmmünolojik Anormallikler 14
2.4.3.1. İnflamatuar bağırsak hastalığı ve doğal bağışıklık: 15
2.4.3.2. İnflamatuar bağırsak hastalığı ve kazanılmış bağışıklık: 17
2.4.4. Oksidatif Stres 19
2.5. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ TANISI VE TEDAVİSİ 20
2.5.1. Terapötik İlaçlar 24
2.5.2. Cerrahi Tedavi 25
2.5.3. Beslenme 26
2.6. POLİFENOLLER 30
2.6.1. Nar 31
2.7. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI VE NAR 37
3. GEREÇ VE YÖNTEM 38

3.1. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI 38
3.2. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BARINMASI 38
3.3. DENEYE PROTOKOLÜ 39
3.3.1. Kolit Modeli Oluşturulması ve Nar Çekirdeği Yağı Tedavisi 39
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler 42
3.3.3. Kullanılan Cihazlar 43
3.3.4. Kan Örneklerinin Alınması 44
3.3.5. Doku Örneklerinin Alınması 44
3.4. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ 45
3.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER 46
3.5.1. Dokuda Miyeloperoksidaz Düzeyi Tayini 46
3.5.2. Serumda TNF α -IL 1β- IL 6 ve NFκB Ölçümü 46
3.5.3. Dokuda Malondialdehit Tayini 47
3.5.4. Dokuda Glutatyon Tayini 48
3.5.5. Dokuda Antioksidan ve Total Oksidasyon Düzeyleri 49
3.6. HİSTOLOJİK VE MAKROSKOBİK ANALİZLER 50
3.6.1. Histolojik İnceleme 50
3.6.2. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları 50
3.6.3. Makroskobik Değerlendirme 53
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 54
4. BULGULAR 55
4.1. AĞIRLIK DEĞİŞİM YÜZDESİ 56
4.2. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ 57
4.3. DOKUDA MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ 58
4.4. SERUMDA TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR α DÜZEYLERİ 59
4.5. SERUMDA İNTERLÖKİN 1B DÜZEYLERİ 60
4.6. SERUMDA İNTERLÖKİN 6 DÜZEYLERİ 61
4.7. SERUMDA NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B DÜZEYLERİ 62
4.8. DOKUDA MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ 63
4.9. DOKUDA GLUTATYON DÜZEYLERİ 64
4.10. DOKUDA TOTAL ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ 65
4.11. DOKUDA TOTAL OKSİDAN DÜZEYLERİ 66
4.12. HİSTOLOPATOLOJİK SONUÇLAR 67
4.13. MAKROSKOBİK BULGULAR 73
5. TARTIŞMA 74

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 82
KAYNAKLAR 85
EKLER 94

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin histolojik ve klinik özellikleri 5

Tablo 2.2: İnflamatuar bağırsak hastalıklarında bağırsak bakterilerindeki değişiklikler ... 11

Tablo 2.3: İnflamatuar bağırsak hastalığının endoskopik bulguları 22

Tablo 2.4: Anti-inflamatuar diyetin 5 temel bileşeni 29

Tablo 2.5: Punica granatum ağacının ve meyvesinin bileşenleri 32

Tablo 2.6: Nar çekirdeği yağının asit bileşimi 35

Tablo 3.1: Deney hayvanlarının gruplandırılması ve kısaltmaları 39

Tablo 3.2: Kimyasal maddeler ve kitler 42

Tablo 3.3: Cihazlar ve markaları 43

Tablo 3.4: Hastalık aktvite indeksinin skorlanması 45

Tablo 3.5: Malondialdehit deney protokolü 47

Tablo 3.6: Glutatyon tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması 48

Tablo 3.7: Kör numune dağılımı 49

Tablo 3.8: Doku takip aşamaları 50

Tablo 3.9: Hematoksilen ve Eozine boyama aşamaları 51

Tablo 3.10: Masson Trikrom boyama aşamaları 52

Tablo 3.11: Histomorfolojik değerlendirme 53

Tablo 3.12: Makroskobik hasar skorlaması 53

Tablo 4.1: Parametrelerin gruplar arası karşılaştırma 55

Tablo 4.2: Deney gruplarında ağırlık değişimlerinin karşılaştırılması 56

Tablo 4.3: Deney gruplarında hastalık aktivite indeksinin karşılaştırılması 57

Tablo 4.4: Deney gruplarında miyeloperoksidaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması. 58

Tablo 4.5: Deney gruplarında tümör nekroz faktörü α düzeylerinin karşılaştırılması 59

Tablo 4.6: Deney gruplarında interlökin-1β düzeylerinin karşılaştırılması 61

Tablo 4.7: Deney gruplarında interlökin 6 düzeylerinin karşılaştırılması 62

Tablo 4.8: Deney gruplarında nükleer faktör kappa B düzeylerinin karşılaştırılması 63

Tablo 4.9: Deney gruplarında malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması 64

Tablo 4.10: Deney gruplarında glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması 65

Tablo 4.11: Deney gruplarında total antioksidan düzeylerinin karşılaştırılması 66

Tablo 4.12: Deney gruplarında total oksidan düzeylerinin karşılaştırılması 67

Tablo 4.13: Deney gruplarının histopatolojik hasar skorlamasının karşılaştırılması 68

Tablo 4.14: Deney gruplarının makroskobik hasar skorlamasının karşılaştırılması 73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İnflamatuar bağırsak hastalığı patojenezinde rol oynayan faktörler 8

Şekil 2.2: İnflamatuar bağırsak hastalığına neden olan faktörler 14

Şekil 2.3: İnflamatuar bağırsak hastalığının tedavi seçenekleri 23

Şekil 3.1: Deney Akış Diyagramı 40

Şekil 3.2: Malondialdehit konsantrasyon grafiği 48

Şekil 4.1: Deney gruplarında ağırlık değişimleri 56

Şekil 4.2: Deney gruplarında miyeloperoksidaz aktivitesi 59

Şekil 4.3: Deney gruplarında tümör nekroz faktörü α düzeyleri 60

Şekil 4.4: Deney gruplarında interlökin- 1β düzeyleri 61

Şekil 4.5: Deney gruplarında interlökin-6 düzeyleri 62

Şekil 4.6: Deney gruplarında nükleer faktör kappa B düzeyleri 63

Şekil 4.7: Deney gruplarında malondialdehit düzeyleri 64

Şekil 4.8: Deney gruplarında glutatyon düzeyleri 65

Şekil 4.9: Deney gruplarında total antioksidan düzeyleri 66

Şekil 4.10: Deney gruplarının histopatolojik hasar skorlaması 68

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Rektal yoldan intra kolonik olarak kolit geliştirilmesi 41

Resim 3.2: Nar çekirdeği yağı suplementasyonu 41

Resim 3.3: Doku örneklerinin alınması 44

Resim 3.4: Alınan bağırsak dokuları 45

Resim 4.1: Kontrol grubuna ait bağırsak kesitleri 69

Resim 4.2: Ülseratif kolit grubuna ait bağırsak kesitleri 70

Resim 4.3: Ülseratif kolit+0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı grubuna ait bağırsak kesitleri 71

Resim 4.4: Ülseratif kolit+0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı grubuna ait bağırsak kesitleri 72

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA : Asetik asit

APC : Antijen sunan hücreler

CAT : Katalaz

CCR : C-C kemokin reseptörü

CH : Crohn hastalığı

CLA : Konjugelinoleik asit

CLnA : Konjuge a-linolenik asit

COX : Siklooksijenazlar

CRP : C-reaktif protein

DH : Dendritik hücreler

DTNB : 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit

EGCG : Epigallokateşin gallat

EN : Enteral nütrüsyon

FODMAP : Düşük fermente olabilen oligosakkarit, disakkarit, monosakkarit ve poliol

FOXP : Fox proteini

GSH : Glutatyon

HAİ : Hastalık aktivite indeksi

H2SO4 : Sülfirik asit

İBH : İnflamatuar bağırsak hastalığı

İBS : İrritabl bağırsak sendromu

İNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

IFN : İnterferon

IG : İmmunoglobülin

IL-1β **:** İnterlökin-1 beta

IL-6 **:** İnterlökin-6

IL- 8 **:** İnterlökin-8

IL-23R **:** İnterlökin 23 reseptöründe

KEN **:** Kısmi enteral nütrüsyon

MDA **:** Malondialdehit

MAPK **:** Mitojenle aktive olan protein kinaz

MDP **:** Muramil dipeptiti

MPO **:** Myeloperoksidaz

NADPH **:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz

Na2HPO4 **:** Disodyum fosfat

NÇY **:** Nar çekirdeği yağı

NF-κB **:** Nükleer faktör kappa B

NOD2 **:** Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı 2

NO **:** Nitrik oksit

NOS **:** Nitrik oksit sentaz

ÖEN **:** Özel enteral nütrüsyon

PN **:** Parenteral nütrüsyon

PRR **:** Patern tanıma reseptörleri

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

SOD **:** Süperoksit dismutaz

TAS **:** Total Antioksidan Durumları

TBA **:** Tiyobarbitürik asit

TBARS **:** Tiobarbitürik asit reaktif maddeler

TH **:** Yardımcı T

TGF **:** Dönüştürücü büyüme faktörü

TNF-α **:** Tümör nekroz faktörü-alfa,

TLR **:** Toll benzeri reseptörler

TOS **:** Total oksidan kapasiteleri

ÜK **:** Ülseratif kolit

5-ASA **:** 5-aminosalisilatların

ASETİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Sıçanlarda asetik asit ile oluşturulan deneysel akut kolit modelinde nar çekirdeği yağının tedavi edici etkisi, proinflamatuar sitokinler üzerine ve antioksidan etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 8 ila 12 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yürütülmüştür. Sıçanların her biri 8 denekten oluşacak 4 gruba (kontrol, asetik asit verilerek kolit oluşturulan grup, asetik asitle birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı grubu, asetik asitle birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı grubu) ayrılmıştır. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra kanda tümör nekroz faktör α, interlökin 1β, interlökin 6 ve nükleer faktör kappa B düzeyleri ve dokuda miyeloperoksidaz, total antioksidan ve oksidan durumları analiz edilmiştir. Malonaldehit, glutatyon tayinleri ve mikroskobik incelemeler de yapılmıştır.

Bulgular: Kolit grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede hasar bulgusu saptanmıştır. Serum interlökin 6, interlökin 1β ve tümör nekroz faktör α düzeyi kolit grubunda diğer gruplara kıyasla yüksektir($p<0,05$). Nar çekirdeği yağının 0,4 ml/kg ve 0,8 ml/kg suplementasyonu tedaviyi anlamlı şekilde gerçekleştirmiştir.

Sonuç: Akut ülseratif kolit tedavisinde nar çekirdeği yağının antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstererek proinflamatuar sitokinleri azaltıcı etkisi olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Deneysel Kolit, İnflamatuar Bağırsak Hastalığı, Nar Çekirdeği

INVESTIGATION OF THERAPEUTIC EFFECT OF POMEGRANATE SEED OIL IN ACETIC ACID-INDUCED EXPERIMENTAL COLITIS MODEL

ABSTRACT

Aim: It is aimed to evaluate the therapeutic effect of pomegranate seed oil, its effect on proinflammatory cytokines and its antioxidant effect in an experimental acute colitis model induced by acetic acid in rats.

Material and Methods: The study was carried on 8 to12 week old male Sprague-Dawley rats. The rats were divided into 4 groups, each consisting of 8 subjects (control, group in which colitis was induced by acetic acid, 0,4 ml/kg pomegranate seed oil group with acetic acid, 0,8 ml/kg pomegranate seed oil group with acetic acid). After the rats were sacrificed, tumor necrosis factor α, interleukin 1β, interleukin 6 and nuclear factor kappa B levels in the blood and myeloperoxidase, total antioxidant and oxidant status in the tissue were analyzed. Malonaldehyde, glutathione determinations and microscopic examinations were also performed.

Results: Significant damage was detected in the colitis group compared to the other groups. Serum interleukin 6, interleukin 1β and tumor necrosis factor α levels were found to be higher in the colitis group compared to the other groups ($p<0,05$). Supplementation of 0.4ml/kg and 0.8ml/kg pomegranate seed oil made the treatment significant.

Conclusion: In the treatment of acute ulcerative colitis, pomegranate seed oil has been found to have an antioxidant and anti-inflammatory effect, reducing pro-inflammatory cytokines.

Key Words: Experimental Colitis, Inflammatory Bowel Disease, Pomegranate Seed

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH), gastrointestinal sistemde kronik inflamasyon ile karakterizedir. Klinik ve patolojik özelliklerine göre ülseratif kolit (ÜK) veya crohn hastalığı (CH) olarak sınıflandırılır (1). CH, remisyonları ve alevlenmeleri olan kronik bir inflamatuar bağırsak hastalığıdır ve ağızdan anüse kadar tüm gastrointestinal sistemi etkileyebilir (2). ÜK ise rektumdan başlar ve tüm kolon segmentlerini tutabilir (3).

Hastalığın immün düzensizlik, değişen bağırsak mikroflorası, oksidatif stres, gastrointestinal mukozal bariyerdeki kusurlar ve artan geçirgenlik ile ilişkili olduğu düşünülür (4). Mukozal bariyer disfonksiyonu, bağırsak geçirgenliğine neden olarak lümen içeriğinin alttaki dokulara nüfuz etmesine neden olur. Bu durum makrofajlardan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler. Kazanılmış bağışıklık tepkisi de kronik inflamasyon oluşturarak kolon boyunca karakteristik İBH lezyonlarının gelişimine neden olur (5).

Bağışıklık tepkisi, hastalığın başlaması, ilerlemesi ve şiddetlenmesinde önemli bir rol oynar. Bağışıklık toleransı kaybı, farklı hücre tiplerinden salgılanan çeşitli proinflamatuar aracıları arttırarak inflamasyona açar (6). Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), lökotrien B4, trombosit aktive edici faktör, interlökin-1 beta (IL-1β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL- 8), nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi yüksek derecede aktif makrofajların varlığı, proinflamatuar aracıların aşırı üretimine ve serbest radikallerin oluşumunun artmasına neden olur (7).

Literatürde, İBH de dahil çeşitli inflamatuar hastalıklarda ve gastrointestinal hastalıklarda diyet polifenollerinin yararlı bir rolü olduğu bildirilir (8). Polifenoller, anti-inflamatuar ve antioksidan özellikler gösterdiği için İBH tedavisinde mevcut olan geleneksel terapötik stratejilere (yani steroidal olmayan anti-iflamatuvar ilaçlar) tamamlayıcı yaklaşımlar olarak katkıda bulunabilir (8). Polifenoller gibi fitokimyasallar, hücresel sinyalleşme süreçlerini modüle eder, anti-inflamatuar ve antioksidan aktivite gösterir ve bağırsak mikroflorasını değiştirir (9).

Nar (*Punica granatum* L.), yaşam, uzun ömür ve sağlık sembolü olarak bilinen en eski yenilebilir meyvelerden biridir (10). Nar, yüzyıllardır ÜK de dahil bir dizi

inflamatuar hastalıkta sağlık yararları sağlamak için kullanılmıştır (11). Nar, inflamasyon aktivitesini inhibe eden flavonoidlere, antosiyaninlere ve fenolik asitlere sahip olduğundan dolayı antioksidan ve anti-inflamatuar etki gösterir (12).

Nar suyu antosiyaninler, gallik asit, ellajik asit, kafeik asit, kuersetin, kateşinler açısından; nar çekirdekleri, yağ asitleri, punisik asit, ellajik asit ve steroller bakımından; nar kabuğu ise kateşin, yağ asitleri, punikalajin, kuersetin, flavonlar, gallik asit, flavanonlar, flavonoller ve antosiyanidinler açısından zengindir (13).

Nar çekirdekleri önemli antioksidan kapasiteye ve zengin kimyasal bileşime sahiptir (şekerler, çoklu doymamış yağ asitleri, vitaminler, polisakkaritler, polifenoller ve mineraller) (14). Nar çekirdeği yağı (NÇY), toplam tohum ağırlığının %12-20'sini oluşturur (15). NÇY fitosterol, tokoferol ve punisik asitten (% 55) zengindir (11). Trikosanik asit olarak da bilinen punisik asit, omega-5 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi ve konjugelinoleik asit (CLA) ve α linolenik asit ile yapısal benzerliklere sahip bir izomer konjuge a-linolenik asit (CLnA)'dir (16). Bu konjuge yağ asitlerinin, antioksidan, anti-tümör, immünomodülatör, anti-aterosklerotik ve serum lipit düşürücü etkileri bilinmektedir (17). Epidermal doku rejenerasyonunu desteklediği, in vivo bağışıklık sistemini güçlendirdiği, hepatik trigliseritlerin birikimini azalttığı ve hormonla ilişkili (prostat ve meme) ve kolon kanserlerine karşı kemopreventif aktivite gösterdiği bulunmuştur (18). NÇY'nin ayrıca, İBH, romatoid artrit ve koroner kalp hastalığı gibi çeşitli inflamatuar hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yararlı olabilecek nötrofil aktivasyonunu ve lipit peroksidasyonunu sınırlandırarak in vivo antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (19).

Deneysel kolit oluşturulan sıçanlarda nar suyu ve saflaştırılmış punikalajinin nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve kolon inflamasyonunda ekspresyonuna yol açan sinyal yolları üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmanın sonucunda hastalık kapsamını ve şiddetini önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmada TNF-α, IL-18 ve IL-1β'nin mRNA seviyelerinin azaldığı da gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda nar suyu ve ana bileşeni olan punikalajinin, İBH gibi inflamatuar bozuklukları kontrol etmek ve moleküler transkripsiyonel NF-κB'nin doğrudan inhibisyonunda kullanılabileceği bulunmuştur (11).

Nar çekirdeği yağında konjuge linolenik bir yağ asidi olan punisik asidin, in vitro TNF α kaynaklı nötrofil hiperaktivasyonu ve in vivo kolon inflamasyonuna etkisini

değerlendiren çalışmada punisik asit ve NÇY alımının, F2-izoprostan salımı ile ölçülen nötrofil aktivasyonunu ve reaktif oksijen türleri (ROS) / myeloperoksidaz (MPO) aracılı doku hasarını azalttığı ve kolon inflamasyonundan koruduğu bildirilmiştir (19).

Nekrozitan enterokolit oluşturulan sıçanlarda oral yoldan verilen NÇY'nin nekrozitan enterokolit insidansını %61'den %26' ya düşürdüğü saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda NÇY'nin gelişmekte olan bağırsak mukozası üzerinde güçlü bir anti-inflamatuar etki göstererek bağırsak epitelyal homeostazını iyileştirici etkisi saptanmıştır (10).

Daha önce yapılan çalışmalar, nar suyunun polifenolik özellikleri (11), nar bileşenleri (20) ve NÇY'nin kolitten koruyu etkisi (19) ile ilgilidir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda sıçanlarda asetik asit (AA) ile oluşturulan deneysel akut kolit modelinde NÇY'nin tedavi edici, pro-inflamatuar stokinler üzerine etkisi ve antioksidan etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI

İnflamatuar bağırsak hastalığı, bağışıklık tepkilerini etkileyen genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimden kaynaklanır (21,22). İBH bağırsakta kronik nükseden immünolojik bir bozukluktur (21). Kronik inflamasyon, nüks ve remisyon dönemleri ile karakterize olma eğilimindedir ve İBH son zamanlarda ilerleyici hastalıklar olarak değerlendirilir (23). İBH'nin pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar süreçlerde yer alan düzensiz molekül ekspresyonlarından kaynaklandığı düşünülür (24). Ek olarak disbiyoz, İBH'nin gelişiminde çok önemli bir rol oynar (21).

İnflamatuar bağırsak hastalığı, ÜK ve CH olarak sınıflandırılır (21,25,26). CH ve ÜK sindirim bozukluklarına ve gastrointestinal sistemde inflamasyona neden olur (21,27). Benzer hastalıklar gibi gözükseler de farklı ayırt edici özellikleri ve klinik tanımları mevcuttur (25). Tablo 2.1'de CH ve ÜK'nin histolojik ve klinik özellikleri gösterilmiştir (28).

Crohn hastalığı, ağızdan başlayıp anüse kadar bağırsağın herhangi bir bölümünde bulunabilen transmural iltihaplanma ile ilişkilidir (25). Genellikle terminal ileum, çekum, perianal bölge ve kolonda görülür, ancak bağırsağın herhangi bir bölgesinde de kesintili lezyonlar görülebilir (29). İleal tutulum ve ileokolonik tutulum hakimdir. Lamina propriadaki kazeözsüz granülom, çok çekirdekli dev hücrelerin varlığı, CH'ye özgüdür. Ayrıca normal mukozaya müdahale eden atlama lezyonları olarak bilinen sürekli olmayan inflamasyonlar da mevcuttur. Bu durumlarda perianal ve perioral lezyonlar da görülebilir (25).

Ülseratif kolit tipik olarak, rektumdan başlar ve proksimale devam eder, ince bağırsak tutulumu görülmez, tipik olarak mukozal inflamasyonla karakterizedir (30). Granülomlar görülmez ve inflamasyon genellikle bağırsağın diğer katlarını etkilemez (25). CH histolojik olarak kalınlaşmış bir submukoza, transmural inflamasyon, fissür ülserasyonu ve granülomlar ile ilişkiliyken, ÜK inflamasyonu, kriptit ve kript apseleriyle mukoza ve submukozayla sınırlıdır (29). CH ağzı, anüsü ve bağırsağın tüm katmanlarını

etkilerken ÜK, kolonun mukozal tabakasını etkiler. ÜK kolonun yalnızca en iç kısmında görülürken CH, bağırsak duvarının tüm katmanlarında meydana gelir (21).

Tablo 2.1: Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin histolojik ve klinik özellikleri (28)

	Crohn hastalığı	Ülseratif kolit
Lezyon bölgeleri	Gastrointestinal yolun herhangi bir bölümünü etkileyebilir,	Kolonla sınırlı
Dağılım modeli	Düzensiz	Sürekli
Mukozal inflamasyonun derecesi	Tüm duvar, transmural	Epitelyal mukoza ile sınırlı
Sık tutulan alan	İleum	Rektum
Perianal komplikasyonlar	Yaygın	Seyrek
Kanlı ishal	Daha az yaygın	Çok yaygın

2.2. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ

Kadın ve erkekte yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkan ömür boyu süren bir hastalıktır. Hastalığın görülme sıklığı ve yaygınlığı 20. yüzyılın ikinci yarısında önemli ölçüde artmış ve 21. yüzyılın başından bu yana, yeni sanayileşmiş ülkelerde insidansı hızlanan en yaygın gastrointestinal hastalıklardan biri olarak kabul edilir (29). Tarihsel olarak bu hastalıklar en çok beyaz ırkı, özellikle de Aşkenazi Yahudi mirasına mensup olanları etkiledi (31). Son yıllarda İBH insidansında küresel bir artış vardır (32). Epidemiyolojik araştırmalara göre Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde İBH daha yaygındır (27,33,34). 2017 yılı verilerinde dünya genelinde yaklaşık 7 milyon İBH vakası olduğu bildirilmektedir. (35). Kuzey Amerika'da iki milyondan fazla kişinin İBH ile yaşadığı tahmin edilmekte ve bu rakamın 2030 yılına

kadar dört milyona ulaşacağı düşünülmektedir (36). Avrupa'da ise yaklaşık 2 milyon insan bu hastalıktan muzdariptir (37). Asya ve Güney Amerika gibi ülkelerde de hastalığın görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (32,33,36). Bu ülkelerdeki artışın yaşam tarzı ve diyet alışkanlıklarının sanayileşme ve batılılaşma ile birlikte değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (33). Göçler de İBH riskini etkileyebilir. Düşük prevalanslı bölgelerden yüksek prevalanslı bölgelere göç eden insanların yüksek prevalanslı bölgelerde doğan çocukları İBH riski altındadır. (örneğin, Kuzey Amerika ve Birleşik Krallık'a göç eden Güney Asyalılar) (31,33,34). Ülkeler sanayileştikçe İBH görülme sıklığı artar. Benzer şekilde, şehir merkezlerinde yaşayanların, kırsal bölgelerde yaşayanlara göre hastalıktan etkilenme olasılığı daha yüksektir (31). Çeşitli etiyolojik teoriler, göç ve sanayileşmeyi İBH insidansı ve yaygınlığı ile ilişkilendirir (33).

Hem ÜK hem de CH benzer yaş ve cinsiyet dağılımlarına sahiptir (31). Çocuklar, ergenler ve genç yetişkinler bu hastalıktan etkilenmektedir (38). İBH tipik olarak 18 ila 35 yaş arasındaki bireylerde teşhis edilir (36). CH, hastaları yaşamlarının erken döneminde, ortalama 15 ila 25 yaşlarında etkilenme eğilimindeyken, ÜK'nin 25 ila 35 yaşları arasında ortaya çıkması daha olasıdır (31). Genellikle hastalık adölesan döneminde başlar ve İBH'li hastaların yaklaşık % 25'i 20 yaşın altındadır (21). Epidemiyolojik veriye göre, 20 yaşından küçük hastaların % 25-30'una CH tanısı konulurken, hastaların % 20'sine ÜK tanısı konulmuştur (21).

2.3. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI SEMPTOMLARI

Hastalığın doğal seyri, hafif semptomlardan hastaneye yatış, ameliyat ve sakatlık gibi şiddetli semptomlar şeklinde değişiklik gösterir. İBH çoğu hasta için nüks ve remisyon dönemleri içerir (38). İBH'de bağırsak mukozasının inflamasyonu, ülserasyona neden olan sitokinler, proteolitik enzimler ve serbest radikaller üreten nötrofil ve makrofajların akışı ile karakterize edilir (29). Bağışıklık sistemi uyarılır ve bağırsağın bir kısmında tahribat oluşur. Bu durum ağrı, ishal, ateş ve diğer semptomlara neden olur (21). Ayrıca semptomlar arasında pediatrik büyüme bozuklukları, anemi, karın ağrısı, kanlı ishal ve artritte görülebilir (21,25). CH ve ÜK bazı semptomlar açısından benzerlik gösterse de farklı semptomlara sahiptir. ÜK, dışkıda kan, şiddetli karın ağrısı ve ishal ile ilişkilidir (21). Çoğu hastada kanlı ishal görülür ve kanamanın şiddeti kolon tutulumunun derecesi ile ilişkilidir. Distal tutulum gösteren hastalarda kanlı mukus veya az miktarda taze kan bulunurken proksimal tutulum gösterenlerde kan dışkı ile karışır ve kanlı ishale

dönüşür (31). CH'li hastalarda ise kolon kanaması, akut bağırsak delinmesi, fistül, apse ve toksik mega kolon görülebilir (21). Hastalarda bağırsak zarar gördüğünden dolayı yetersiz beslenme ve kilo kaybı çok yaygındır (21,31). Bu hastalarda sindirim sisteminin etkilenen bölgelerine göre yetersiz beslenme değişiklik gösterir. CH'li hastalarda eksiklik olarak folat ve D vitamini mevcutken, demir yetersizliği ÜK'li bireylerde yaygındır (21,39).

Bu semptomlara ek olarak ekstraintestinal semptomlar da gelişebilir ve hemen hemen her organı etkileyebilir (40). En sık tutulum gösteren organlar, eklemler, deri, gözler, karaciğer ve safra yollarıdır. Bu ekstraintestinal semptomlar bağırsak hastalığının aynı patofizyolojik mekanizmasından veya İBH'nin ikincil bir komplikasyonu veya otoimmünite duyarlılığından kaynaklanabilir (41).

Bu semptomlar kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte, normal günlük aktivitelerin bozulması, okul veya işten ayrılma, beslenme bozuklukları ve psikolojik etkiler (depresyon ve anksiyete) gibi çok fazla morbiditeye yol açabilir (25).

2.4. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ PATOJENEZİ

Hastalığın etiyolojisi hala bilinmemekle birlikte, genetik ve çevresel faktörler, bağırsak bariyer fonksiyonunun düzensizliği, mukozal bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonu gibi bir çok faktör ile ilişkilendirilir (25,26,37). Örneğin genetik olarak riskli bir bireyde çevresel değişiklik florada değişikliğe ve düzensiz bağışıklık tepkisine neden olabilir (25). Şekil 2.1'de 'de İBH patojenezinde rol oynayan faktörler gösterilmiştir (42).

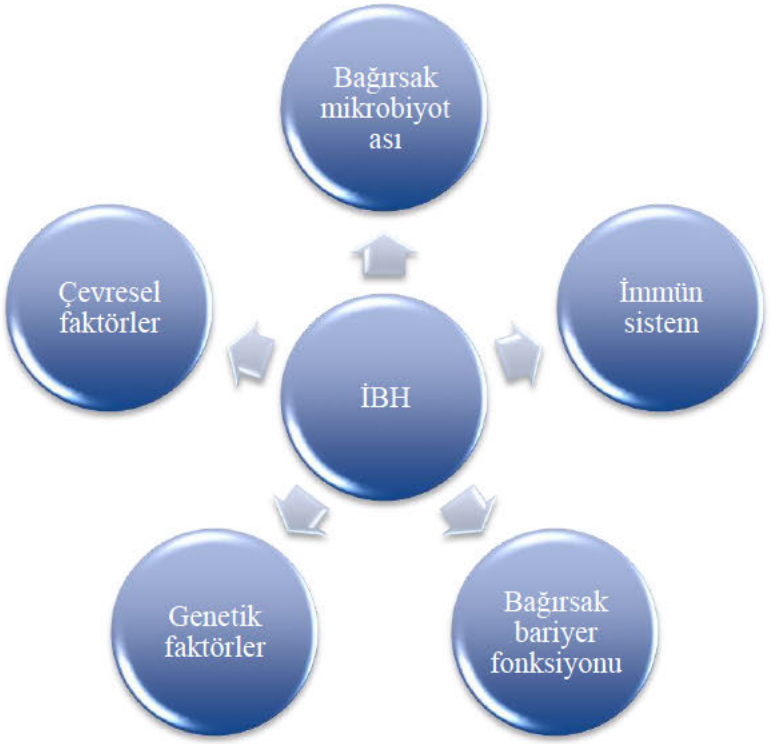
Hastalığın ana nedenleri için iki yaklaşım mevcuttur;

1. Mukoza sisteminin bozulması, insan mikrobiyotasındaki immünolojik yanıt oranını artırır.

2. Bağırsak florasının içeriğindeki herhangi bir değişiklik veya epitel fonksiyonunun bozulması, normal mukoza sistemindeki patolojik yanıtı uyarır (21).

Bu yaklaşımlara ek olarak 2 hipotez daha İBH ile ilişkilendirilir. İlk hipotez hijyen hipotezidir. Çocukları son derece hijyenik ortamlarda yetiştirmenin bağışıklık gelişimini olumsuz etkilediğini ve bu durumun onları yaşamın ilerleyen dönemlerinde İBH gibi immünolojik hastalıklara yatkın hale getirdiğini belirtir (33,43). Diğer hipotez ise, soğuk zincir hipotezidir. Bu hipotez *Yersinia* ve *Listeria* gibi psikrotrofik bakterilerin hastalığa

katkıda bulunduğunu öne sürer. Bu bakteriler CH lezyonlarında tanımlanmıştır (44). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, İBH'yi tetikleyen anormal immün yanıtlara duyarlılığı artırır. Bununla birlikte giderek artan sayıda kanıt, diyet faktörlerinin, İBH'yi tetikleyen ve devam ettiren mikrobiyom bileşimi ve epitel bariyer işlevi üzerinde etkili olduğunu da göstermektedir (33).



Şekil 2.1: İnflamatuar bağırsak hastalığı patojenezinde rol oynayan faktörler (42)

2.4.1. Genetik Faktörler

Hastalık doğuştan gelen bağışıklığı kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilir ve bu da inflamatuar yanıtta şiddetlenmeye yol açabilir (27). İBH patojenezinde, bariyer işlevi, epitelyal restitüsyon, mikrobiyal savunma, doğal immün regülasyon, kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesi, ROS, otofaji, , endoplazmik retikulum stresi ve hücresel hemostaz ile bağlantılı metabolik yolları ve mikrobiyal savunma yollarını etkilediğini gösteren 200'den fazla İBH risk lokusu olduğu bulunmuştur (37,43). Tanımlanmış ve sağlam bir şekilde çoğaltılmış lokusların çoğu, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları aracılığıyla tespit edilmiştir (45).

Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı 2 (NOD2), CH'si olan hastalarda sıklıkla mutasyona uğrayan, hastaların yaklaşık üçte birinde meydana gelen ve hastalıkla ilişkili olduğu bulunan ilk gendir (29). NOD2 geni, hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bağışıklık tepkilerini modüle eden peptidoglikan ürünü muramil dipeptiti (MDP) tanır (46). NOD2'nin MDP'yi tanıma özelliği ile bakteri bileşenlerinin hücre içi bir sensörü olarak önemli olduğu düşünülür (29). Bu molekülün tanımlanması, mukozal hemostazın sürdürülmesinde epitel bariyerinin rolünü ortaya çıkarmaktadır (37). NOD2, bakteriyel tanımayı takiben, ATG16L1 ile etkileşime de girerek otofaji mekanizmasının çekirdeklenmesi için moleküler yapı iskeleti görevi de görür (29). NOD2 mutasyonları ve ATG16L1 genindeki polimorfizmler, İBH'de önemli bir patojenik süreç olarak otofajiyi de ortaya çıkarır (37). Otofaji, sitozolik içeriklerin ve organellerin degradasyonunun yanı sıra enfeksiyona karşı direnci ve hücre içi mikroorganizmaların uzaklaştırılmasını içeren oldukça korunmuş bir geri dönüşüm mekanizmasıdır (47). MDP stimülasyonu, otofaji sürecini aktive ederek hücre içi bakterilerin otofagozomlar içinde hapsedilmesine ve enfeksiyonun kontrol altına alınmasına neden olur (29).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, interlökin 23 reseptöründe (IL-23R) CH ve ÜK ile yüksek ilişki çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi tanımlamıştır (29). İBH için genetik risk faktörleri, farklı popülasyonlar arasında değişiklik gösterir. Örneğin Afrika kökenli Amerikalılar ve Asya kökenli bireyler daha düşük ailevi riske sahiptir (48). Etki boyutunda heterojenlik (TNF-SF15 ve ATG16L'de olduğu gibi) veya risk alel frekansı (NOD2'de olduğu gibi) yalnızca birkaç popülasyona özgü risk lokusu oluşturur. (43). NOD2 ve IL23R varyantları, Avrupalı hastaların çoğunda mevcuttur, ancak Doğu Asya kökenli hastalarda mevcut değildir (49). Riskle ilişkili lokusların çoğu popülasyonlar arasında paylaşılır, ancak bazı lokuslar popülasyonlar arasında heterojenite gösterir (29). İBH hastalarının birinci derece akrabalarının hastalığa yakalanma riski, etkilenmemiş bireylere kıyasla beş kata kadar daha yüksektir (37). Aşkenazi Yahudilerinin birinci derece akrabalarda İBH varlığı, Yahudi olmayanlara göre en az 2 kat daha yüksek bulunmuştur (43).

Birçok birey İBH ile ilişkili risk lokuslarını taşımasına rağmen, sadece küçük bir popülasyon İBH geliştirir. Bu nedenle, İBH'nin gelişmesinde çevresel faktörler, bağırsak mikrobiyotası ve mukozal bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimlerde oldukça etkilidir (29).

2.4.2. Çevresel Faktörler

Genetik yatkınlık, hastalık insidansındaki varyansı tam olarak açıklayamaz, bu da çevresel faktörlerin güçlü bir rolü olduğunu düşündürür. Çevresel maruziyetlerin İBH'li bireyler üzerinde değişken etkileri olduğu bilinir (50). Diyet, sigara, ilaç kullanımı, stres gibi çevresel faktörler hastalık riskini etkileyebilir. Ayrıca dış çevresel maruziyetler bağırsak mikrobiyomunu etkileyerek bağırsak geçirgenliğini arttırır ve bağışıklık tepkilerini modüle eder. Bu durum da yaşam boyunca hastalığın riskini ve doğal seyrini değiştirir (51).

2.4.2.1. Bağırsak mikrobiyotası: İnflamatuar bağırsak hastalığının, koruyucu ve zararlı bakteriler arasındaki disbiyoz yoluyla gelişebileceği bilinmektedir (21). Disbiyosiz, faydalı bakteri türlerinde azalmayla birlikte patojenik bakterilerde artış olarak tanımlanır (55). Genel olarak, İBH hastalarında mikrobiyal çeşitlilikte ve bağırsak mikrobiyotasının stabilitesinde azalma mevcuttur (45). İBH hastaları sağlıklı bireylere kıyasla anti-inflamatuar bakterilerde azalma ve inflamatuar bakterilerde artışa sahiptir (37). En sık gözlemlenen değişiklikler arasında Firmicutes'de azalma ve Proteobacteria ve Bacterioidetes'de artış yer alır. (56). Tablo 2.2'de İBH'de bağırsak bakterilerindeki değişiklikler gösterilmiştir (57). Bu mikrobiyata değişimi kısa zincirli yağ asitlerinin üretiminde azalmaya yol açarak, T-düzenleyici hücre ve epitel hücre fonksiyonunu bozabilir. Ek olarak mukolitik bakterilerdeki artış, epitel bariyerinde bozulmaya ve Proteobacteria gibi bağırsak epiteline yapışan bakterilerde bir artışa yol açar. Bu durum bağırsak geçirgenliğini etkiler (31). CH hastalarının dışkı mikrobiyota analizi, anti-inflamatuar Faecalibacterium prausnitzii, Bifidobacterium adolesecentis, Dialister invisus ve bilinmeyen bir Clostridium kümesi XIVa türünün varlığının azaldığını, proinflamatuar Ruminococcus gnavus varlığının arttığını göstermiştir (58). Escherichia coli'nin artan konsantrasyonları ileal CH'de bildirilmiştir. E. coli, İBH hastalarında kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu hastalarda yeni bir patojenik grup olan yapışık-invazif E. coli belirlenmiştir. İBH hastalarının ileal mukozasında anormal yapışık-invazif E. coli kolonizasyonu mevcuttur (45). Bağırsak epiteline yapışma kabiliyeti ile patojenik bakterilerin artması, bağırsağın geçirgenliğini etkiler, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini ve bileşimini değiştirir ve inflamatuar genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, inflamatuar yanıtları indükleyerek bağırsak inflamasyonuna neden olur (56).

Başka bir yapışkan, istilacı protobakteriler, *Campylobacter concisus* da İBH ile ilişkilendirilmiştir. *C. concisus* istilası, zar geçirgenliğini etkiler ve konakçı epitel hücrelerinde inflamasyona neden olur. Bunların yanı sıra bağırsak inflamasyonuna başka enterik bakteriyel patojenler de neden olabilir. Örneğin *Clostridium difficile* toksin A, akut inflamasyon ve sıvı sekresyonu ile ilişkilidir. Toksin A, enterosit apoptozuna ve inflamasyona neden olabilir, böylece İBH'yi yeniden aktive edebilir (59,60).

Tablo 2.2: İnflamatuar bağırsak hastalıklarında bağırsak bakterilerindeki değişiklikler (57)

İBH'de Artış	**İBH'de Azalış**
Proteobacteria	***Bacteroidetes***
• *Enterecocus*	• *Bacteroides*
• *Escherichia koli*	• *Prevotella*
Actinobacteria	***Firmicutes***
	• *Faecalibacterium*
	• *Roseburia*
	• *Blautia*
	• *Ruminoccocus*
	• *Coprococcus*
	Actinobacteria
	• *Bifidobacterium*

Bağırsak mikrobiyotasının bozulmasından etkilenen metabolitlerin üretimi de İBH patojenezi ile ilişkilidir. *F. prausnizzi* ve *Clostridium* kümeleri IV, XIVa, XVIII gibi bütirat üreten bakterilerin miktarının değişmesine bağlı olarak İBH hastalarında kısa zincirli yağ asitlerinin konsantrasyonunda azalma bildirilmiştir (61). Kısa zincirli yağ asitlerinin azalan üretimi, Treg hücrelerinin farklılaşmasını, genişlemesini ve bağırsak homeostazının korunmasında önemli bir rol oynayan epitel hücrelerinin büyümesini olumsuz etkiler (62). Öte yandan, *Desulfovibrio* gibi sülfat azaltıcı bakteri sayısı da İBH hastalarında daha yüksektir, bu da bağırsak epitel hücrelerine zarar veren ve mukozal inflamasyonu indükleyen hidrojen sülfat üretimiyle ilişkilendirilir (37). Bağırsak

homeostazının sürdürülmesinde önemli bir role sahip olan kommensal mikroorganizmalar doğuştan gelen bağışıklıkta ve bağırsak bütünlüğünde kritiktir. Bu etkileşimlerin dengesizliği, bağırsakta inflamasyonun gelişmesine katkıda bulunur ve İBH patojenezi ile ilişkilendirilir (29,45).

2.4.2.2. Diyet: Besin tüketimi de İBH'nin gelişimini etkileyen önemli çevresel faktörlerdendir (29). Diyet, bağırsak mikrobiyomunda değişiklikler, mukozal bağışıklık sistemi ve epitel bariyer işlevi dahil olmak üzere birçok mekanizma ile bağırsak inflamasyonunu etkileyebilir (33). Diyet, bağırsakta yaşayan organizmalar aracılığıyla metabolitlerin üretimini etkiler ve bu küçük moleküller, inflamasyon sürecini başlatabilir (63). Bununla birlikte diyet antijenleri bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilir. Örneğin, Toll benzeri reseptörler (TLR) 2 ve 4 gibi doğuştan gelen bağışıklık reseptörleri doymuş yağ asitleri tarafından aktive edilebilirken, omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri ise bu reseptörleri inhibe edebilir (64). Beslenme, gastrointestinal sistemin mukoza tabakası üzerinde doğrudan da bir etkiye sahip olabilir (65). D vitamininin anti-inflamatuar yollarda rol oynadığı ve bağırsak inflamatuar yanıtı baskıladığı bilinmektedir. Demir, serbest radikallere neden olarak bağırsak inflamasyonunu arttırır ve hücresel hasar ve proinflamatuar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar. İnvazif bakteri türleri, inflamasyonu teşvik etmek için demir kullanabilir (66).

Sanayileşme ve batılılaşma ile birlikte yaşam tarzı ve diyet alışkanlıklarının değişmesi İBH gelişimini etkilemiştir (33). Yağ, rafine şeker ve et tüketiminin artması, sebze, meyve ve posa tüketiminin azalması İBH gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (33,67). Meyve ve sebze tüketimi, CH riskini azaltabilir (29). Ayrıca düşük posa tüketimi, mikrobiyota çeşitliliğinin azalmasıyla da ilişkilendirilmektedir (32). Bitki polisakkaritlerinin ve zayıf sindirilebilir bitki liflerinin kolit şiddetini kontrol etmede rol oynadığı bilinmektedir. Lifler kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini arttırarak kolit şiddetini azaltır. Bu yağ asitleri, kolonik hücreler için enerji kaynağı görevi görür ve T-düzenleyici hücrelerin üretimini artırarak bağışıklık toleransını uyarabilir (63). Racine ve ark. (68) çalışmalarında yüksek şeker ve meşrubat tüketimi ile düşük sebze tüketiminin artmış ÜK riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada çoklu doymamış yağ asitleri alımının CH riski ile pozitif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (69). Omega-6 yağ asitleri proinflamatuar özellik gösterirken, omega-3 yağ asitleri ise IL-1βa, TNF-α ve IL-6 salınımlarını azaltarak güçlü anti-inflamatuar özellikler sergiler (70). Omega-3

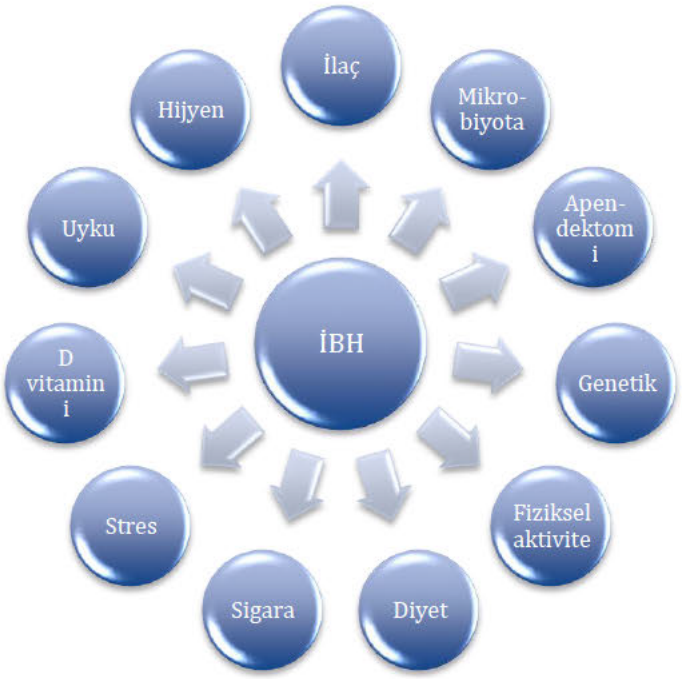
çoklu doymamış yağ asitlerinin tüketiminin azalması ve diyetle alınan omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerinin artması, artan ÜK riski ile ilişkilendirilir (71). Omega-3 alımı CH riskini azaltabilir veya riski üzerinde hiçbir etki göstermeyebilir (72). Omega-3'ün tam aksine, omega-6 alımı CH ve ÜK ile pozitif olarak ilişkilendirilir (73), ancak yakın tarihli bir prospektif çalışmadan elde edilen veriler bu bağlantıyı desteklememektedir (74). Başka bir çalışmada da yağ ve şeker açısından zengin fast food alımının CH gelişimini şiddetlendirebileceği gösterilmiştir. Ayrıca batı diyetlerinde yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin bağırsak inflamasyonunu arttırabileceği gösterilmiştir (29). Son zamanlardaki meta analizlerin bir şemsiye incelemesinde, sükroz, alkolsüz içecekler ve kırmızı et tüketiminin İBH oluşma riskini artırdığını, yüksek lif ve çay tüketiminin ise sırasıyla ÜK ve CH gelişimini engellediği bildirilmiştir (26).

2.4.2.3. Sigara: Sigara da İBH gelişimini etkileyen çevresel risk faktörlerinden biridir (34). Sigaranın ÜK ile negatif, CH ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (34). Sigara içmek düz kas tonusunu değiştirebilir, nitrik oksit üretimi yoluyla endotel fonksiyonunu etkileyebilir veya bağırsak mukoza bariyerinin bütünlüğünü bozabilir. Ayrıca oksidatif stresi arttırabilir ve mikrobiyotayı etkileyerek İBH ile ilişkilendirilir (44). Sigara hücresel ve humoral immün tepkilerini etkiler ve kolonik mukus üretimini arttırır. Sigarada bulunan nikotin, yardımcı T (Th) 2 hücre fonksiyonu üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir, fakat Th1 hücre fonksiyonu üzerinde hiçbir etki göstermez (29)

2.4.2.4. Diğer çevresel faktörler: İlaç kullanımı, özellikle antibiyotik kullanımı İBH riskinin artması ile ilişkilendirilir (37). İlaç kullanımının Batı ülkelerinde yaşayan bireyler arasında İBH riskini arttırdığı gözlenmiştir (43). Bu etkinin bağışıklık hücresi gelişiminde kritik bir rol oynayan mikrobiyota çeşitliliğinin değişmesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (75). Ayrıca anti-kontraseptifler ve statinler gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar da iki kata kadar artmış CH ve ÜK riski ile ilişkilendirilen ilaçlardır (37). Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların prostaglandin üretiminin azaltılması yoluyla bağırsak mukozasına doğrudan zarar vererek İBH'nin ilerlemesini tetiklediği düşünülmektedir (45).

Doğum şekli, emzirme, evcil hayvanlara maruz kalma ve enfeksiyonlar ("hijyen hipotezi") da bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek İBH gelişimini etkileyen faktörlerdendir (43,76). Bununla birlikte apendektomi, D vitamini konsantrasyonları, stres ve depresyon da hem hastalığın başlangıcı hem de nüks ile ilişkili risk faktörleri

olarak değerlendirilir (77). Şekil 2.2'de İBH gelişimini neden olan faktörler gösterilmiştir (74).



Şekil 2.2: İnflamatuar bağırsak hastalığına neden olan faktörler (74)

2.4.3. İmmünolojik Anormallikler

İnflamasyon, doku hasarına ve enfeksiyona karşı oluşan karmaşık bir biyolojik yanıttır. Kronik inflamasyonun bir dizi bozukluğun başlangıcında ve gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Kronik inflamatuar hastalık, kalıcı inflamasyonun hastalık patolojisinde merkezi bir rol oynadığı durumlar için kullanılan genel bir terimdir (78).

Oksidatif stres ve anormal bağışıklık tepkisinin, İBH'deki kronik inflamasyonun başlamasında ve yayılmasında rol oynadığı öne sürülmüştür (11). CH ve ÜK patojenezinde, immün yanıt hücreleri oldukça önemlidir (79). İBH'deki immünolojik düzensizlik, epitel hasarı, bağırsak inflamasyonunun artması, T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler (DH) ve nötrofiller dahil olmak üzere lamina propriaya sızan çok sayıda hücre ve inflamatuar tepkiyi kontrol etmek için oluşan bağışıklık düzensizliği ile karakterizedir (29). İBH hastalarında, inflamasyon bölgeleri antijen sunan hücreler (APC) ve sitokin üreten makrofajlar bakımından zengindir (42). Aktifleştirilmiş

lamina propria hücreleri, TNF, IL-1β, interferon (IFN)-y ve IL-23/Th17 yolaklarının sitokinleri dahil olmak üzere lokal dokuda yüksek seviyelerde pro-inflamatuar sitokinler üretir (80,81).

Bağırsak bağışıklık sistemi, doğuştan gelen bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılır. Doğuştan gelen bağışıklık, bağırsak mukozasının bariyer işlevini, antibakteriyel proteinleri, mikrobiyal büyümeyi sınırlamak için midenin asit pH değerini, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini, sitokinleri ve molekülleri içerir. Kazanılmış bağışıklık ise patojene özgüdür ve genellikle doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin bir patojenin uyarılmasını engelleyemediği durumlarda başlatılır (82).

2.4.3.1. İnflamatuar bağırsak hastalığı ve doğal bağışıklık: Çeşitli doğal bağışıklık hücrelerinin İBH patojenezine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Nötrofiller, epitelyal bariyer fonksiyonunun bozulması ve çoklu inflamatuar mediyatörlerin salınımı yoluyla inflamasyon oluşması, ROS ve antimikrobiyal aktivite gibi bağırsak bağışıklık sistemi İBH ile ilişkilendirilir (27,83). Bağırsak florasına karşı bağışıklık yanıtının başlatılması kontrollü bir şekilde düzenlenir. Bu düzenleme bağışıklık toleransının veya inflamasyon tepkisinin oluşumunu belirler. (84). Bağırsak mukozası, lümen içeriği ile fonksiyonel bir denge içinde bulunur ve bu dengenin bozulması İBH gibi patolojilere yol açabilir. Bağırsak epitel hücreleri ve doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden oluşan bağırsak bariyeri, lümen içeriği ve mukoza arasındaki bu dengeyi korur (37). Bağırsak mikrobiyomu da mukozal bağışıklıkta oldukça önemlidir (27). Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından elde edilen veriler, E-cadherin, guanin nükleotid bağlayıcı protein α 12 ve Zonula occludens-1 gibi birleşik proteinleri kodlayan genlerde duyarlılık polimorfizmleri tespit edilerek epitelyal bariyer kusurlarının İBH ile ilişkili olduğunu göstermektedir (85).

Bağırsak epitelini, sütunlu hücreler, goblet hücreleri, Paneth hücreleri, M hücreleri, endokrin hücreler ve lökositler gibi farklı hücre türleri oluşturur (27,37). Defektif epitel bariyeri ve artmış bağırsak geçirgenliği hem CH hem de ÜK olan hastalarda yaygındır. Goblet hücreleri, hem mukozal savunma için hem de mukozal onarım için gerekli olan epitelyumu kaplayan mukus matrisini üretir (84). Başka bir goblet hücresine özgü protein olan RELMβ, Th2 bağışıklığını yönlendirir ve lüminal antijenleri tolerojenik DH kümelerine iletir ve bağışıklık sistemi ile bir köprü oluşturur. Paneth hücreleri ise ince bağırsak kriptalarının tabanında bulunur ve kript

homeostazından, bağırsak kök hücre nişinin korunmasından ve mikrobiyota ile mukoza arasındaki dengeyi kontrol eden antimikrobiyal efektörlerin salgılanmasından sorumludur (37).

Epitel hücreleri, bakteri istilasına karşı fiziksel bir bariyer oluşturmanın yanı sıra, defensinleri içeren bir dizi bakteri öldürücü madde salgılayabilir. Bu ajanlardan bazıları yapısal olarak üretilirken bazıları da, epitel hücrelerinde hem hücre içi hem de hücre dışı olarak ifade edilen patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından bakteriyel bileşenlerin tanınmasıyla indüklenir (84). PRR'ler, doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarır, pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indükler ve patojenleri ortadan kaldırmak ve hasarlı dokuyu onarmak için inflamatuar yanıta aracılık eder (86). PRR, doğuştan gelen ve kazanılmış immün yanıtlar arasındaki çapraz iletişimde de önemli bir rol oynar (84).

Paneth hücre biyolojisindeki kusurların artmış CH riski ile ilişkili olduğu bildirilmektir. (37). NOD2 ve otofaji, Paneth hücre fonksiyonunu bozarak kolite neden olan önemli genetik risk faktörlerindendir. NOD2 risk varyantları, bozulmuş antimikrobiyal fonksiyonlara neden olan Paneth hücrelerinde daha düşük α-defensin seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (87). NOD2 geni, bakteriyel peptitleri tespit ederek bağışıklık yanıtlarını düzenler. Bu gendeki mutasyon CH'de predispozan bir faktördür. Ayrıca NOD2 mutasyonlarının NF-κB aktivasyonunun azalmasına da neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum antibakteriyel ajan üretiminin azalmasına ve patojenik mikrobiyal invazyona neden olabilir (88). NOD2'deki fonksiyon kaybı, TLR 2 stimülasyonunun inhibisyonuna neden olarak inflamatuar yolların aktivasyonuna ve aşırı Th-1 yanıtlarına yol açabilir. Bununla birlikte IL-10 ekspresyonunu inhibe ederek yetersiz immün regulasyonu oluşturabileceği de düşünülmektedir (84). CH risk lokusu sadece NOD2 aracılığı ile değil, aynı zamanda ATG16L1 aracılığı ile de otofajide Paneth hücrelerinin işlevini olumsuz etkileyebilir (89).

Doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık arasındaki çapraz etkileşimi düzenlemede IL-23 önemli bir sitokindir ve mikroorganizmalara karşı erken tepkilerin yönlendirilmesinde merkezi bir role sahiptir (84). IL-23 reseptörünün spesifik alt birimini kodlayan IL-23R genindeki tek nükleotid polimorfizmleri hem CH hem de ÜK ile ilişkilendirilmektedir. Bu durum IL-23 ekseninin kronik bağırsak inflamasyonunda ortak bir inflamatuar yolu temsil edebileceğini düşündürmektedir (29).

Sağlıklı bir homeostaz ve savunma mekanizması için mukozal bağışıklık hayati önem taşır. Mukozal bağışıklıkta DH'ler, makrofajlar, efektör CD4+ veya CD8+ T hücreleri ve Treg hücreleri gibi lökositleri oldukça önemlidir (27). DH'lerin, İBH'li hastaların bağırsaklarındaki lamina propriada biriktiği gösterilmiştir (31). Mukozal DH'ler, T hücreleri ve B hücreleri, bağırsak epitelyumu ve stroma ile etkileşime girerek mukozal homeostazın korunmasına katkıda bulunur (83). DH'ler, retinoik asit, timik stromal lenfopoietin ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) -β üreten bağırsak epitel hücrelerinden etkilenir ve anti-inflamatuar tepkilerin oluşmasını uyarır (85).

Hastalığın patojenezi, C-C kemokin reseptörü (CCR) 7, CCR4, CCR5, αEβ7 integrin, α4β7 integrin, CD62 L ve CCR9 dahil olmak üzere göç veya homing ile ilgili reseptörler ile ilişkilidir. Treg hücreleri tarafından ifade edilen bu reseptörler, bağırsak immünolojik homeostazında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, Treg hücrelerinin bağırsağa eksik göçü, bahsedilen reseptörlerin kusurlu ekspresyonuna katkıda bulunur ve İBH gelişimine yol açar (27).

Bağırsak inflamasyonu sırasında salgılanan proinflamatuar sitokinler TNF veya IFN-y, sıkı bağlantıları düzenleyerek ve apoptozu teşvik ederek epitel geçirgenliğini arttırabilir (29). IFN-γ, paraselüler geçirgenliği arttırır ve sıkı bağlantılı transmembran proteinlerinin endositozunu indükler. İBH hastalarında makromoleküllere artan geçirgenlik olduğu bulunmuştur (84).

2.4.3.2. İnflamatuar bağırsak hastalığı ve kazanılmış bağışıklık: Doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin aksine, kazanılmış bağışıklık sistemi oldukça spesifiktir. Bu durum uzun süreli bağışıklık ve antijen için özgüllük sağlar (84). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, inflamatuar tepkileri indüklerken, kazanılmış bağışıklık sistemi, İBH'de görülen kronik inflamatuar olayların ilerlemesinde merkezi bir rol oynar (85). Mikrobiyal ürünlerle karşılaşıldığında, DH'ler ve diğer antijen sunan hücreler, lokal ve dolaşımdaki lenfositlerin farklı alt kümelerini aktive eder ve inflamasyonun efektör bölgelerine göç edilebilmesi için pro ve anti-inflamatuar sinyaller dizisini başlatır. Lökositlerin inflamasyonlu bağırsağa göçü, lökosit yüzeyinde bulunan integrin moleküllerinin hücresel adhezyon moleküllerine bağlanmasıyla gerçekleşir (90). Bu hücreler, mukozadaki inflamatuar sinyaller ile lökositleri, inflamasyonun oluştuğu bölgelere çekmek için kemokinler üretebilir (37). ALβ2, α4β1, α4β7 ve αEβ7 integrinleri, farklı adezyon molekülleri ile etkileşime girebilen heterodimerik reseptörlerdir (90).

Kazanılmış bağışıklık yanıtının önemli bileşenleri T hücreleridir. Th 0 hücreleri aktive olabilmesi, Th1, Th2 veya Th17 hücrelerine farklılaşabilir. Bu durum belirli patojenlerin temizlenmesine katkıda bulunan önemli bir süreçtir (84). Aktive edilmiş T hücresi alt kümelerinin anormal gelişimi ile düzensiz bir T hücresi tepkisi oluşur. Bu durum hem kazanılmış hem de doğuştan gelen bağışıklık üzerine birden fazla patojenik etkiye sahip olan sitokinin ve kemokinin aşırı salımı ile inflamasyonun başlamasına neden olur (37,84). IL-12 ve IL-27 tarafından uyarılmış Th1 hücreleri, aşırı miktarda IFN-y, TNF ve IL-2 üretirken, Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5 ve IL-13'ü üretir. (85). Th1 ve Th2 alt kümelerinin bağışıklık dengesizliğinin İBH gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CH'nin patolojisi, yüksek seviyelerde TNF -α, IFN -γ ve dokuya sızan Th17 hücrelerinin aracılık ettiği Th 1 yanıtı ile karakterize edilirken ÜK patolojisi, yüksek seviyelerde Th17 hücrelerinin aracılık ettiği atipik Th2 tepkisi ile karakterize edilir (45).

Bir T hücresi alt kümesi olan Th17 hücreleri, büyük miktarlarda IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 üretimi ile karakterizedir. Th17 hücreleri, IL-6 ve TGF kombinasyonu ile indüklenir ve büyümeleri IL-23 tarafından desteklenir (91). Hem CH hem de ÜK hastalarının mukozasında Th17 hücrelerinin arttığı bilinir (85). Ayrıca Th17 proinflamatuar sitokini olan L-17A, hem CH hem de ÜK hastalarının mukozasında ve serumunda artmış IL-21 ve IL-23 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (92). Bu sitokinler nötrofillerin ve ek Th17 hücrelerinin inflamasyon bölgesine toplanmasını uyararak, inflamasyonu şiddetlendirir (85). Bozulmuş T hücresi yanıtları, bağırsak antijenlerine toleransı azaltarak ve kommensal mikrobiyotaya karşı immunoglobülin (Ig) G ve Ig A salgılanmasını teşvik ederek mukozal bariyerin bozulmasına katkıda bulunur (29).

Fox proteini (Foxp) 3 ekspresyonu ile karakterize olan Treg hücreleri, Th 0 hücre proliferasyonunu baskılayabilen T hücreleri olarak tanımlanabilir. Treg, ortak floraya veya diyet antijenlerine karşı anormal immün yanıtlarını baskılayarak bağırsak mukozal homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynar (84). Treg, anti-inflamatuar sitokinler olan IL-10 ve TGF-β'yi üreterek ve diğer tolerans mekanizmalarından kaçan T hücrelerinin hem aktivasyonunu hem de efektör işlevini önleyerek etki gösterir (85). IL-10, DH'ler ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri üzerinde immünosupresif etki gösterir, bu hücrelerin efektör T hücrelerini uyarma yeteneklerini inhibe eder ve STAT3 aktivasyonu yoluyla Treg'lerin proliferasyonunu indükler (93,94). Ayrıca IL-6

ile uyarılan Treg'in Foxp3 ekspresyonunu baskılayabildiği ve IL-17'yi eksprese edebildiği, böylece Th17 benzeri hücrelerin fenotipini elde ettiği bildirilmiştir (84).

İnflamatuar bağırsak hastalığı inflamasyonunun, kazanılmış immün yanıtı etkileyebilecek anti-inflamatuar süreçlerdeki kusurlardan da kaynaklandığı görülmektedir. Farklı proinflamatuar T hücre tipleri tarafından salınan sitokinler, İBH hastalarının iltihaplı mukozasındaki lezyonların merkezi aracılarıdır. Özellikle, Th1 hücreleri tarafından üretilen IFN γ, enterosit apoptozunu indükler ve aktive edilmiş mukozal makrofajlar tarafından TNF- α salınımını tetikler (95). TNF- α doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerini birbirine bağlar ve İBH'nin patojenezinde hayati bir öneme sahiptir (96).

2.4.4. Oksidatif Stres

Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, inflamatuar yanıtlarla sıkı bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle, İBH'nin yayılması ve alevlenmesi ile ilişkilendirilir (97). ROS ve Reaktif nitrojen türlerinin birikimi, hücre büyümesi veya farklılaşması ile ilgili spesifik genlere zarar verebilir ve antioksidan enzim seviyelerinde değişikliklere neden olabilir. Oksidatif stres ROS seviyelerini arttırır ve inflamasyonlu mukozada antioksidan seviyelerini azaltır. Bu durum da İBH hastalarında kronik doku hasarına katkıda bulunabilir (98). Peroksidazlar, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH), ksantin oksidaz, lipoksijenazlar, glukoz oksidaz, MPO, nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenazlar (COX) gibi çoklu enzimler kimyasal reaksiyonları katalize ederek endojen ROS oluşumuna katılır (99). Hücresel homeostazın korunması için prooksidanların aktivitesinin antioksidanlar tarafından dengelenmesi gerekir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, peroksiredoksinleri, paraoksonaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler, glutatyon (GSH), ürik asit, sistein, bilirubin, karotenoidler ve A, E ve C vitaminleri gibi serbest radikal süpürücüleri antioksidan mekanizmalar olarak değerlendirilir (97). Hem immün hem de immün olmayan hücreler, inflamasyonlu mukozada nitrik oksit (NO) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) düzeylerinin artmasına ve ayrıca oksidatif stresin diğer belirtilerine (örneğin, artan lipid peroksidasyonu ve miyeloperoksidasyon) neden olur. İnflamatuar ortamda NO, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek, peroksinitrit üretimi yoluyla oksidatif doku hasarına neden olabilir (42). Oksidatif stres, bağırsak mukozasındaki kronik

inflamasyonun bir sonucu olmaktan ziyade İBH'nin başlaması, ilerlemesi ve ciddiyetinde potansiyel bir patojenik ve kritik faktör olarak düşünülür (99).

2.5. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ TANISI VE TEDAVİSİ

Hastalığın tedavisinde erken teşhis çok önemlidir. CH'de gecikmiş tanı, bağırsak hasarı ve fibröz gibi komplikasyonlara neden olurken ÜK'de erken tanı ve tedavi, kolorektal kanser riskini ve ameliyat ihtiyacını azaltır (38). CH ve ÜK klasik semptomlarla ortaya çıkabilse de bu semptomlar gastrointestinal enfeksiyonlar (kanlı ishale yol açan) veya irritabl bağırsak sendromu (İBS) (ağrı ve ishale yol açan) gibi hastalıklarla karıştırılabilir. Bir birey kronik gastrointestinal semptomlarla başvurduğunda, mevcut olabilecek diğer durumları dışlama ve inflamatuar değişikliklerin varlığını tanımlamak önemlidir (25). İBH'yi tedavi etmek için tedaviye başlamadan önce hastalığın tipinin belirlenmesi önemlidir. Hastanın klinik semptomları dikkatlice incelenerek ve çeşitli testler yapılarak, hastalığın ciddiyeti ve hastalıktan etkilenen alanlar belirlenmelidir (21). Bu yüzden de klinik değerlendirmelere ve testlere ihtiyaç vardır (21). Hastalığı teşhis etmek için klinik, endoskopik, histolojik ve radyolojik testler kullanılır. (21). İBH'nin araştırılması ve teşhisi için öncelikle ayrıntılı bir geçmiş ve fizik muayene gerekir (31). İlk testlerin sonuçlarıyla, ileo-kolonoskopi ve üst gastrointestinal endoskopi, mukozal biyopsilerin histolojik analizi ve radyolojik incelemeler (özellikle ince bağırsağı standart endoskopik tekniklerin erişemeyeceği bir yerde incelemek için) değerlendirilir (25).

Kan testleri, beyaz hücre sayımlarını, C-reaktif protein (CRP) seviyelerini veya eritrosit sedimantasyon oranlarını gösterebilir (100). CRP, inflamasyon ile ilişkili kan belirtecidir (31). Nötrofillerden elde edilen sitoplazmik bir ürün olan fekal kalprotektin, İBH'yi fonksiyonel gastrointestinal bozukluklardan ayırmak için kullanılan bir testtir ve İBH tanısı için tek başına CRP seviyesine göre geliştirilmiş duyarlılık ve özgüllük gösterir (100). Dışkıda yüksek kalprotektin seviyesi (> 50 mg/g), İBH riski yüksek olan ve kolonoskopi yapılması gereken hastaları tanımlar (101). Ayrıca CRP ve fekal kalprotektin seviyeleri tedaviye yanıt olarak değerlendirilen belirteçlerdir (31).

Görüntüleme yöntemleri de hastalık tanısında önemlidir. Kümülatif radyasyona maruz kalma risklerinden kaçınmak için, bilgisayarlı tomografi taraması yerine manyetik rezonans görüntüleme veya bağırsak ultrasonu yapılmalıdır (102). Kolonoskopi, İBH'nin

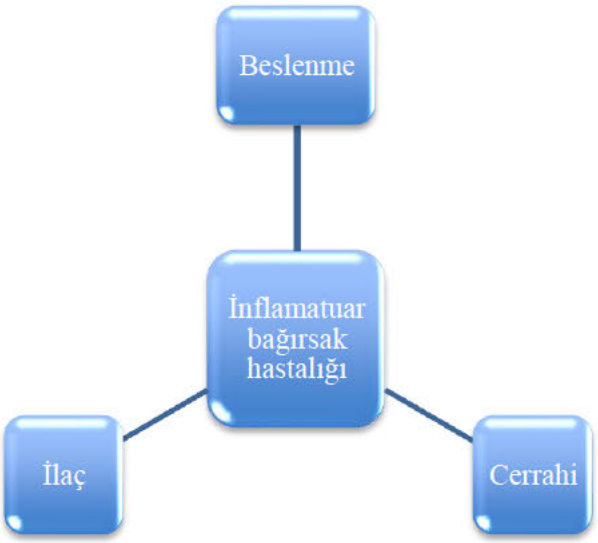
teşhisi ve değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilir. Kolonoskopi, ÜK'li hastalarda displazi sürveyansı için kritiktir. Sigmoid kolona proksimal uzanan ÜK veya kolonun üçte birinden fazlasını içeren kolonik CH tanısı alan tüm hastalar, kolonik displazinin taranması için endoskopik izleme programına yönlendirilir (38,103).

Endoskopi, İBH'de birincil tanı yöntemi olmaya devam etmektedir. İBH teşhisi için hasta, terminal ileum entübasyonu ile kolonoskopiye girmelidir. Belirgin hastalık segmentlerine biyopsi yapılmalı ve ileum ve rektum dahil 5 bölgeden en az 2 biyopsi alınmalıdır. Hastalığının tam histolojik boyutunu belirlemeye yardımcı olmak için normal görünen dokudan da biyopsiler alınmalıdır (104). CH'li hastaların %16'sına kadar üst gastrointestinal hastalık bulunabilmesine rağmen, asemptomatik hastaların rutin tedavisinde üst endoskopi önerilmemektedir (105). Özofagogastroduodenoskopi genellikle İBH semptomları ve çeşitli ön bağırsak bozuklukları arasında önemli bir örtüşme olduğu için yapılır. İBH için yapıldığında mide, yemek borusu ve duodenumdan 2 biyopsi alınması önerilir (106). Benzer şekilde ister kapsül ister balon destekli olsun, enteroskopi yalnızca görüntüleme, geleneksel endoskopik tekniklerle erişilemeyen ince bağırsak hastalığının varlığını doğruladıktan sonra yapılmalıdır. Kapsül endoskopisi düşünüldüğünde, öncelikle bağırsak açıklığının değerlendirilmesi önemlidir çünkü bu prosedürü uygulayan hastaların %13'üne kadar kapsül retansiyonu riski vardır. Tablo 2.3'te İBH'nin endoskopik bulguları gösterilmiştir (31).

Hastalığın tedavi seçenekleri arasında beslenme, ilaç veya cerrahi müdahaleler bulunur Şekil 2.3'te gösterilmiştir (25). Hastalığın teşhis ve tedavisinin temel amacı semptomları azaltmak ve hastanın sağlığını iyileştirmek, hastalığın semptomlarını tamamen ortadan kaldırmak veya hastalığı sabit bir aşamada tutmak ve cerrahi tedaviden kaçınmaktır (21). Tam mukozal iyileşme ve kan parametrelerinin normalleşmesi olarak tanımlanan remisyonun sağlanması ve sürdürülmesi tedavide oldukça önemlidir (24). Mukozal iyileşme daha az hastalık komplikasyonu, daha az hastaneye başvuru, daha az alevlenme ve (çocuklarda/ergenlerde) daha iyi büyüme ile ilişkilidir. Semptomları ortadan kaldırmak ve günlük aktiviteleri normalleştirmek anahtar hedefler olsa da, inflamatuar belirteçlerin normalleşmesi ve mukozal iyileşmenin sağlanması çok önemlidir (25).

Tablo 2.3: İnflamatuar bağırsak hastalığının endoskopik bulguları (31)

	Ülseratif kolit	**Crohn hastalığı**
Lokasyon	Kolon: distalden proksimale	± Kolon
	İzole periapendiks: %5	± İleum
	Göreceli rektal tutulum %10–15	Süreksiz olabilir: lezyonlar atlayabilir
	Backwash ileit: %33–%44	
Mukoza	Damarlanma kaybı	Damarlanma kaybı
	Eritem	Eritem
	Mukozal granülerlik	Mukozal granülerlik
	Aşınma	Aşınma
	Erozyonlar	Erozyonlar
	Ülserler	Ülserler
	Psödopolipler	Psödopolipler
		Aftöz ülserler
		Arnavut kaldırımı görünüm (Cobblestoning)
Biopsi	Kripto apsesi	Granülomlar: %33
	Kripto dallanma	Fibröz
	Kript kısaltması	Nöral hiperplazi
	Kalınlaşmış kas	Normal müsin
	Müsin tükenmesi	Submukozaya uzanan inflamasyon
	Paneth hücre metaplazisi I	
	Artan lamina propria hücreselliği	
	Bazal plazmasitoz	
	Bazal lenfoid kümeler	
	Lamina propria eozinofiller	



Şekil 2.3: İnflamatuar bağırsak hastalığının tedavi seçenekleri (25)

İBH tedavisinin genel hedefleri aşağıda sıralanmıştır;

1. Klinik remisyonun indüksiyonu ve sürdürülmesi,
2. Hastalığın klinik yan etkilerini azaltılması,
3. Tedavi toksisitesinden kaçınılması (kısa ve uzun vadeli),
4. Uzun süreli kortikosteroid kullanımından kaçınılması,
5. Yaşam kalitesini arttırılması,
6. Hasta için beslenme desteği,
7. Hastanın hastaneye yatma veya ameliyat ihtiyacının azaltılması,
8. Kanser dahil hastalık komplikasyonlarının önlenmesi şeklindedir (21,23).

Ülseratif kolit tedavisinde hedef, klinik remisyonu (rektal kanamanın ve diyare/değişen bağırsak alışkanlığının çözülmesi olarak tanımlanır), endoskopik remisyonu (Mayo endoskopik alt skoru 0-1 olarak tanımlanır) ve histolojik remisyonu sağlamaktır. CH'de ise hedef, klinik remisyon, endoskopik remisyon (ileokolonoskopide ülserasyonun çözülmesi veya kesitsel görüntüleme yapılamayan hastalarda inflamasyon bulgularının çözülmesi olarak tanımlanır) ile biyobelirteç remisyonu (yani, normal CRP ve dışkı kalprotektin) sağlamak şeklindedir (107).

2.5.1. Terapötik İlaçlar

Hastalığın tedavisinde ilk adım farmasötik tedavilerdir (21). Mevcut ilaç tedavileri, altta yatan patojenik mekanizmayı değiştirmek veya tersine çevirmek yerine, hastayı remisyonda tutmayı, remisyonu sürdürmeyi ve hastalığın ikincil etkilerini iyileştirmeyi amaçlar (40). İBH tedavisinde antibiyotiklerin, 5-aminosalisilatların (5-ASA), kortikosteroidler gibi anti-inflamatuar ilaçların veya azatioprin, 6-merkaptopürin gibi immüno baskılayıcı ajanların kullanımı klinikte yaygındır. Ayrıca TNF ve monoklonal antikorlar da tedavide kullanılır (108). İlaçlar genellikle aşamalı olarak uygulanır. İlk olarak, daha az zararlı ilaçlar reçete edilir. Bu ilaçlar istenen rahatlamayı sağlamazsa bir üst basamak tedaviye geçirilir (21).

Aktif hastalıkta remisyon indüksiyonu için kortikosteroidler ilk seçeneklerdendir. İBH'li hastalar için, prednizolon günde 40-60 mg'lık bir dozda reçete edilir ve 4-8 hafta boyunca azaltılarak uygulanır. İBH tedavisinde uzun süreli steroidlerin rolü yoktur. Prednizon veya eşdeğeri adrenal yetmezlik riski nedeniyle kademeli olarak azaltılmalıdır (38).

Sülfasalazin ve mesalazin de dahil olmak üzere 5-ASA bazlı ilaçlar, hafif ila orta dereceli ÜK tedavisinde kullanılır (109). 5-ASA etkinliği doza bağlıdır (21). 5-ASA'nın farklı oral preparatları, etki yerleri bakımından farklılık gösterir (103). Sülfa alerjisi ve mide bulantısı olanlarda görülen yan etkiler nedeniyle, gastrointestinal yol üzerindeki etkilerine özgü yeni 5-ASA formları oluşturulmuştur (110). Rektal preparatlar, distal hastalığı ve proktiti tedavi etmek için kullanılabilir (103). Rektal formülasyonlar fitil veya lavman formundadır. Fitiller (1 g / gün) 15-20 cm'ye kadar etkilidir ve lavmanlar (4 g / gün) dalak fleksuruna kadar ulaşır (110). ÜK'nin aksine, 5-ASA tedavilerinin CH tedavisi için sınırlı etkinliği vardır. Eğer 5-ASA ilaçlarıyla remisyon sağlanamazsa tedavinin bir immünomodülatör içerecek şekilde artması endikedir (38).

Tiyopürinler (azatiyoprin ve 6 merkaptopürin) ve metotreksat gibi immünomodülatörler, her yaştan hastada anti-TNF'ye karşı antikor oluşumunu azaltmak için biyolojik bir ilaçla birlikte idame tedavisi ve / veya kombinasyon tedavisi olarak kullanılır (21). Tiyopürinler, optimum dozda 5-ASA tedavisine rağmen aktif kalan orta ila şiddetli CH ve ÜK için remisyonun sürdürülmesine yönelik tedavilerde kullanılırken metotreksat genellikle tiyopürinlere yanıt vermeyen veya bunlara tolerans göstermeyen hastalar için kullanılır (38).

Biyolojik tedavi, hastanın önceki tedavilere yanıt vermediği durumlarda veya kademeli yaklaşımın başarılı olma ihtimalinin düşük olduğu durumlarda indüksiyon ve idame tedavisi olarak endikedir (103).

İnfliksimab, adalimumab ve golimumab, TNF-α karşı antikorlardır. Bu ilaçlar, akut faz reaksiyonu ve sistemik inflamasyonla yakından bağlantılı bir proinflamatuar sitokin olan TNF- α'yı bloke etmenin ortak bir yolu üzerinde çalışır ve böylece dokulara verilen hasarın derecesini azaltır (111). Kullanımları orta ila şiddetli luminal CH (adalimumab ve infliksimab) ve ÜK'de (adalimumab, infliximab vegolimumab) endikedir. Uzun vadeli komplikasyonların gelişmesini önlemek için, immünomodülatör tedaviye rağmen aktif inflamasyon devam ediyorsa, tedavi derhal biyolojik bir ilacı içerecek şekilde oluşturulmalıdır (38). Anti-TNF-α monoklonal antikoru tiopurinlerle kombinasyon tedavisi halinde uygulandığında tek başına uygulanan TNF-a monoterapisinden daha üstündür (112,113).

İnfliksimab ise ÜK'de, yüksek doz kortikosteroide yeterli yanıt alamayan hastanede yatan hastalarda akut şiddetli kolit tedavisi için kullanılır. Bu tedavi, zamanında uygulandığında, kısa ve orta vadede birçok hasta için ameliyattan tasarruf sağlar (114).

2.5.2. Cerrahi Tedavi

Hastalığın seyri sırasında ameliyat gerekebilir. ÜK'li hastaların yaklaşık % 20'sinin ve CH'li hastaların ise % 80'inin ameliyat gerektireceği bildirilir (115). Başarılı bir İBH yönetimi için ameliyat zamanlamasına ilişkin yeterli bir kararın anahtar bir unsur olduğu kabul edilir. Cerrahiden kaçınmak veya ameliyatı ertelemek birçok hasta için (özellikle genç CH hastaları) en iyi seçim olabilirken, diğer durumlarda cerrahi en uygun terapötik yaklaşım olabilir (116,117). Uzun süreli tıbbi tedaviden kaynaklanan tahmini hasar, ameliyatla ilişkili olandan daha yüksek olduğunda ameliyat endike olabilir. Örneğin, laparoskopik ileokolik rezeksiyon, tıbbi tedaviye yanıt vermeyen sınırlı, daraltıcı olmayan, ileoçekal CH'li hastalarda makul bir yaklaşım olarak kabul edilir (118). Cerrahi gecikme (biyolojik ajanlarla tıbbi tedavinin sistematik olarak artması yoluyla), hastaların ağrı ve rahatsızlıklarını uzatmanın yanı sıra, intra ve postoperatif komplikasyon risklerini artırabilir ve daha karmaşık müdahaleler ile daha yüksek perioperatif morbidite ve mortalite gerçekleştirebilir (115). Ameliyat gerektiren ÜK hastaları için total proktokolektomi ve ileoanal poş anastomozu tercih edilen operasyonlardır. Bununla birlikte, seçilmiş hastalarda, özellikle yaşlılarda kalıcı bir stoma iyi bir seçenektir.

Minimal invaziv cerrahi, dünya çapında birçok uzmanlaşmış merkezde geleneksel açık yaklaşımın yerini almıştır. CH tedavisinde ise genellikle laparoskopik ileo-çekal rezeksiyona başvurulur (119). Laparoskopik cerrahinin gelişmesi nedeniyle tam kapasiteye dönüş iki ila dört hafta içinde gerçekleştirilebilir. Bu teknik, müdahale süresini ve hastanede kalış süresini azaltmanın yanı sıra, daha düşük enfeksiyon oranları, ventilatör kullanımının azalması, daha düşük böbrek yetmezliği ve uzun vadede daha az yapışıklıkla ilgili sorunlar ve kesi fıtıkları ile ilişkilidir (120,121). Cerrahi, artık son çare alternatifi olmak yerine geçerli bir tedavi stratejisi olarak görülmekte ve yönetilmektedir. Her hasta için risk-fayda yaklaşımı değerlendirilmesi ile yapılmalıdır (122).

2.5.3. Beslenme

Diyet inançları ve davranışlarının hastanın sosyal hayatı üzerinde güçlü bir etkisi olduğu bildirilmiştir (71). Hastalar genellikle İBH'nin klinik semptomlarını diyetleri ile ilişkilendirir (123). Hastalar sıklıkla diyetlerinin İBH'lerini etkileyeceğini düşünür; hastaların % 77'si remisyon sırasında belirli besinlerden kaçınır ve % 86'sı aktif hastalık sırasında diyet kısıtlamaları uygular (124). Cohen ve ark. (123) hastaların diyet alımlarıyla ilgili semptomları algılamaları hakkında yaptığı çalışmada yoğurt, pirinç ve muzun semptomları iyileştirdiği, yapraklı olmayan sebzeler, baharatlı besinler, meyveler, kuruyemişler, yapraklı sebzeler, kızarmış besinler, süt, kırmızı et, soda, patlamış mısır, süt ürünleri, alkol, yüksek lifli besinler, mısır, yağlı besinler, tohumlar, kahve ve fasulyenin semptomları kötüleştirdiği bildirilmiştir. İBH hastalarında beslenme inançlarının ve davranışlarının incelendiği başka bir çalışmada hastaların % 15,6'sı diyetin hastalığı başlatabileceğine inanırken, % 57,8'i besinlerin İBH'nin tekrarlamasında rol oynayabileceğine inandığını belirtilmiştir (125).

Genel olarak, İBH hastalarının dengeli beslenmeleri önerilir (77). İBH'li hastalar malnütrüsyon açısından risk altındadır ve bu nedenle tanı anında ve sonrasında düzenli olarak malnütrüsyon açısından taranmalıdır (126). Besin alımını kısıtlayıcı davranışlar ve alevlenme sırasında iştahın azalması malnütrüsyon gelişimine neden olur (127). İBH'li hastalarda malnütrüsyon prognozu, komplikasyon oranlarını, mortaliteyi ve yaşam kalitesini kötüleştirdiği için uygun şekilde tedavi edilmelidir. Genel olarak, İBH'li hastaların enerji gereksinimleri sağlıklı popülasyonunkilere benzerdir (126).

Meyve ve sebzelerden, omega-3'ten zengin ve omega-6'dan düşük bir diyet, CH veya ÜK geliştirme riskinin azalmasıyla ilişkilidir ve bu nedenle tavsiye edilir (127).

Aktif İBH'de protein gereksinimi artar ve genel popülasyonda önerilene göre alım artırılmalıdır (yetişkinlerde 1.2-1.5 g/kg/gün'e kadar). Remisyondaki protein gereksinimleri genellikle yüksek değildir ve provizyon, genel popülasyon için önerilene benzer olmalıdır (128). İBH'li hastalar düzenli olarak mikro besin eksiklikleri açısından kontrol edilmeli ve belirli eksiklikler uygun şekilde düzeltilmelidir. Mikrobesin eksiklikleri kısıtlı besin alımı, enterik vitamin kaybı, emilim bozukluğu ve bazı ilaçların istenmeyen etkilerinden kaynaklanabilir (127). Demir eksikliği anemisi olan tüm İBH hastalarına demir takviyesi önerilir. Demir takviyesinin amacı, hemoglobin seviyelerini ve demir depolarını normalleştirmektir. Hafif anemisi olan, hastalığı klinik olarak inaktif olan ve daha önce oral demire karşı intoleransı olmayan hastalarda oral demir birinci basamak tedavi olarak düşünülür. Aktif hastalığı olan İBH hastalarında ve steroid tedavisi görenlerde, düşük kemik mineral yoğunluğunun önlenmesine yardımcı olmak için serum kalsiyumu ve 25(OH) D vitamini izlenmeli ve gerekirse takviye edilmelidir (126).

İnflamatuar bağırsak hastalığını geleneksel ilaçlardan başka bir yöntemle veya bunlara ek yöntemlerle kontrol altına almak isteyen yetişkin hastalar için eşitli diyetler mevcuttur. Diyetler, spesifik karbonhidrat diyet, paleolitik diyet, düşük fermente olabilen oligosakkarit, disakkarit, monosakkarit ve poliol (FODMAP) diyeti ve anti-inflamatuar diyet şeklindedir (70).

Spesifik karbonhidrat diyeti yalnızca monosakkaritlerin tüketimine izin veren ve basit karbonhidrat alımını kısıtlayan bir diyettir (63,129). Bu diyet disakkaritlerin ve polisakkaritlerin sindirilmeden kolona geçtiğini, bu sindirilmemiş ürünlerin bakteri ve mayaların aşırı çoğalmasına neden olarak aşırı mukus üretimine ve bağırsak hasarına yol açtığını teorileştirir (130).

Paleolitik diyet, gastrointestinal sistemin modern diyeti tüketecek şekilde gelişmemiş olmasına dayanır; yağsız etler ve tahıl içermeyen bitki bazlı yiyecekler hastalığa neden olabilecek modern besinlerden kaçınmak için tercih edilir. Paleo diyeti, tahıl dışı, bitki bazlı kaynaklardan yüksek lif (günlük 45-100 g) alımını ve yağsız proteinin günlük kalori alımının % 30-35'i olması gerektiğini belirtir (70).

Hastalığa sahip olan birçok kişi, İBS’si olanlara benzer fonksiyonel semptomlar yaşar. Düşük FODMAP diyeti, semptomlara yol açan bağırsak bakterileri tarafından fermente edilebilen, zayıf emilen kısa zincirli karbonhidratları dışlamaya çalıştığı için İBS tedavisinde tavsiye edilir (130). Fermantasyonun sonuçları genellikle hidrojen ve

metan gazı ve kısa zincirli yağ asitlerini içerir. Semptomlar bu metabolik ürünlerden veya diyetle ilişkili mikrobiyotadaki değişikliklerden kaynaklanır (77). Diyet, İBH'deki artan bağırsak geçirgenliği ile ilişkilendirilir. Bu diyet genellikle semptom yanıtını değerlendirmek için 6-8 hafta boyunca uygulanır. Daha sonra hasta toleransına göre yiyecekler yeniden diye eklenebilir (70,129).

Anti-inflamatuar diyet, disbiyozun bağırsak lümenindeki patojenik bakterilerin substratları olan bazı karbonhidratlardan kaynaklandığı fikrine dayanan nispeten yeni bir diyettir. Bu diyet spesifik karbonhidrat diyetini temel alır. Bu nedenle rafine şeker, glüten bazlı tahıllar ve belirli nişastalar gibi karbonhidratlar elimine edilir (70). Diyette anti-inflamatuar etki gösteren sebzelerin, meyvelerin, omega-3 yağ asitlerinin, polifenollerin ve baharatların ve bazı antioksidan vitaminlerin tüketimi arttırılır (129). Anti-inflamatuar diyetin 5 temel bileşeni Tablo 2.4'te belirtilmiştir (131).

İnflamatuar veya fibrotik darlıkları olan hastalar, "düşük kalıntılı" diyete de yönelebilir. Bu diyet, akut tıkayıcı bir süreçte sindirilemeyen veya sindirimi zor karbonhidratları, lif veya tohum bakımından yüksek olan belirli yiyeceklerin ortadan kaldırılmasını içerir (77).

Oral beslenme takviyeleri, İBH'de tıbbi beslenme endike olduğunda ilk adımdır, ancak genellikle normal beslenmeye ek olarak kullanılan küçük bir destekleyici tedavidir. Oral beslenme yeterli değilse destekleyici tedavi olarak enteral nütrüsyon (EN) düşünülmelidir. EN, tamamen kontraendike olmadıkça, formüller veya sıvılar kullanmak her zaman parenteral nütrüsyona (PN) tercih edilmelidir. EN güvenli görünmektedir ve şiddetli ÜK'li hastalarda standart beslenme uygulamasına göre destekleyici tedavi olarak önerilebilir (126). Özel enteral nütrüsyon (ÖEN) CH yönetiminde dünyanın birçok yerinde sıklıkla başvurulan ilk basamak tedavidir. ÖEN, pediatrik popülasyonda, klinik remisyon indüksiyonuna, remisyonun sürdürülmesine ve mukozal remisyonun sağlanmasında kullanılır (71,130). ÖEN, elementel, yarı elemental veya polimerik bazlı yüksek enerjili sıvı formüllerden oluşur (132).

Tablo 2.4: Anti-inflamatuar diyetin 5 temel bileşeni (131)

Anti-inflamatuar diyet 5 temel bileşenden oluşur
1. Belirli karbonhidratların (laktoz, rafine veya işlenmiş kompleks karbonhidratlar) tüketiminin kısıtlaması,
2. Prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve bağırsak mikrobiyotasının dengesini eski haline getirebilecek bileşenlerden zengin besinlerin (çözünür lif, pırasa, soğan, fermente besinler) tüketilmesi,
3. Toplam yağ ve doymuş yağ asitlerinin alımının azaltılması ve omega-3 açısından zengin besinlerin alımının arttırılması,
4. Genel beslenme düzeninin gözden geçirilmesi, hastanın intoleransının belirlenmesi ve herhangi bir eksik besin öğesinin tespiti,
5. Bağırsakta besin emilimini iyileştirmek için pişirilmiş, homojenize edilmiş, öğütülmüş besin dokusunun modifikasyonu şeklindedir.

Test edilen formüllerin CH'deki semptomları ve bağırsak inflamasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (63). ÖEN'nin İBH için uzun süreli bir idame tedavisini sürdürmede (6-8 hafta boyunca tek başına beslenme kaynağı olarak kullanılır) sınırlamaları vardır ve sıvı beslenme formülü lezzetten yoksundur ve uzun vadeli bir tedavi seçeneği olarak kabul edilemez (71,131). Serbest diyetli bir formülden %50 kalori içeren kısmi enteral nütrüsyon (KEN), tam remisyon sağlamada veya akut faz reaktanlarını azaltmada etkisizdir, bu da ÖEN'nin etkisinin en azından kısmen serbest diyetin dışlanmasına bağlı olduğunu düşündürür (71). Bununla birlikte, 78 pediatrik hastada yapılan yakın tarihli bir randomize kontrollü klinik çalışma, KEN ile birleştirilen yeni bir CH dışlama diyeti 12. haftaya kadar Pediatrik CH Aktivite İndeksi kullanılarak hastalığın şiddetinde azalma ve remisyonun sağlanmasına etkili olmuştur. CH dışlama diyeti, mikrobiyomu, bağırsak bariyerini ve bağırsak bağışıklığını olumsuz yönde etkilediği varsayılan, diyet bileşenlerine maruziyeti azaltmak için tasarlanmış, KEN ile birleştirilmiş tam besin diyetidir (133). CH dışlama diyeti, meyve, sebze, et ve karbonhidrat tüketimine izin veren, ancak bağırsak mukoza tabakasını bozan veya disbiyozu indükleyen spesifik diyet bileşenlerini ortadan kaldırmayı amaçlayan tam besin diyetidir. Daha spesifik olarak, belirli hayvansal yağları, belirli et türlerini ortadan kaldırır

ve emülgatörler ve maltodekstrinler gibi besin katkı maddelerine maruz kalmayı azaltır (130).

Paranteral nütrüsyon, İBH'de

1. Oral beslenme veya EN'nin yeterince mümkün olmadığı durumlarda, (örn. gastrointestinal yolun işlevsiz olduğunda veya kısa bağırsaklı CH hastalarında),
2. Obstrüksiyonun ötesine beslenme tüpünün yerleştirilmesinin mümkün olmadığı veya bunun başarısız olduğu tıkalı bir bağırsak olduğunda veya
3. Anastomoz kaçağı veya yüksek çıkışlı bağırsak fistülü gibi başka komplikasyonlar meydana geldiğinde uygulanmalıdır.

Proksimal fistülü ve/veya çıkışı çok yüksek olan CH hastaları, kısmi veya özel PN ile beslenme desteği almalıdır. PN, bağırsak yetmezliği olmadıkça ÜK'de kullanılmamalıdır (126).

2.6. POLİFENOLLER

Biyoaktif bileşiklerin, anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri nedeniyle İBH tedavisinde etkili olduğu ileri sürülmektedir (27). Yaban mersini ve çay özleri gibi polifenoller, antioksidan ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir ve kronik inflamatuar hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için önemli seçenekler gibi görünmektedir (33).

Polifenoller veya fenolik bileşikler, bitkiler tarafından üretilen aromatik veya fenol halka yapısı gösteren sekonder metabolitlerdir (134). Fenolik halkaları birleştiren bağlara ve halkaların sayısına göre sınıflara ayrılır (134). İzoflavonoidler ve antosiyaninler gibi flavonoidler ve stilbenler, fenolik asitler, taninler ve kumarinler gibi flavonoid olmayanlar şeklinde gruplandırılır (135). Polifenollerin alt sınıfları farklı yiyeceklerde farklı miktarlarda bulunur (134). Meyvede, elmada ve kırmızı soğanda flavonoller yaygın olarak bulunurken flavanoller çoğunlukla çay, kakao ve çikolatada bulunur. Soya fasulyesinde izoflavonlar yaygınken kekik ve biberiye de flavonlar yaygındır. Üzüm ve şarap ise resveratrol açısından zengindir (136). Fenoller, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-kanserojen, antiadipojenik, antidiyabetik ve nöroprotektif etkilere sahiptir (137,138). Bu bileşenler NF-κB, Nrf-2, STAT ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) gibi inflamasyona dahil olan birkaç hedef geni düzenleyebilir. Polifenoller ayrıca IL-1β, IL-8 ve TNF-α gibi sitokinlerin oluşumunu da engeller ve süperoksit dismutaz ve glutatyon dahil hücre içi antioksidanların aktivitelerini destekler.

Polifenoller, antioksidan aktiviteleri sayesinde doğrudan serbest radikalleri temizler ve NF-κB ve MAPK yolları gibi bazı redoks sinyal yollarını kesintiye uğratır (99). Ayrıca flavonoidlerin hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu, in vivo ve in vitro olarak bağırsağın epitel mukoza tabakasını koruduğu bildirilmiştir (139). Bu bileşenler özellikle mide-bağırsak yolunda inflamasyonlu hastalıkların gelişimini önlemeye katkıda bulunan uygun araçlar olabilir (140). Özellikle, polifenoller gibi fitokimyasallar açısından zengin bir diyet, kronik bağırsak inflamasyonunun modülasyonunda etkili olabilir (141). NF-κB, COX-2 ve iNOS aktivasyonunu baskılayarak anti-inflamatuar özellikler gösterir (142). Özellikle, güçlü kanıtlar, polifenol bakımından zengin nar takviyesinin, kolonda ellajitannin metabolitlerinin oluşumuna bağlı olarak kronik inflamatuar hastalıkların ve İBH'nin semptomlarını iyileştirebilecek anti-inflamatuar etkiler uyguladığını gösterir (143). Gallik asit eşdeğerlerinde 50 mM'de nar meyvesi kabuğu özütü ile 4 saatlik bir ön işlemin, IL-1β ve nar ile birlikte 48 saatlik bir maruziyet döneminden sonra birleşik Caco-2 hücrelerinde IL-8 salgılanmasını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (144). İnsan mast hücrelerinin bir modeli olan KU812 hücrelerinde, nar meyvesi ekstresinin IL-6 ve IL-8 salgılarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Forbol 12-miristat 13 asetat ve kalsiyum iyonofor ile eşzamanlı stimülasyondan önce 1 saatlik bir nar ön-tedavisinden sonra doza bağımlı (20–100 mg/ml^{-1}) bir şekilde karşılık gelen gen transkripsiyonunu azalttığı da gözlenmiştir (145).

2.6.1. Nar

Nar (*Punica granatum* L.), geçmişten günümüze yetiştirilen ilk evcilleştirilmiş meyvelerden biridir (146). İran, Hindistan, Pakistan, İsrail, Afganistan, Mısır, Çin, Japonya, Amerika, Rusya, Avustralya, Güney Afrika ve Suudi Arabistan gibi birçok ülkede ve ayrıca Güney Amerika'nın subtropikal bölgeleri olmak üzere dünyanın çoğu bölgesinde yetiştirilir (147). İran, dünyanın en büyük nar üreticilerinden biridir (148).

Nar, ılıman bölgelerde yaprak döken, soğuk bölgelerde yaprak dökmeyen, az ya da çok düzensiz ve dikenli dalları ve parlak yaprakları olan, 1.5 ila 5 m yüksekliğe ulaşan bir çalıdır. *P. granatum*, Punicaceae familyasına aittir. 1 cins ve 2 tür içeren en küçük bitki ailesidir. *P. granatum* (yenilebilir nar) İran ve Akdeniz bölgelerine özgü iken *Punica protopunica* (yenmeyen) Pasifik Okyanusu'ndaki Sokotra adalarına özgüdür (146). *Punica granatum* L, glikoz, fruktoz, sakaroz, maltoz gibi şekerleri, malik asit, fumarik asit, oksalik asit, süksinik asit, sitrik asit, tartarik asit gibi organik asitleri, ellajik asit,

gallik asit, klorejenik asit, sinnamik asit, punikalajin, punikalin gibi alkaloidleri, luteolin, kamferol, narinjin gibi flavonoidleri, C vitamini, B1, B2, beta karoten gibi vitaminleri polifenolleri, antosiyaninleri, yağ asitlerini içerir (146,147). Tablo 2.5'te, *P. granatum* ağacının ve meyvesinin başlıca bileşenleri listelenmiştir (13).

Tablo 2.5: Punica granatum ağacının ve meyvesinin bileşenleri (13)

Bitki Bölümleri	Bileşenleri
Nar suyu	Antosiyaninler, ellajik asit, glikoz, kuersetin, askorbik asit, gallik asit, rutin, kafeik asit, kateşin, epigallokateşin gallat (EGCG), çok sayıda mineral, özellikle demir, amino asitler.
Nar çekirdeği yağı	Punisik asit, ellajik asit, farklı yağ asitleri, steroller dahil diğer bileşenler
Nar kabuğu	Fenolik punikalajinler, gallik asit ve diğer yağ asitleri, kateşin, EGCG, kuersetin, rutin ve bazı flavon, flavonol, flavonon ve antosiyanidinler.
Nar yaprağı	Tanenler (punikalin ve punikafolin) ve flavon, luteolin ve apigenin dahil glikozitler
Nar çiçeği	Gallik asit, ursolik asit, maslinik ve asyatik asit dahil triterpenoidler, diğer tanımlanamayan bileşenler
Nar kökleri ve kabuğu	Punikalin ve punikalajin dahil olmak üzere ellajitanninler, çok sayıda piperidin alkaloidleri

EGCG: Epigallokateşin gallat

Narın insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Nar, geleneksel tıp kaynağı olarak eski zamanlardan beri kullanılır (146). Eski Hint kültüründe, ishal, bağırsak solucanları, burun kanaması ve ülserleri tedavi etmek için kurutulmuş nar kabuğu özütü, ağaç kabuğu ve çiçek infüzyonları kullanılmıştır (149). Ayrıca meyve suyu boğaz ağrısını

gidermek için gargara olarak kullanılırdı (146). İslam geleneğinde de nar, sarılık, dalak rahatsızlıkları, kalp tıkanması ve yoğun öksürüğü tedavi etmek için kullanılmıştır (150).

Nar, antioksidan, antikanserojenik, anti-obezite, anti-tümör ve anti-inflamatuar gibi tıbbi özellikler açısından zenginleştirilmiş fonksiyonel besin ve nutrasotik kaynağı olarak kullanılmak üzere popülerdir (151). Kökleri, çiçekleri, meyveleri, kabuğu, tohumları ve diğer kısımları tıbbi malzeme olarak kullanılabilir. Anti-inflamatuar, antioksidan, antibakteriyel ve antiviral özellikler de dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir ve ayrıca lipid düzenleme ve immünomodülasyonda da rol oynar (152). Narın antioksidan aktivitesi sayesinde inflamasyon eşiğini düşürebileceği düşünülür. Hem antioksidan aktivitesi hem de inflamasyonu baskılaması kansere karşı kemoterapötik ve kemopreventif kullanıma katkıda bulunabileceğini gösterir (15). Narın güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan etkileri içerdiği punikalajin, punikalin, gallik asit, ellajik asit ve antosiyaninler, askorbik asit ve fenolik bileşikler gibi bazı bileşenlere atfedilir (146). Nar tüketiminin, kanser, insülin direncin, yüksek tansiyon, yüksek kolesterol seviyeleri, oksidatif stres, hiperglisemi, bağırsak inflamasyonu dahil kronik inflamasyonlu hastalıkları, obeziteyi, kardiyovasküler rahatsızlıkları iyileştirme potansiyeli kanıtlanmıştır. Narın vücuttaki mukozal dokuların inflamasyonunu tedavi etmek ve önlemek için etkili bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir (151).

Nar meyvesi, anti-inflamatuar ve antibakteriyel aktivitelere sahiptir (146). Özellikle flavonoidler ve tanenler antibakteriyel aktivite ile ilişkilendirilir (153). Nar ekstratlarının, COX-2, iNOS ekspresyonu, NFk-β'nin aktivasyonu ve MAPK fosforilasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuar etki gösterir (149). Stojanovi'c ve ark. (154) nar kabuğu ekstratının, bağırsakla ilişkili lenfoid dokuda in vitro olarak IL-17 üretimini inhibe edebileceğini ve deneysel otoimmün ensefalomiyelitli sıçanlardan izole edilen aktive edilmiş T hücrelerinde IL-17 üretimini azaltarak otoimmün yanıtla etkileşime yol açabileceğini bildirmiştir. Yamasaki ve ark. (155) çalışmalarında ise, punisik asidin B hücrelerinin işlevini artırabileceği bildirilmiştir. Çalışmada fareleri 3 hafta boyunca %0, %0,12 ve %1,2 oranlarında NÇY içeren diyetlerle beslemiştir. Çalışmanın sonucunda farelerin dalak hücrelerinde IgG ve IgM seviyeleri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte ellajik asitin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B bandının çoğalmasını ve göçünü engelleyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca IL-1β ve TNF-α tarafından indüklenen aktive protein-1 ve MAPK'I

da inhibe edebileceği gösterilmiştir. Nar meyvesi ve kabuğu bağırsak parazitlerine, dizanteriye ve ishale karşı da koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (149). Ayrıca burun ve diş eti kanamalarını durdurmak ve hemoroid tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (146).

Nar, çeşitli sinyal yollarını düzenleyerek tümörler, ateroskleroz, hipertansiyon, hiperlipidemi ve diğer hastalıklar üzerinde tedavi edici etkilere sahiptir. Bu sinyal yolakları şunlardır:

1. NF-kB yolu;

2. MAPK yolu;

3. PPAR yolu; ve

4. Sisteinil aspartata özgü proteinaz (kaspaz) yoludur (149).

Meyve ağırlığının yaklaşık %3'ünü nar çekirdeği oluşturur (156). Son zamanlarda nar çekirdeklerinden elde edilen yağ, endüstriyel proseslerde ve gerekli yağ asitlerinin temininde kullanılmasıyla daha fazla ilgi görmeye başlamıştır (157). NÇY, toplam tohum ağırlığının %12 ila %20'sini oluşturur (156). Yağ asitlerinin oranları, farklı çeşitler arasında 63-272 g/kg kuru tohum ağırlığı arasında değişiklik gösterir. Bu yağ asitleri kompozitlerinin ana bileşenlerini doymuş ve doymamış yağ asitleridir (157). Linolenik asit ve linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri ve punisik asit, oleik asit, stearik asit ve palmitik asit gibi diğer yağlar ile karakterizedir (153). Ayrıca, *P. granatum* L.'nin farklı çeşitlerinde oleik asit, palmitik asit, stearik asit, palmitoleik asit, araşidonik asit, laurik asit ve kaprilik asit gibi yağ asitleri de vardır. (157). NÇY, özellikle punisik asit ve oktadekatrienoik asit olmak üzere %80 konjuge yağ asitlerinden oluşur. Tablo 2.6'da NÇY yağ asidi bileşimi gösterilmektedir (158).

Tablo 2.6: Nar çekirdeği yağının asit bileşimi (158)

Sinonim	Yağ Asidi	%
C12:0	Laurik asit	-
C14:0	Meristik Asit	0,02
C16:0	Palmitik asit	2,57
C16:1	Palmitoleik asit	0,1
C17:0	Margarik asit	0,14
C18:0	Stearik asit	2,07
C18:1	Oleik asit	4,33
C18:1	Trans Vaksenik Asit	0,64
C18:2	Linoleik asit	5,24
C18:3	Linolenik asit	0,18
C18:3 n5	Punisik asit	81,29
C20:0	Araşidik Asit	0,46
C20:1	Gondoik Asit	0,56
C20:1	Gadoleik Asit	-
C20:5	Eikosapentaenoik asit	0,8
C22:0	Behenik asit	0,13
C22:1	Erüsik asit	1,05
C24:0	Lignoserik asit	0,39
C24:1	Nervonik asit	0,03
Σ DYA	Doymuş yağ asitlerinin toplamı	5,78
Σ TDYA	Tekli doymamış yağ asitlerinin toplamı	6,71
Σ ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asitlerinin toplamı	87,51
TDYA / ÇDYA	Fraksiyonasyon	0,077
DYA /ÇDYA	Fraksiyonasyon	0.061

DYA: Doymuş yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doyamamış yağ asitleri; DYA /ÇDYA: Doymuş yağ asitlerinin çoklu doymamış yağ asitlerine oranı

Tohumlar protein, ham lifler, vitaminler, mineraller, pektin, şekerler, polifenoller, izoflavonlar (esas olarak genistein), fitoöstrojen kumestrol ve seks steroidi, estron içerir (153). Ayrıca NÇY antioksidan ve antiinflamatuar etkileri olan polifenoller, hidroksibenzoik asit, glukopiranozid türevleri fitosteroller ve konjuge linolenik asitler, özellikle punisik asit ve katalpik asit gibi farklı kimyasallar içerir (159).

Yüksek konsantrasyonda punisik asit içeren NÇY'nin, farelerde yapılan çalışmada immünomodülatör aktivite gösterdiği bildirilmiştir (151). NÇY'nin punisik asidi, prostaglandin biyosentezini inhibe eder. NÇY'den çıkarılan polifenoller, COX aktivitesini potansiyel olarak önleyebilir. Ekstre edilmiş NÇY, COX ve lipoksijenaz eikosanoid enzimlerinin inhibisyonu yoluyla prostaglandin veya lökotrien üretimini etkili bir şekilde engelleyebilir (146). Punisik asitin, p38MAPKinase/Ser345-p47phox-ekseni ve MPO salınımını hedefleyerek TNF-α ile indüklenen NADPH oksidaz inhibisyonu aracılığıyla anti-inflamatuar etki gösterir. Bu nedenle, İBH gibi inflamatuar hastalıklarda yeni bir alternatif terapötik strateji olabileceği düşünülür (19). Spilmont ve ark. (160), punisik asitin anti-inflamatuar ve antioksidatif özelliklerini gösterdiği çalışmalarında, diyetin %5'inde NÇY tüketiminin kemik mineral yoğunluğunu iyileştirdiğini ve osteoklastogenez inhibisyonu ve osteoblastogenez iyileştirmesi ile farelerde trabeküler mikro-mimari bozulmayı önlediğini gösterdi. NÇY'nin ayrıca pro-inflamatuar faktörlerin ekspresyonunu inhibe ettiği ve anti-inflamatuar faktörleri uyardığı bulunmuştur. NÇY'nin, kimyasal olarak insan östrojenlerine benzeyen fitoöstrojenler içermesi nedeniyle menopoz için geleneksel hormon tedavisinin yerine kullanılabileceği de belirtilmiştir (156).

Fizyolojik veya akut inflamasyon, doku hasarına karşı yararlı bir konak yanıttır, ancak zamanında kontrol altına alınmazsa, romatoid artrit, İBH ve kanser gibi bağışıklıkla ilişkili hastalıklara yol açabilir. Kronik inflamasyon, TNF-α, IL'ler (örn IL-6, IL-8), transkripsiyon aktivasyon faktörleri (örn. NF-kB) ve eikosanoidler gibi biyoaktif lipidlerin (örn. prostaglandin E2 ve lipoksijenaz türevli ürünler) gibi çözünür pro-inflamatuar mediatörlerin çekimi yoluyla kanser gelişimi ile ilişkili erken değişikliklere neden olur (15).

2.7. İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI VE NAR

Geleneksel ve yeni tedavilerin değişken yanıtı ve yan etkileri, tamamlayıcı ve alternatif tıp çözümlerine olan ilgiyi arttırmıştır (42). İBH'deki potansiyel bitkisel tedavilerin faydaları, bağışıklık sistemi düzenlemesi, antioksidan aktivite, lökotrien B4'ün inhibisyonu, NF-kB'nin inhibisyonu ve antiplatelet aktivitesi gibi farklı etki mekanizmalarıyla ilişkilidir (161).

Punica granatum L.'nin, bir dizi inflamasyonlu hastalıkta sağlık yararları sağladığı bilinmektedir (11). Narın anti-inflamatuar bağırsak aktivitesi kolon kanseri hücre hattında görülmüştür. Total nar tanenleri ve punikalajin, PKB/AKT aktivitesini, NF-kB aktivasyonunu ve TNF-α tarafından indüklenen COX-2 ekspresyonunu inhibe etmiştir (162). Caco-2 hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışma, *P. granatum* kabuklarından elde edilen bir polifenolik özütün, kemokin IL-8'in salgılanmasını ve IL-1β stimülasyonundan sonra NO üretimini engellediğini göstermiştir (144). Dekstran sülfat sodyumun neden olduğu kolit modelinde, *P. granatum* özütü ve ellajik asitten zengin fraksiyonu (100 mg/kg ve 200 mg/kg p.o.) ile tedavinin, histamin, MPO ve oksidatif stresin azalmasıyla birlikte kolonik inflamasyonu önemli ölçüde hafiflettiği gözlenmiştir (163). Dekstran sülfat sodyum ile indüklenen akut ve kronik deneysel kolit modelinde ellajik asidin anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek ve olası etki mekanizmalarını incelemek için yapılan çalışmanın akut ÜK modelinde, ellajik asit hem makroskobik olarak hem de inflamatuar aracıların (IL-6, TNF-a ve IFN-y) profili aracılığıyla hastalık şiddetini hafifçe iyileştirdiği gözlemlendi. Kronik ÜK modelinde ise ellajik asit, hastalığın ilerlemesini önemli ölçüde inhibe ederek, bağırsak inflamasyonunu ve histolojik puanları azalttığı bulundu. Ayrıca, COX-2 ve iNOS gibi aracılar aşağı regüle ettiği ve p38 MAPK, NF-kB ve STAT3 sinyal yollarını bloke ettiği bildirildi. Çalışmanın sonucunda bir anti-inflamatuar tamamlayıcı olarak ellajik asidin kullanımının bağırsak inflamasyonunu ve ilgili kanser gelişiminin diyetle önlenmesinde etkili olabileceği vurgulandı (20). Punisik asitin de PPARy'yi güçlü bir şekilde bağladığı ve aktive ettiği, bu nedenle PPARy'ye yanıt veren gen ekspresyonunu arttırdığı ve diyabet ve bağırsak inflamasyonunu iyileştirdiği belirtilmiştir (16).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI

Bu çalışma, Ağustos 2021 tarihinde Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde, Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'unun 30.09.2020 tarihli 2020-869 sayılı izni ile yürütülmüştür (Ek 1). Araştırmanın biyokimyasal analizleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalında, histopatolojik analizleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yürütülmüştür.

Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 2021/079 no'lu proje desteği ile desteklenmiştir (Ek 2).

3.2. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BARINMASI

Çalışmada kullanılmak için 8-12 haftalık, 200-300g ağırlığında 32 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilmiştir. Deneyde kullanılan sıçanların sayısı güç analizi yöntemiyle belirlenmiştir (Ek 3). Sıçanların bakımı, kanlarının alınması yem tüketimleri, ağırlık takipleri ve sakrifikasyon işlemleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar birimi bünyesinde gerçekleşmiştir. Bu süreçte Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyulmuştur. 15.08.2021 tarihinde deneye başlanmıştır. Kafes dağılımları yapılmadan sıçanların kuyrukları boyanmış, ağırlıkları ölçülmüştür. Randomize şekilde 4 gruba ayrılan sıçanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde gruplandırılmıştır. Deney boyunca sıçanlar standart laboratuvar koşullarında oda sıcaklığı 21±2 °C'de, ışık periyodu 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık olarak ayarlanmış, bağıl nemi %45-65 olan ortamda barındırılmış ve bakılmıştır. Sıçanlar deney süresince standart sıçan yemi ile ad libitum beslenmiştir. Deney tamamlanana kadar sıçanların genel durumları, yem ve su tüketimleri günlük olarak izlenmiştir.

3.3. DENEYE PROTOKOLÜ

3.3.1. Kolit Modeli Oluşturulması ve Nar Çekirdeği Yağı Tedavisi

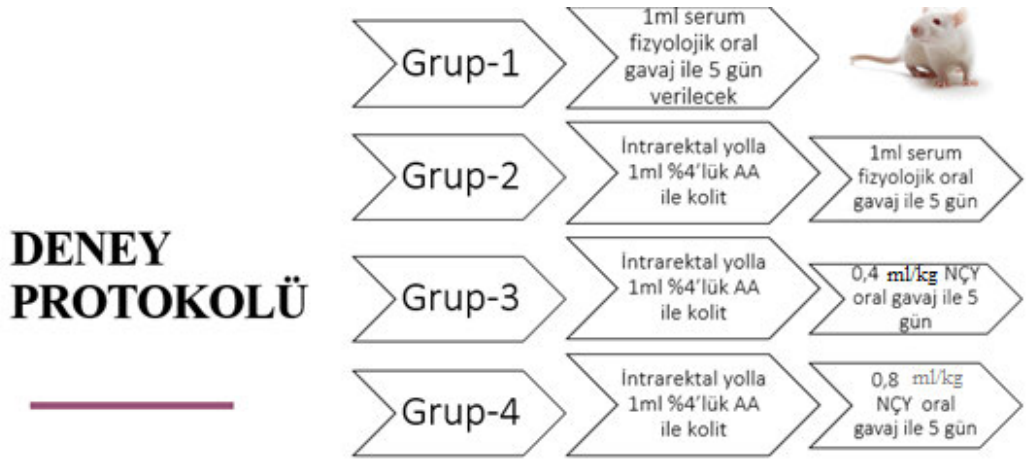
Asetik asit ile indüklenen kolit, İBH 'yi araştırmak için kullanılan deneysel kolit modellerinden biridir. Sıçanlarda rektumda ve kolonda inflamasyon ve ülserasyonu indüklemek için intrarektal AA uygulaması ile yapılır (164). MacPherson ve ark. (165) intrarektal olarak % 3-5 asetik asit uygulamasının, sıçanlarda kolonun distal kısmında akut koliti indüklediğini bulmuşlardır. AA ile indüklenen kolit, patojenez, histopatolojik görünüm ve ilgili proinflamatuar aracılar açısından insanlarda İBH'ye benzerlik gösterir. Rektal yolla seyreltik bir AA çözeltisinin uygulanması, bağırsak dokusuna gelişmiş nötrofil infüzyonu, mukozal ve submukozal tabakaların geniş doku nekrozu, submukozal ülserasyon, vasküler dilatasyon ve ödem ile işaretlenmiş transmural olmayan bir inflamasyon oluşturur (166).

Randomize olarak 4 gruba (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4), dağılım olarak 8 kafese ayrılan sıçanlar her kafeste 4 sıçan olacak şekilde yerleştrilmiştir. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve kısaltmaları Tablo 3.1'de, deney akış diyagramı Şekil 3.1'te gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Deney hayvanlarının gruplandırılması ve kısaltmaları

Kafes numarası	Grup	Kısaltma
G1	Kontrol grubu	Kontrol
G2	Ülseratif kolit grubu	ÜK
G3	Ülseratif+kolit+0,4ml/kg nar çekirdeği yağı	ÜK+0,4ml/kg NÇY
G4	Ülseratif+kolit+0,8ml/kg nar çekirdeği yağı	ÜK+0,8ml/kg NÇY

K; Kontrol, ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolitle birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 3.1: Deney Akış Diyagramı

Grup 1-Kontrol grubu: Kontrol grubundaki sıçanlara oral gavaj tüpü ile serum fizyolojik 1 ml olarak 5 gün boyunca verilmiştir. Bu işlemden 5 gün sonra laparotomi yapılmış, periferik kan örneği ve bağırsak doku örnekleri alınmıştır.

Grup 2-ÜK grubu: Kolit oluşturmak için, bir kez rektal yoldan intra kolonik olarak uygulamak için 1 ml verilmek üzere % 0,9 sodyum klorürde % 4'lük AA (Merck-A6283, Almanya) çözeltisi hazırlanmıştır (164,167). 50 mg/kg Ketamin (Alfasan international B.V. Holland) ve 10 mg/kg Xylazine (Alfazyne %2 Alfasan Holland) ile anestezi uygulandıktan sonra 6 F katater ile hazırlanan AA çözeltisi, intrarektal olarak 8 cm içeriye girilerek uygulanmıştır. Resim 3.1'de gösterilmiştir. İşlem sonrası sıçanlara oral gavaj tüpüyle serum fizyolojik 1 ml hacminde 5 gün boyunca verilmiştir. Bu işlemden 5 gün sonra laparotomi yapılmış, periferik kan örneği ve bağırsak doku örnekleri alınmıştır (168).

Grup 3-ÜK+ 0,4ml/kg NÇY: Sıçanlara Grup 2' deki kolit oluşum prosedürü uygulandıktan sonra her gün oral gavaj ile günde 1 kez 0,4 ml/kg NÇY (Zade Vital, Türkiye) verilmiştir (169) (EK 3). Resim 3.2'de NÇY suplementasyonu gösterilmiştir. Bu işlemden 5 gün sonra laparotomi yapılmış, periferik kan örneği ve bağırsak doku örnekleri alınmıştır (168).

Grup 4-ÜK+ 0,8ml/kg NÇY: Sıçanlara Grup 2' deki kolit oluşum prosedürü uygulandıktan sonra her gün oral gavaj ile günde 1 kez 0,8 ml/kg NÇY verilmiştir (170,171). Bu işlemden 5 gün sonra laparotomi yapılmış, periferik kan örneği ve bağırsak doku örnekleri alınmıştır (168). Grup 4 de 2 hayvan ex olmuş tüm karşılaştırmalar 30 hayvan üzerinden yapılmıştır.



Resim 3.1: Rektal yoldan intra kolonik olarak kolit geliştirilmesi



Resim 3.2: Nar çekirdeği yağı suplementasyonu

3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasallar ve kitler Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Kimyasal maddeler ve kitler

Kimyasallar ve Kitler	**Markalar**
1.Asetik asit	Merck-A6283
2. Ketamin	Alfasan International B.V. Holland
3. Ksilazin	Alfazyne %2 Alfasan Holland
4. Fosfat tamponu	-
5. Sodyum klorür (NaCI)	Sigma S9888
6. Sülfirik asit	Merck 258105
7. 5,5'-Ditiyobis	Sigma D8130
8. O-Dianisidin	Sigma D9143
9. Sodyum sitrat	Sigma Phr1416
10. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma E9884
11. Metafosforik asit	Sigma 239275
12. Sodyum fosfat dibasik	Sigma S9763
13. Formaldehit solüsyonu	Merck F8775
14. Teknik solvent	Merck 1.00983.2500
15 Ksilen	Chemsolute 399.5000
16. Parafin	Patolab Pwax56
17. Hemotoksilen	Bio Optica B005-06014
18. Fosfomoliptikasithidrat	Acros 417895000
19. Bazik fuksin	Sigma 215597
20. Açık yeşil SF	Acros 229770100
21. Nar çekirdeği yağı	Zade Vital
22. MPO Sıçan Elisa Kit	AFG Biosicience, Amerika Birleşik Devletleri
23. Sıçan Tumor TNF- α Elisa Kit	AFG Biosicience, Amerika Birleşik Devletleri
24. Sıçan IL-1 beta Elisa Kit	AFG Biosicience, Amerika Birleşik Devletleri
25. Sıçan IL-6 Elisa Kit	AFG Biosicience, Amerika Birleşik Devletleri
26. Sıçan NF-KB, Elisa Kit	AFG Biosicience, Amerika Birleşik Devletleri
27. Total Antioxidant Status	Rel Assay Diagnostics Rl0017
28. Total Oxidant Status	Rel Assay Diagnostics Rl0024

NACI: Sodyum klorür; EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

3.3.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3.3: Cihazlar ve markaları

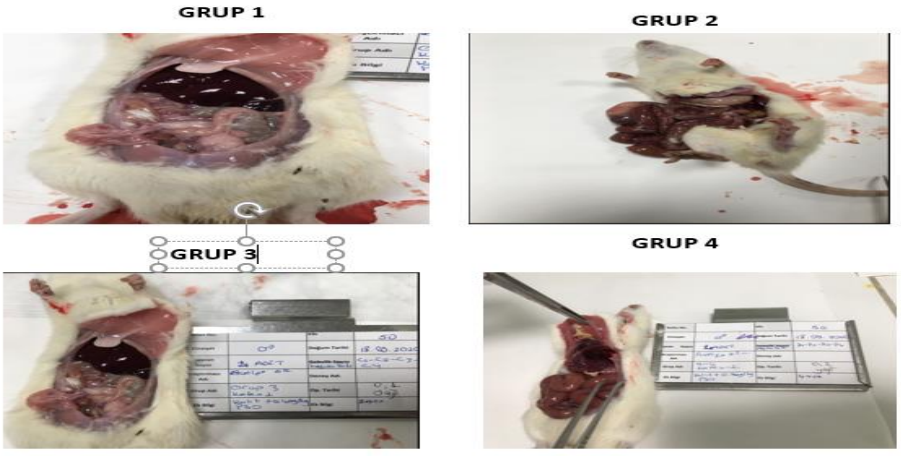
Cihaz	Marka
Doku takip cihazı	Leica 1020, Almanya
Doku gömme cihazı	Leica EG 1160, Almanya
Mikrotom	Leica RM2245, Almanya
Lam kapama cihazı	Leica CV 5030, Almanya
Etüv	Memmert, Almanya
Araştırma mikroskobu	Leica DM6000B, Almanya
Elisa okuyucu	Biotek Synergy IHT micro plate reader, Winooski, VT 05404 0998, Amerika Birleşik Devletleri
Spektrofotometre	Mettler Toledo UV5BIO, Almanya
Vorteks	CAPP CRV-45X, Almanya
Homojenizatör	Heidolph DIAX900, Almanya
Plate karıştırıcı	Heidolph, TITRAMAX 1000, Almanya
Hassas tartı	Ohaus- Adventurer, Amerika Birleşik Devletleri
Pipet	Rainin pipet lite XLS -20
Pipet	Rainin pipet lite XLS -200
Pipet	Rainin pipet lite XLS -1000
Microchannel pipette	Biohit, Finlandiya
Ph metre	Hanna HI 221 pH metre, Amerika Birleşik Devletleri
Boyama cihazı	Leica autostainer, Almanya
İnkübatör	Sanyo mov 112 F, Japonya
Santrifüj	Sigma 3-18k, Almanya
Santrifüj	Universal 320 R-Hettich, Almanya
-80 Dondurucu	New Brunswick Scientific-U570, Amerika Birleşik Devletleri
İnhalasyon anestezi cihazı	Surgivet model 100 vaporizer, Amerika Birleşik Devletleri
Cerrahi aletler	Bahadır Tıbbi Aletler, Türkiye

3.3.4. Kan Örneklerinin Alınması

Deneyin başlamasından 5 gün sonra (21.08.2021) deney süresi tamamlanmıştır. İnhalasyon anestezi makinesi (Surgivet 100 vaporizer, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak kapalı sistemde, 3-5dk. boyunca %10-30 hacim/dk. karbondioksit gazı 3-hayvanlara verilerek ötenazi yapılmıştır. Ardından sıçanların kalp kanı Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi bünyesindeki uzman veteriner hekim tarafından alınmıştır. Alınan kan örnekleri, santrifüj cihazında (Universal 320 R-Hettich, Almanya) 10dk. Bayunca +4°C de 3000 rpm santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pipet aracılığıyla kandan serumlar alınmış, önceden etiketlenmiş eppendorf tüplere eklenmiş ve kullanılmak için -80°C'de saklanmıştır (New Brunswick Scientific-U570, Amerika Birleşik Devletleri).

3.3.5. Doku Örneklerinin Alınması

Deney sonunda anestezi uygulandıktan sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Histopatolojik analizler için alınan doku örnekleri %10'luk fosfat tamponlu nötral formaldehit (Ph 7.4) çözeltisine alınmış ve dokular fiksasyon amacı ile 2 hafta kadar bu solüsyon içinde bekletilmiştir. Alınan dokular resim 3.3 ve Resim 3.4'te gösterilmiştir. Sonrasında dokular akan suda yıkanıp alkol serilerinden geçirilmiş, dehidrate edilip parafine gömülmüştür. Biyokimyasal analizler için kullanılacak dokular ise önceden etiketlenmiş eppendorf tüplere alınmıştır ve çalışmada kullanılmak için -80°C'de saklanmıştır (New Brunswick Scientific-U570, Amerika Birleşik Devletleri).



Resim 3.3: Doku örneklerinin alınması



Resim 3.4: Alınan bağırsak dokuları

3.4. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ

Çalışmadaki kolit değerlendirmesi, Okayasu ve ark.'ın (172) geliştirdiği hastalık aktivite indeksi (HAİ) kullanılarak yapılmıştır. HAİ hesaplamasında kilo kaybı (ağırlık değişimi), dışkı kıvamı ve rektal kanama parametreleri 0 (hasarsız)- 4 (şiddetli hasar) arasında puanlandırılmış ve bu puanlamanın toplamının aritmetik ortalaması alınmıştır. Birey hayvan için en yüksek skor 4 en düşük skor 0 kabul edilmiştir. HAİ parametrelerinin skorlanması Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Hastalık aktivite indeksinin skorlanması (172)

Skor	Ağırlık Kaybı	Dışkı Kıvamı	Rektal Kanam
0	Yok	Normal	Yok
1	%1-5	-	-
2	%5-10	Yumuşak	Mikroskobik kanama
3	%10-20	-	-
4	>%20	İshal	Görünür kan

3.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında alınan örneklerin biyokimyasal analizleri yapılmıştır.

3.5.1. Dokuda Miyeloperoksidaz Düzeyi Tayini

Kolon mukozasındaki MPO aktivitesi, AFG Biosicience'dan satın alınan MPO aktivite test kiti (AFG Biosicience Elisa Kit, Katolog No: EK 720635, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak Biotek Synergy HT Microplate reader cihazında (Biotek Synergy IHT micro plate reader, Winooski, VT 05404 0998, Amerika Birleşik Devletleri) çalışılmıştır. Analiz kit protokolüne göre yapılmıştır. Kit, numunedeki sıçan MPO'sunun kantitatif seviyesi içindir, mikrotitre plakasını kaplamak için saflaştırılmış MPO antikorunu benimseyerek katı faz antikoru yapar.

Analiz için kit kuyularına MPO eklenmiş, MPO antikoru etiketli HRP ile birleştirilmiş, antikor antijen enzimi antikor kompleksi oluşturulması için, yıkamadan sonra tamamen TMB substrat solüsyonu eklenmiştir, HRP enzimi katalizlendiğinde TMB substratı mavi renk olunca bir stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır ve 450 nm dalga boyunda renk değişimi ölçülmüştür. Sonuçlar ng/l cinsinden verilmiştir. Standart eğri grafiği oluşturularak konsantrasyonlar belirlenmiştir.

3.5.2. Serumda TNF α -IL 1β- IL 6 ve NFκB Ölçümü

Serumda TNF α, IL 1β, IL 6 ve NFκB ölçümleri AFG Biosicience'dan satın alınan Elisa kitleri ile çalışılmıştır. Elisa yöntemi, analiz edilen peptid veya proteinin spesifik antikora bağlanması prensibi ile çalışır. Kitte bulunan plaka, analiz edilmek istenilen proteinlere özgü olan antikorla kaplıdır. Standartta ve numunelerdeki proteinler spesifik antikorlara bağlanır. Bağlanmayanlar ise yıkama ile uzaklaştırılır ve proteinlere spesifik antikorlar ilave edilir. Sonrasında tekrardan yıkanır. Substrat solüsyonu ve durdurma solüsyonu ilave edilir. Ölçülmesi istenen proteinlerin miktarı oluşan renk yoğunluğuyla orantılı şekilde kantitatif olarak Elisa okuyucusunda ölçülür.

Tümör nekroz faktörü α ölçümü, AFG Biosicience'den satın alınan TNF α test kiti (AFG Biosicience Elisa Kit, Katolog No: EK 720127, Amerika Birleşik Devletleri), IL-1β ölçümü, IL-1 β test kiti (AFG Biosicience Elisa Kit, Katolog No: EK 720260, Amerika Birleşik Devletleri), IL-6 ölçümü, IL-6 test kiti (AFG Biosicience Elisa Kit,

Katolog No: EK 720267, Amerika Birleşik Devletleri) ve NFκB ölçümü ise, NFκβ test kiti (AFG Biosicience Elisa Kit, Katolog No: EK 720431, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak kit protokollerine göre yapılmıştır. Renk yoğunluğu, numunelerden yakalanan sitokin miktarlarına bağlı olarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Biotek Synergy IHT micro plate reader, Winooski, VT 05404 0998, Amerika Birleşik Devletleri).

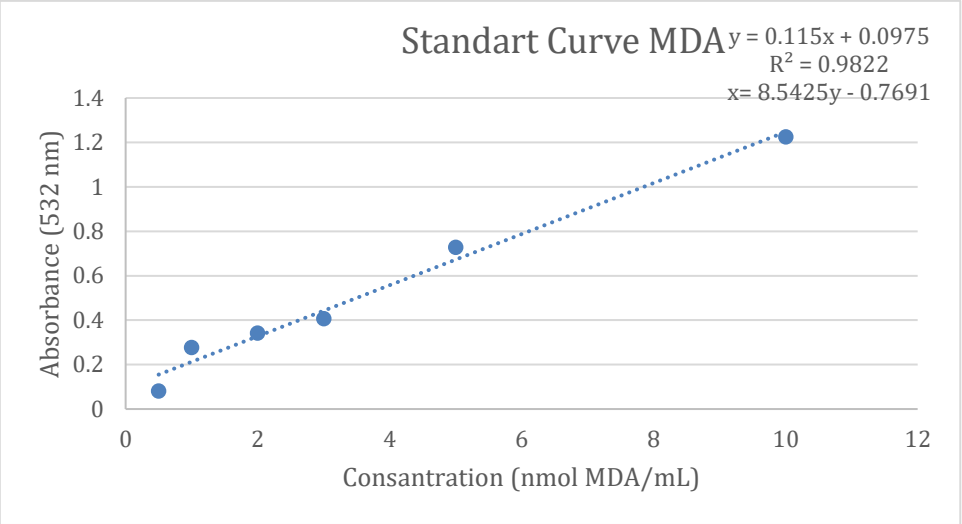
3.5.3. Dokuda Malondialdehit Tayini

Malondialdehit (MDA) tayini, tiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemi ile çalışılmıştır (173). MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile birlikte reaksiyona girmesiyle oluşan kırmızı renk spektrofotometrik (Mettler Toledo UV5BIO, Almanya) olarak ölçülmüştür. TBA ile reaksiyon oluşturan suda çözünür başka maddeleri uzaklaştırmak amacıyla serum lipidleri proteinle fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürülmüştür. Deney protokolü Tablo 3.5'te belirtilmiştir.

Tablo 3.5: Malondialdehit deney protokolü (173)

Deney Protokolü
1. Deney tüpündeki 150 µL dokuya 150 µL fosfotungistik asit ve 1.2 µL H_2SO_4 ilave edildi, magnetik karıştırıcı (Heidolph, TITRAMAX 1000, Almanya) ile karıştırıldı ve 5 dk. bekletildi.
2. Bu karışım 10 dk. Boyunca 1500 g'de santrüfüj (Sigma 3-18k, Almanya) edildi.
3. Kalan çökeleklere 2 µL saf su ilave edildi, tekrardan çözünmesi için vortekslendi (Capp CRV-45X).
4. 500 µL TBA tübe ilave edildi, 100^0C' de 1 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası tüpler 10 dk. boyunca 1000 g'de santrifüj edildi (Sigma 3-18k, Almanya).
6. Oluşan berrak kısım alındı 532 nm'de absorbansları okundu.
7. Bir saat boyunca 50 ^{o}C' de 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan ve 100 µL 0.01 M HCl inkübe edildi. Bu bileşik hidroliz edildikten sonra oluşan MDA'ya 10, 5, 3,2,1, 0.5 nmol/ mL olacak şekilde çalışma standartları hazırlandı.
8. Verilerle standart eğri grafiği oluşturularak konsantrasyonlar belirlendi (Şekil 3.2).

H_2SO_4: Sülfirik asit; TBA: Tiyobarbitürik asit; HCl: Hidrojen klorür; MDA: Malondialdehit



Şekil 3.2: Malondialdehit konsantrasyon grafiği

3.5.4. Dokuda Glutatyon Tayini

Dokudaki glutatyon, Ellman'ın reaktifi yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (174). Ellmann ayıracı, sülfidril grupları ile 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit (DTNB) arasındaki reaksiyon sonucu ortaya çıkan renkli ürün spektrofotometrik (Mettler Toledo UV5BIO, Almanya) olarak ölçülmüştür. Doku homojenizatı 10 dk. 3000 rpm de santrifüj (Sigma 3-18k, Almanya) edilmiş ve süpernatant alınarak çalışılmıştır. Deney için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: Glutatyon tayini için gerekli çözeltilerin hazırlanması (174)

Deney için Gerekli Çözeltiler
1.Sodyum sitrat çözeltisinin hazırlanması (%1 g): 1g sodyum sitrat tartıldı, distile suda çözdürüldü ve hacmi 100 mL olana kadar distile su ilave edildi.
2. Ellmann ayıracının hazırlanması (%40 mg DTNB): Sodyum sitrat çözeltisinde (%1 g) 40 mg DTNB çözdürüldü. Hacmi 100 mL olana kadar %1 g lık sodyum sitrat çözeltisi eklendi.
3. Proteinsizleştirme çözeltisinin hazırlanması: 2 g EDTA-Na, 1,67 g metafosforik asit ve 0,30 g NaCI teker teker distile suda çözdürüldü ve birleştirildi. Hacmi 100 mL olana kadar distile su eklendi.
4. Disodyum fosfat çözeltisinin hazırlanması (0,3 M): Biraz distile suda 4,26g Na_2HPO_4 çözdürüldü. Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

DTNB: 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit; EDTA-Na: Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu; NACI: Sodyum klorür; Na2HPO4: Disodyum fosfat

Deney tüpüne 0,2 ml supernatant eklenerek vortex (CAPP CRV-45X, Almanya) ile karıştırılmıştır. Karışıma proteinsizleştirme çözeltisi 0,3 ml eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Sonrasında oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiş ve 10 dk. boyunca 4000 rpm'de santrifüj (Sigma 3-18k, Almanya) edilmiştir. Çökelti atılarak supernatant alınmıştır. Deney tüplerine eklenen numune ve kör işaretlenmiştir. Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Köre karşı 412 nm'de ölçülmüştür.

Tablo 3.7: Kör numune dağılımı

	Kör	Numune
Distile su	0,2 ml	-
Süpernatant	-	0,2 ml
Na_2HPO_4	0,8ml	0,8ml
Ellmann ayıracı	0,1 ml	0,1 ml

Na2HPO4: Disodyum fosfat

3.5.5. Dokuda Antioksidan ve Total Oksidasyon Düzeyleri

Dokuların total antioksidan seviyeleri (TAS) sıçanlara özgü TAS kiti (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kullanılarak spetrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu yöntemde, numunedeki antioksidanlar, koyu mavi yeşil renge sahip ABTS radikalini indirgenmiş ABTS formuna indirger. Absorbans değişimi 660 nm'de numunenin total antioksidan düzeyiyle ilişkilendirilir. Sonuçlar mmol Trolox eqv/L olarak hesaplanır (175).

Dokuların total oksidasyon seviyeleri (TOS) sıçanlara özgü TOS kiti (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kullanılarak spetrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu yöntemde, numunede bulunan oksitleyiciler, ferröz demir iyonunu okside ederek ferrik demire okstitler. Reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller aracılığıyla oksidasyon reaksiyonu, uzatılır. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri olarak verilir.

3.6. HİSTOLOJİK VE MAKROSKOBİK ANALİZLER

3.6.1. Histolojik İnceleme

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda alınan doku örneklerinin histopatolojik analizleri yapılmıştır.

3.6.2. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

Doku örnekleri, +4°C'de %10'luk nötral formaldehit solüsyonu olan doku kaplarına alınarak fikse edilmiştir. Dokuların histolojik doku takibinde dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir. Sonrasında ksilen ile şeffaflandırılmıştır. En son sıvı parafinde gömme öncesi filtrasyon sağlanmıştır. Histolojik doku takibinden sonra tüm örnekler parafin bloklara gömülerek bloklanmıştır. Doku takip aşamaları Tablo 3.8'dedir.

Tablo 3.8: Doku takip aşamaları (176)

Kullanılan Kimyasal	Süre
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1,5 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilen 1	1 saat
Ksilen 2	1 saat
Parafin 1	1 saat
Parafin 2	3 saat

Histolojik incelemede parafin bloklardan 5 μm kalınlığında kesitler alınmıştır ve Hematoksilen ve Eozine tekniği ve Masson Trikrom tekniğine göre boyanarak (Tablo 3.9; Tablo 3.10) histopatolojik inceleme (Tablo 3.11) yapılmıştır. Boyanan kesitler ışık

mikroskobu (Leica DM 6000, Almanya) ve Leica Application Suite program yardımıyla fotoğraflanmıştır ve incelenmiştir (177,178).

Tablo 3.9: Hematoksilen ve Eozine boyama aşamaları (176)

İstasyon	Süre	Kullanılan malzeme
Etüv	10 dk	
Fırın	3 dk	
	3 dk	Ksilen
	3 dk	Ksilen
	5 dk	Ksilen
	2 dk	%100'lük etil alkol
	2 dk	%96'lık etil alkol
	2 dk	Distile su
	1 dk	Hematoksilen
	4 dk	%0,25'lik amonyak
Yıkama	1 dk	
	5 dk	Distile su
	1 dk	Eozine
	1 dk	Distile su
	2 dk	%1'lik asit alkol
	1 dk	%96'lik etil alkol
	1 dk	%96'lik etil alkol
	1 dk	%100'lük etil alkol
	5 dk	Ksilen 1
Çıkış	5 dk	Ksilen 2

Tablo 3.10: Masson Trikrom boyama aşamaları (179)

İstasyon	Süre	Kullanılan malzeme
Etüv	10 dk	
Fırın	3 dk	
	3 dk	Ksilen
	3 dk	Ksilen
	5 dk	Ksilen
	2 dk	%100'lük etil alkol
	2 dk	%96'lık etil alkol
	2 dk	%70'lik etil alkol
	1 dk	Distile su
	4 dk	Hematoksilen
	1 dk	%1'lik asit alkol
Yıkama	1 dk	
	5 dk	Asit **f**uksin
	1 dk	Distile su
	5 dk	Fosfomolibdik asit
	6 dk	Light green (Metilen mavisi)
	1 dk	Distile su
	2 dk	%1'lik asit alkol
	1 dk	%70'lik etil alkol
	1 dk	%80'lik etil alkol
	1 dk	%96'lık etil alkol
Çıkış	1 dk	%100'lük etil alkol
Manuel	5 dk	Ksilen 1
Manuel	5 dk	Ksilen 2

Tablo 3.11: Histomorfolojik değerlendirme (177,178)

Skor	Parametre
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Epitel hasarı
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika mukozada ödem
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika mukozda infiltrasyon
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika mukozda kapiller konjesyon
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Bağırsak bezlerinde hasar
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika submukozada ödem
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika submukozada infiltrasyon
0 yok; 1 az; 2 orta; 3 şiddetli	Tunika submukozada kapiller konjesyon

3.6.3. Makroskobik Değerlendirme

Makroskobik hasarın skorlamasında Tablo 3.12'de belirtilen kriterler kullanılmıştır (180).

Tablo 3.12: Makroskobik hasar skorlaması (180)

0	Hasar yok
1	Fokal hiperemi var, ülser yok
2	Hiperemi veya kolon duvarında kalınlaşma olmaksızın lineer ülserasyon
3	Bir bölgede inflamasyon ile beraber lineer ülserasyon
4	İki ya da daha fazla bölgede ülserasyon ve inflamasyon bölgesi
5	İki ya da daha fazla majör ülserasyon ve inflamasyon, bir ya da daha fazla yerdeki hasarın kolonun 1 cm'den daha fazla uzunluğunu tutması
6-10	Ülser ve inflamasyon bölgesinin 2 cm'den daha fazla kolon uzunluğunu tutması (her 1 cm'lik hasar için skor bir birim artırılır).

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin dağılımının normal dağılıma uygunluğunun kontrolü Kolmogorov-Smirnov testi ile sağlanmıştır. Normal dağılım gösteren veriler ikili karşılaştırmalar için Independent Samples t-test; normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise Mann-Whitney U test kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip verilerde 4 grup arası ortalama karşılaştırmada Tek Yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Hangi grubun anlamlı fark yarattığı Post-Hoc test ile kontrol edilmiştir. Normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise 4 grup arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis test kullanılmış ve hangi grubun anlamlı fark yarattığı Bonferroni düzeltmeli ikili karşılaştırma testi ile yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler Ortalama ± Standart sapma (Ort ± SS) şeklinde verilmiştir. Sonuçlar $p<0,05$ için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Ağırlık değişim yüzdesi, TNF α, IL-1β, IL-6, NFκB, MPO, MDA, GSH, TAS, TOS, HAİ ve makrosbik skorların dört grup arasındaki karşılaştırmalarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Parametrelerin gruplar arası karşılaştırma

	Deney Grupları			
	Grup 1 (n=8)	**Grup 2 (n=8)**	**Grup 3 (n=8)**	**Grup 4 (n=6)**
	Ort ± SS	**Ort ± SS**	**Ort ± SS**	**Ort ± SS**
Ağırlık Değişimi %	10,8 ± 7,6	-7,6 ± 9,2	5,7 ± 9,2	-5,4 ± 12,1
HAİ	0 ± 0	2,65 ± 0,437	0,400 ± 0,453	1,216± 0,491
MPO	3274 ± 1068,69	7783,50 ± 2840,04	2659,25± 1493,95	4082,33± 2273,73
TNF α	274,01 ± 44,46	635,95 ±146,23	295,98 ±69,66	254,79 ±50,74
IL 1β	31,40 ± 4,10	63,14 ± 17,49	26,16 ± 6,56	26,40±3,24
IL 6	188,65 ± 28,26	336,84 ± 80,91	173,82 ± 28,18	182,54 ± 34,48
NFκB	1417,94 ± 235,54	3731,80 ± 1109,16	1687,66 ± 436,72	2106,38 ± 542,51
MDA	1,71± 0,90	11,17 ± 3,95	2,73± 0,91	3,56± 2,47
GSH	189,20± 71,92	111,64 ± 64,61	254,68± 136,43	338,90± 228,33
TAS	5,87± 1,12	1,37± 1,00	5,77± 3,87	2,76± 2,80
TOS	127,12± 30,27	173,25± 26,76	122,75± 26,45	133,16± 22,65
Makroskobik Skor	0,50 ± 0,53	7,37±1,18	3 ± 1,62	8,00 ± 5,33

Kolmogorov-Smirnov testi; HAİ: Hastalık aktivite indeksi; MPO: Miyeloperoksidaz; TNF α: Tümör nekroz faktörü α; IL 1β: İnterlökin 1β; IL 6: interlökin 6; NFκB; Nükleer faktör kappa B; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; TAS: Total antioksidan seviyesi; TOS; Total oksidant seviyesi

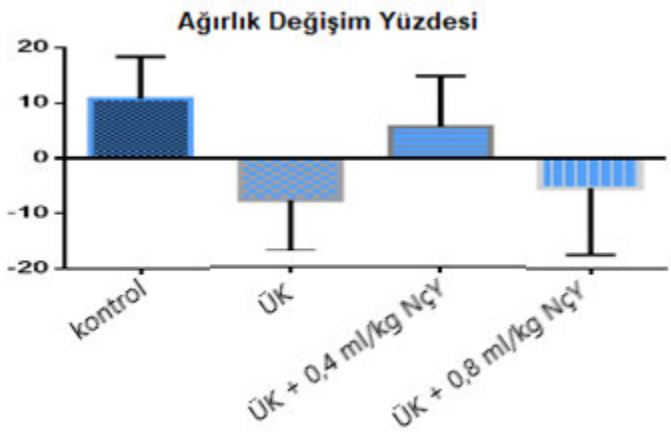
4.1. AĞIRLIK DEĞİŞİM YÜZDESİ

Ağırlık değişim yüzdesi kontrol grubunda 10,8 ± 7,6, ÜK grubunda -7,6 ± 9,2, ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY grubunda 5,7 ± 9,2, ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY grubunda -5,4 ± 12,1 olarak bulunmuştur. Ağırlık değişim yüzdesinin değişkeninin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.2, Şekil 4.1.); kontrol grup ortalaması, ÜK grup (ortalamalar farkı=18,4) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grup ortalamasından (ortalamalar farkı=16,2) anlamlı derecede yüksektir. ÜK grup ortalaması ise ÜK+0,4 ml/kg NÇY grup ortalamasından (ortalamalar farkı=-13,3) anlamlı şekilde düşüktür ($p<0,05$).

Tablo 4.2: Deney gruplarında ağırlık değişimlerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	10,8 ± 7,6; -7,6 ± 9,2	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	10,8 ± 7,6; 5,7 ± 9,2	0,195
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	10,8 ± 7,6; -5,4 ± 12,1	0,081
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	-7,6 ± 9,2; 5,7 ± 9,2	**0,007**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	-7,6 ± 9,2; -5,4 ± 12,1	0,755
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	5,7 ± 9,2; -5,4 ± 12,1	0,142

T-test; $p<0,05$; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.1: Deney gruplarında ağırlık değişimleri

4.2. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ

Hastalık aktivite indeksi kontrol grubunda 0 ± 0, ÜK grubunda 2,65 ± 0,43, ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY grubunda 0,40 ± 0,45, ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 1,21± 0,49 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). HAİ'nin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda kontrol grubu ortalamasının ÜK grubu (ortalamalar farkı=2,65), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=0,40) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=1,21) ortalamasından anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. ÜK grup ortalamasının ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=2,25) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=1,43) ortalamasından anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca ÜK+0,4 ml/kg NÇY grup ortalamasının, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=-0,81) ortalamasından anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.3: Deney gruplarında hastalık aktivite indeksinin karşılaştırılması

Grup adı	Ort ± SS	p
K; ÜK	0 ± 0; 2,65 ± 0,43	**<0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	0 ± 0; 0,40 ± 0,45	**0,027**
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	0 ± 0; 1,21± 0,49	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	2,65 ± 0,43; 0,40 ± 0,45	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	2,65 ± 0,43; 1,21± 0,49	**0,002**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	0,40 ± 0,45; 1,21± 0,49	**0,017**

Mann-Whitney U test; $p<0,05$; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı

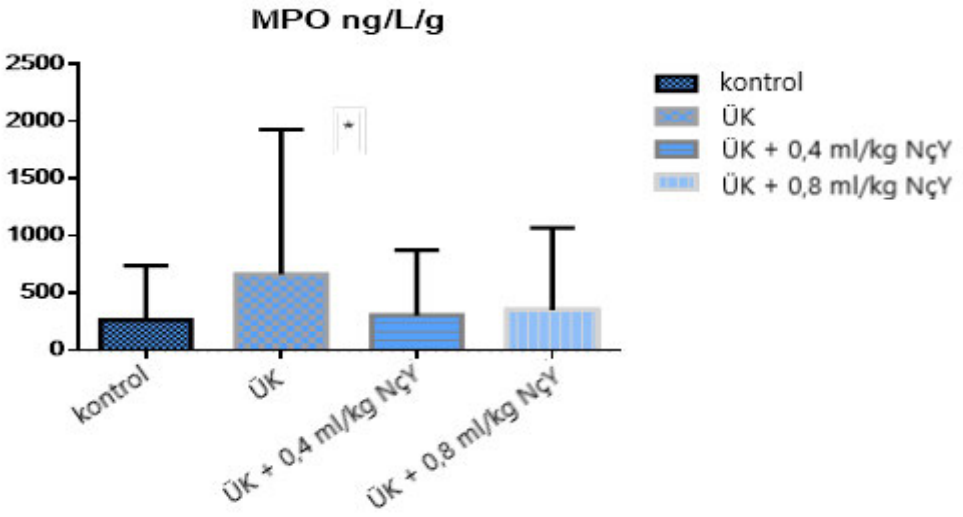
4.3. DOKUDA MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ

Dokuda nötrofil infiltrasyonu belirtisi olan MPO kontrol grubunda 3274 ± 1068,69 ng/L/g, ÜK grubunda 7783,50 ± 2840,04 ng/L/g, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 2659,25± 1493,95 ng/L/g, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda 4082,33± 2273,73 ng/L/g olarak saptanmıştır. MPO'nun gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.4, Şekil 4.2) ÜK grup ortalaması, kontrol grubu (ortalamalar farkı=4509,5), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama fark=5124,25) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=3701,17) ortalamasından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.4: Deney gruplarında miyeloperoksidaz aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K**;** ÜK	3274 ± 1068,69; 7783,50 ± 2840,04	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	3274 ± 1068,69; 2659,25± 1493,95	0,248
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	3274 ± 1068,69; 4082,33± 2273,73	0,439
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	7783,50 ± 2840,04; 2659,25± 1493,95	**0,002**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	7783,50 ± 2840,04; 4082,33± 2273,73	**0,039**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	2659,25± 1493,95; 4082,33± 2273,73	0,302

Mann-Whitney U test; $p<0,05$; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.2: Deney gruplarında miyeloperoksidaz aktivitesi

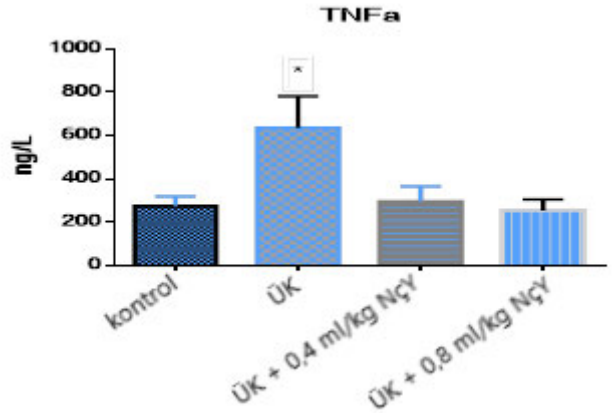
4.4. SERUMDA TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR α DÜZEYLERİ

Proinflamatuar sitokin olarak bilinen TNF- α kontrol grubunda 274,01 ± 44,46 ng/L, ÜK grubunda 635,95 ±146,23 ng/L, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu 295,98 ±69,66 ng/L, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda 254,79 ±50,74 ng/L olarak belirlenmiştir. TNF-α' nın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.5 ve Şekil 4.3) ÜK grup ortalaması, kontrol grubu (ortalama farkı=361,94), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=339,97) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=381,16) ortalamasından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

Tablo 4.5: Deney gruplarında tümör nekroz faktörü α düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	274,01 ± 44,46; 635,95 ±146,23	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	274,01± 44,46; 295,98 ±69,66	0,345
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	274,01 ± 44,46; 254,79 ±50,74	0,380
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	635,95 ±146,23; 295,98 ±69,66	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	635,95 ±146,23; 254,79 ±50,74	**0,003**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	295,98 ±69,66; 254,79 ±50,74	0,124

Mann-Whitney U test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.3: Deney gruplarında tümör nekroz faktörü α düzeyleri

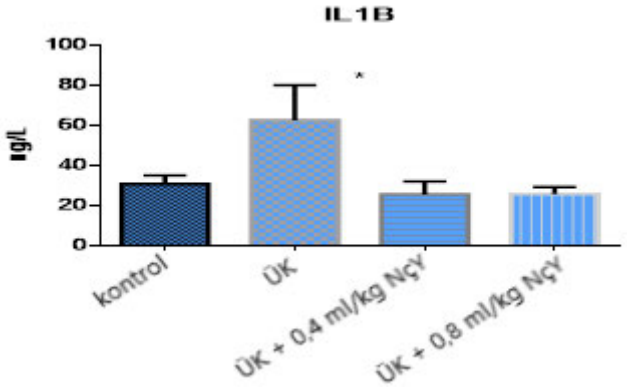
4.5. SERUMDA İNTERLÖKİN 1B DÜZEYLERİ

Proinflamatuar sitokin olarak bilinen IL-1β değişkeni kontrol grubunda 31,40 ± 4,10 ng/L, ÜK grubunda 63,14 ± 17,49 ng/L, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 26,16 ± 6,56 ng/L, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 26,40±3,24 ng/L olarak bulunmuştur. IL-1β'nın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.6 ve Şekil 4.4) kontrol grup ortalaması, ÜK grubu (ortalama farkı=-31,71) ortalamasından istatistiksel olarak düşük, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=5) ortalamasından da anlamlı derece yüksek bulunmuştur. ÜK grup ortalaması ise ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=36,98) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=36,74) ortalamasından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 4.6: Deney gruplarında interlökin-1β düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	31,40 ± 4,10; 63,14 ± 17,49	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	31,40 ± 4,10; 26,16 ± 6,56	0,172
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	31,40 ± 4,10; 26,40±3,24	**0,028**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	63,14 ± 17,49; 26,16 ± 6,56	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	63,14 ± 17,49; 26,40±3,24	**0,003**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	26,16 ± 6,56; 26,40±3,24	0,661

Mann-Whitney U test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.4: Deney gruplarında interlökin- 1β düzeyleri

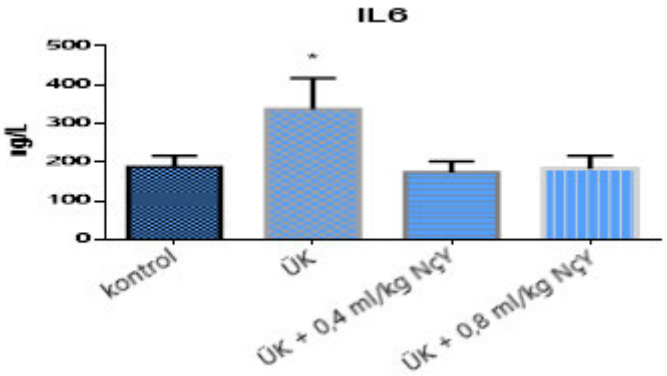
4.6. SERUMDA İNTERLÖKİN 6 DÜZEYLERİ

Proinflamatuar sitokin olarak bilinen IL-6 kontrol grubunda 188,65 ± 28,26 ng/L, ÜK grubunda 336,84 ± 80,91ng/L, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 173,82 ± 28,18 ng/L, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 182,54 ± 34,48 ng/L olarak saptanmıştır. IL-6'nın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.7 ve Şekil 4.5); kontrol grubunda ölçülen IL- 6 ortalaması, ÜK grubu (ortalama farkı=-148,19) ortalamasından anlamlı derecede düşüktür. ÜK grup ortalaması ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=163,02) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=154,3) ortalamasından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Tablo 4.7: Deney gruplarında interlökin 6 düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	188,65 ± 28,26; 336,84 ± 80,91	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	188,65 ± 28,26; 173,82 ± 28,18	0,248
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	188,65 ± 28,26; 182,54 ± 34,48	0,558
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	336,84 ± 80,91; 173,82 ± 28,18	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	336,84 ± 80,91; 182,54 ± 34,48	**0,005**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	173,82 ± 28,18; 182,54 ± 34,48	0,661

Mann-Whitney U test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.5: Deney gruplarında interlökin-6 düzeyleri

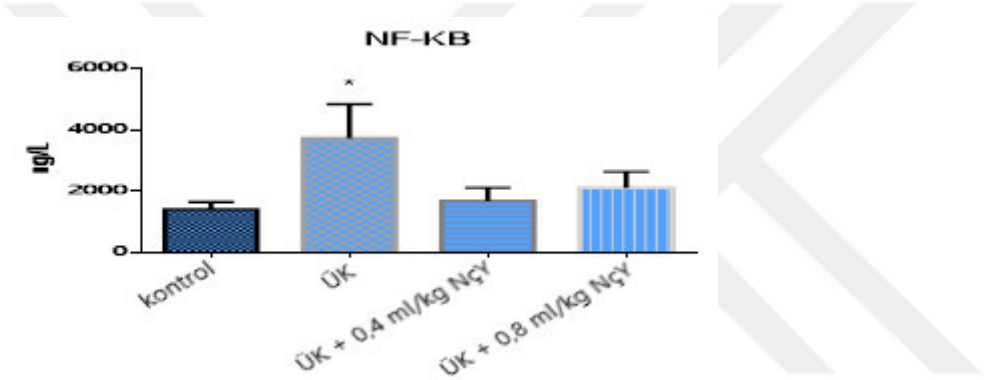
4.7. SERUMDA NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B DÜZEYLERİ

İmmün yanıtta ve inflamasyon sürecinde rol alan NF-κB kontrol grubunda 1417,94 ± 235,54 ng/L, ÜK grubunda 3731,80 ± 1109,16 ng/L, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 1687,66 ± 436,72 ng/L, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 2106,38 ± 542,51 ng/L olarak belirlenmiştir. NF-κB 'nin gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.8, Şekil 4.6); kontrol grubu ortalamasının ÜK grubu (ortalamalar farkı=-2313,86), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=-269,72) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu ortalamasından (ortalama farkı=-688,44) anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05). ÜK grup ortalamasının ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=-2044,14) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu ortalamasından (ortalama farkı=1625,42) anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Tablo 4.8: Deney gruplarında nükleer faktör kappa B düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	1417,94 ± 235,54; 3731,80 ± 1109,16	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	1417,94 ± 235,54; 1687,66 ± 436,72	**0,027**
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	1417,94 ± 235,54; 2106,38 ± 542,51	**0,040**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	3731,80 ± 1109,16; 1687,66 ± 436,72	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	3731,80 ± 1109,16; 2106,38 ± 542,51	**0,008**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	1687,66 ± 436,72; 2106,38 ± 542,51	0,057

Mann-Whitney U test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.6: Deney gruplarında nükleer faktör kappa B düzeyleri

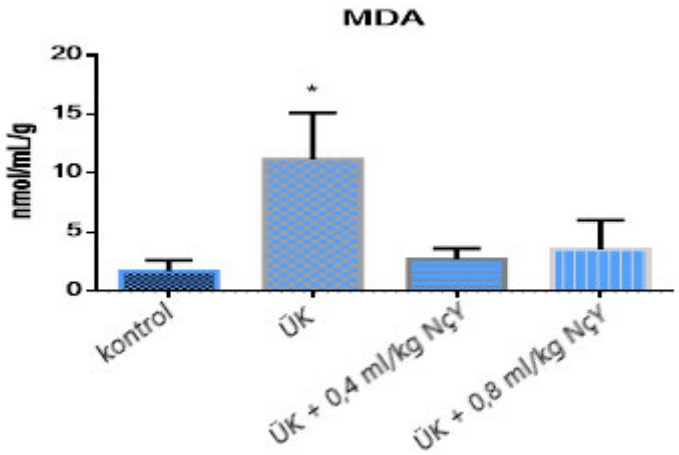
4.8. DOKUDA MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

Dokuda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA kontrol grubunda 1,71± 0,90 nmol/mL/g, ÜK grubunda 11,17 ± 3,95 nmol/mL/g, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 2,73± 0,91 nmol/mL/g, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 3,56± 2,47 nmol/mL/g olarak bulunmuştur. MDA'nın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.9 ve Şekil 4.7) ÜK grup ortalaması, kontrol grubu (ortalama farkı=9,46), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=8,44) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=7,61) ortalamasından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,05). ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu ortalaması, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=-0,83) ortalamasından düşüktür ama istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır.

Tablo 4.9: Deney gruplarında malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	1,71± 0,90; 11,17 ± 3,95	**0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	1,71± 0,90; 2,73± 0,91	0,074
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	1,71± 0,90; 3,56± 2,47	0,196
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	11,17 ± 3,95; 2,73± 0,91	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	11,17 ± 3,95; 3,56± 2,47	**0,002**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	2,73± 0,91; 3,56± 2,47	0,366

Mann-Whitney U test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.7: Deney gruplarında malondialdehit düzeyleri

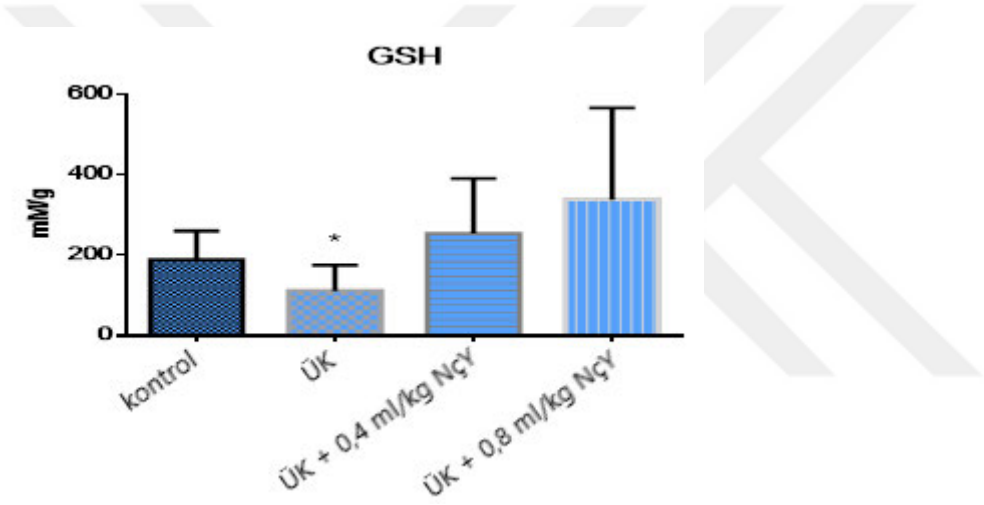
4.9. DOKUDA GLUTATYON DÜZEYLERİ

Dokudaki endojen antioksidan glutatyon miktarının göstergesi olan GSH kontrol grubunda 189,20± 71,92 mM/g, ÜK grubunda 111,64 ± 64,61 mM/g, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 254,68± 136,43 mM/g, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 338,90± 228,33 mM/g olarak belirlenmiştir. GSH' nın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.10 ve Şekil 4.8) ÜK grup ortalaması, kontrol grubu (ortalama farkı=-77,56), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=-143,04) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=-227.25) ortalamasından anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 4.10: Deney gruplarında glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	189,20± 71,92; 111,64 ± 64,61	**0 ,040**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	189,20± 71,92; 254,68± 136,43	0,250
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	189,20± 71,92; 338,90± 228,33	0,103
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	111,64± 64,61; 254,68± 136,43	**0,018**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	111,64± 64,61; 338,90± 228,33	**0,019**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	254,68± 136,43; 338,90± 228,33	0,405

T-test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.8: Deney gruplarında glutatyon düzeyleri

4.10. DOKUDA TOTAL ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ

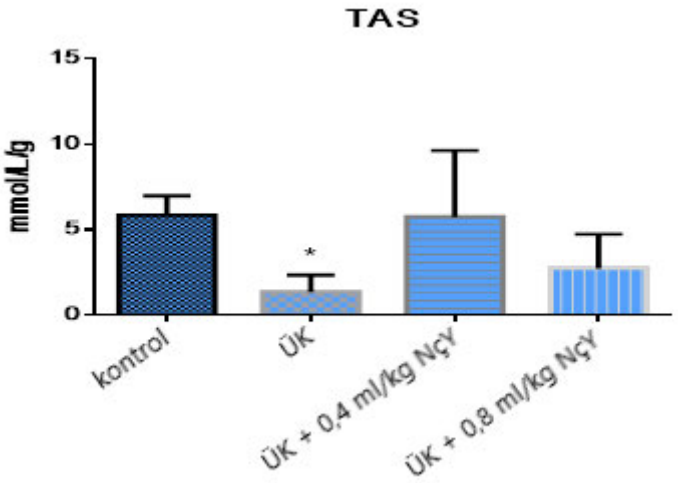
Antioksidan durumu gösteren TAS kontrol grubunda 5,87± 1,12 mmol/L/g, ÜK grubunda 1,37± 1,00 mmol/L/g, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 5,77± 3,87 mmol/L/g, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 2,76± 2,80 mmol/L/g olarak bulunmuştur. TAS'ın gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4. 11, Şekil 4.9); kontrol grubu ortalamasının ÜK grubu (ortalamalar farkı=4,49) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=3,1) ortalamasından anlamlı derecede yüksektir (p<0,05). ÜK grup ortalamasının ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=-4,39) ortalamasından anlamlı derecede düşüktür (p<0,05). ÜK grup ortalaması, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=-1,38) ortalamasından düşüktür fakat istatistiksel bir fark

bulunamamıştır. Ayrıca ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu ortalaması, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=3,61) ortalamasından yüksektir fakat istatistiksel bir fark saptanamamıştır.

Tablo 4.11: Deney gruplarında total antioksidan düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	5,87± 1,12; 1,37± 1,00	**<0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	5,87± 1,12; 5,77± 3,87	0,947
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	5,87± 1,12; 2,76± 2,80	**0,014**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	1,37± 1,00; 5,77± 3,87	**0,008**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	1,37± 1,00; 2,76± 2,80	0,215
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	5,77± 3,87; 2,76± 2,80	0,134

T-test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



Şekil 4.9: Deney gruplarında total antioksidan düzeyleri

4.11. DOKUDA TOTAL OKSİDAN DÜZEYLERİ

Oksidan seviyelerini gösteren TOS kontrol grubunda 127,12± 30,27 mmol/L/g, ÜK grubunda, 173,25± 26,76 mmol/L/g, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 122,75± 26,45 mmol/L/g, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 133,16± 22,65 mmol/L/g olarak belirlenmiştir. TOS'un gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.12); ÜK grubu ortalaması, kontrol grubu (ortalamalar farkı=46,13), ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu

(ortalamalar farkı=50.5) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=40,09) ortalamasından anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p<0,05).

Tablo 4.12: Deney gruplarında total oksidan düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	127,12± 30,27; 173,25± 26,76	**0,006**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	127,12± 30,27; 122,75± 26,45	0,763
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	127,12± 30,27; 133,16± 22,65	0,690
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	173,25± 26,76; 122,75± 26,45	**0,002**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	173,25± 26,76; 133,16± 22,65	**0,012**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	122,75± 26,45; 133,16± 22,65	0,454

T-test; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı

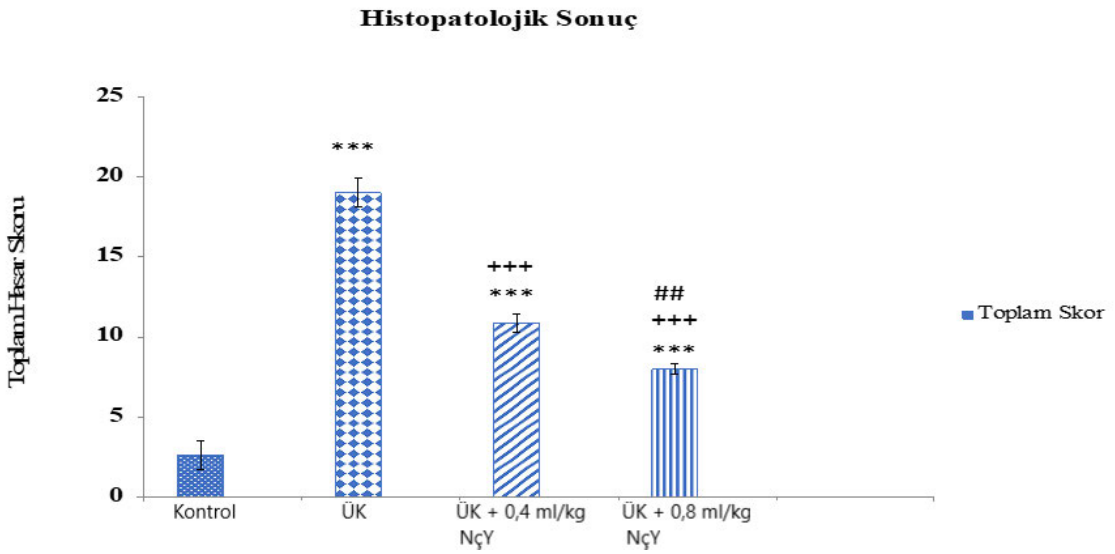
4.12. HİSTOLOPATOLOJİK SONUÇLAR

Toplam hasar skoru kontrol grubunun 2,63 ± 0,88, ÜK grubunda 19,00 ± 0,90, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 10,88 ± 0,58, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 8,00 ± 0,30 olarak saptanmıştır. Gruplar arasındaki histopatolojik toplam skorun karşılaştırmaları Tablo 4.13'te ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. ÜK grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede hasar bulgusuna rastlanılmıştır. 0,4 ml ve 0,8 ml NÇY suplementasyonu uygulanan gruplarda ÜK tedavisi anlamlı şekilde gerçekleşmiştir. Toplam hasar skoru bu iki grupta ÜK grubuna göre anlamlı derecede düşüktür. 0,4 ml/kg ve 0,8 ml/kg NÇY suplementasyonu uygulanan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunun toplam hasarı daha iyi azalttığı gözlemlendi.

Tablo 4.13: Deney gruplarının histopatolojik hasar skorlamasının karşılaştırılması

Grup	Toplam Hasar Skoru (mm^3±SS)	p
K; ÜK	2,63 ± 0,88 & 19,00 ± 0,90	**<0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	2,63 ± 0,88 & 10,88 ± 0,58	**<0,001**
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	2,63 ± 0,88 & 8,00 ± 0,30	**<0,001**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	19,00 ± 0,90 & 10,88 ± 0,58	**<0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	19,00 ± 0,90 & 8,00 ± 0,30	**<0,001**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	10,88 ± 0,58 & 8,00 ± 0,30	**0,007**

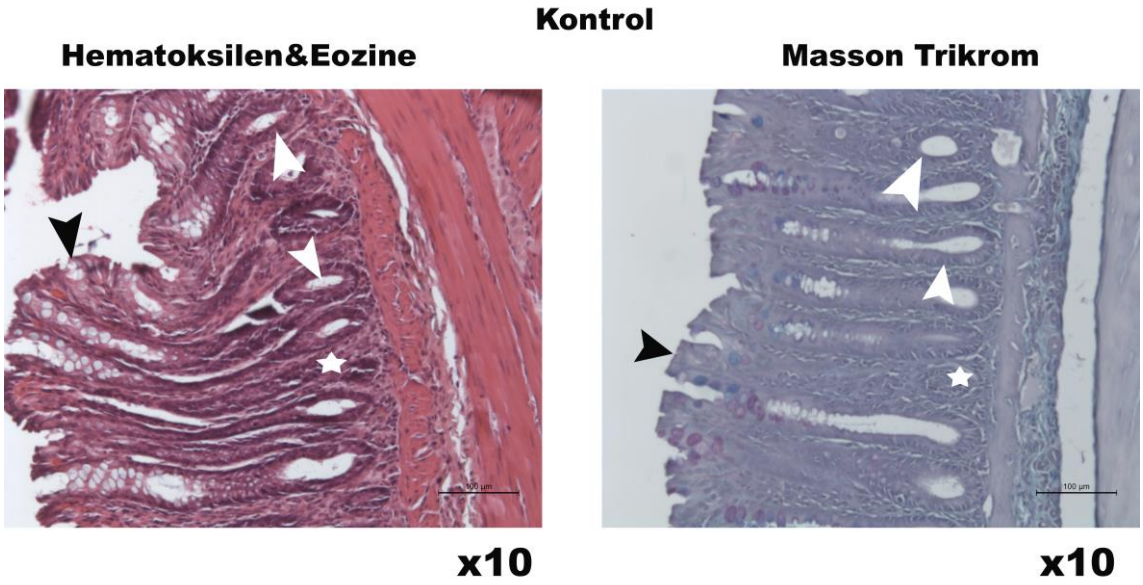
Oneway ANOVA testi; p<0,05; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı



***p<0,001 kontrole göre karşılaştırma; $^{+++}$p<0,001 Ülseratif Kolite göre karşılaştırma; $^{\#\#}$ p<0,01 Ülseratif Kolit + 0,4 ml/kg'a göre karşılaştırma

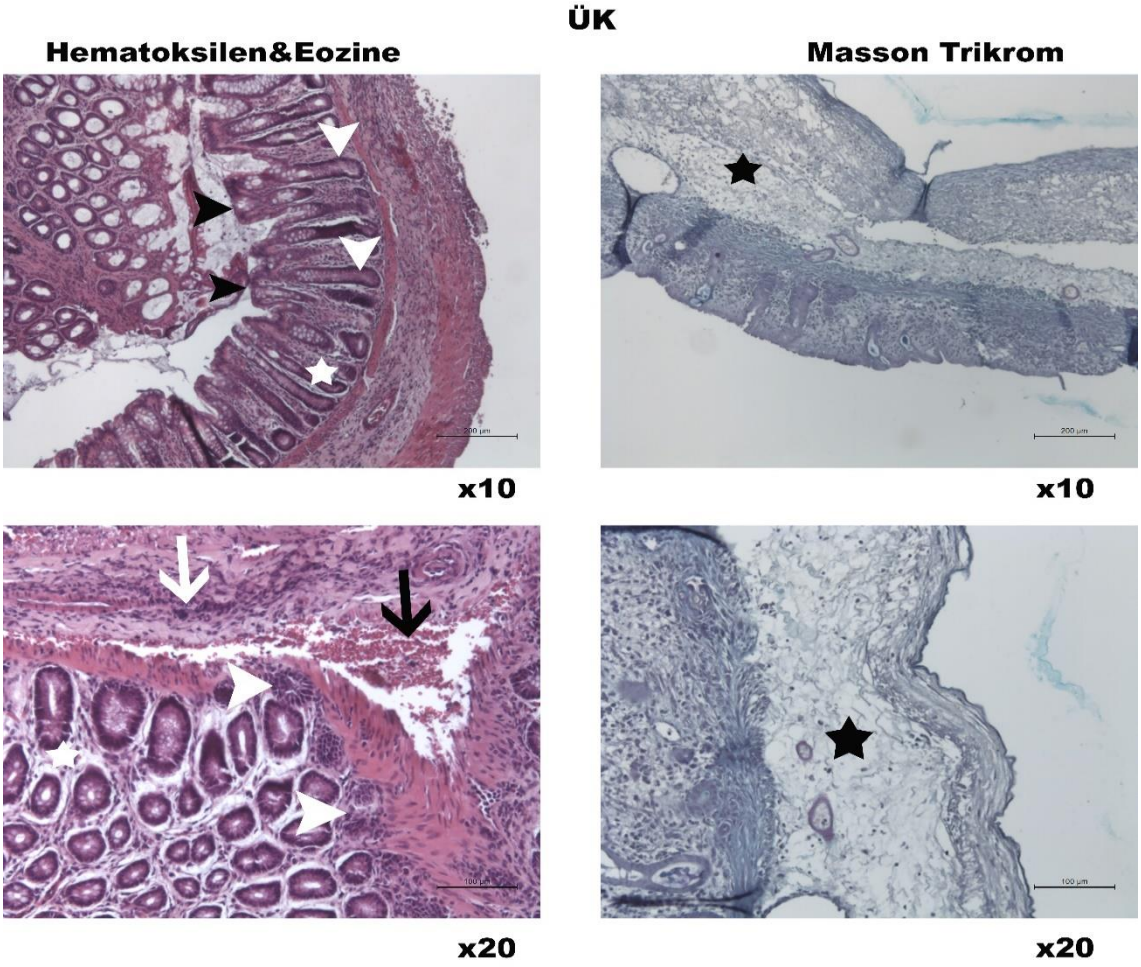
Şekil 4.10: Deney gruplarının histopatolojik hasar skorlaması

Resim 4.1’de kontrol grubuna ait bağırsak kesitleri görülmektedir. Resimlerde siyah ok başları bağırsaktaki epitel dokusunu, beyaz ok başları bağırsak bezlerini ve beyaz yıldız ise tunika mukozadaki bağ dokusunu göstermektedir. Resimlerde Masson trikrom ve Hematoksilen Eozin tekniği kullanılmıştır. Her iki boyamada bağırsak yapısındaki histolojik yapılar olağandır. Resimler x10’luk büyütmede ve skala 200 mikrometredir.



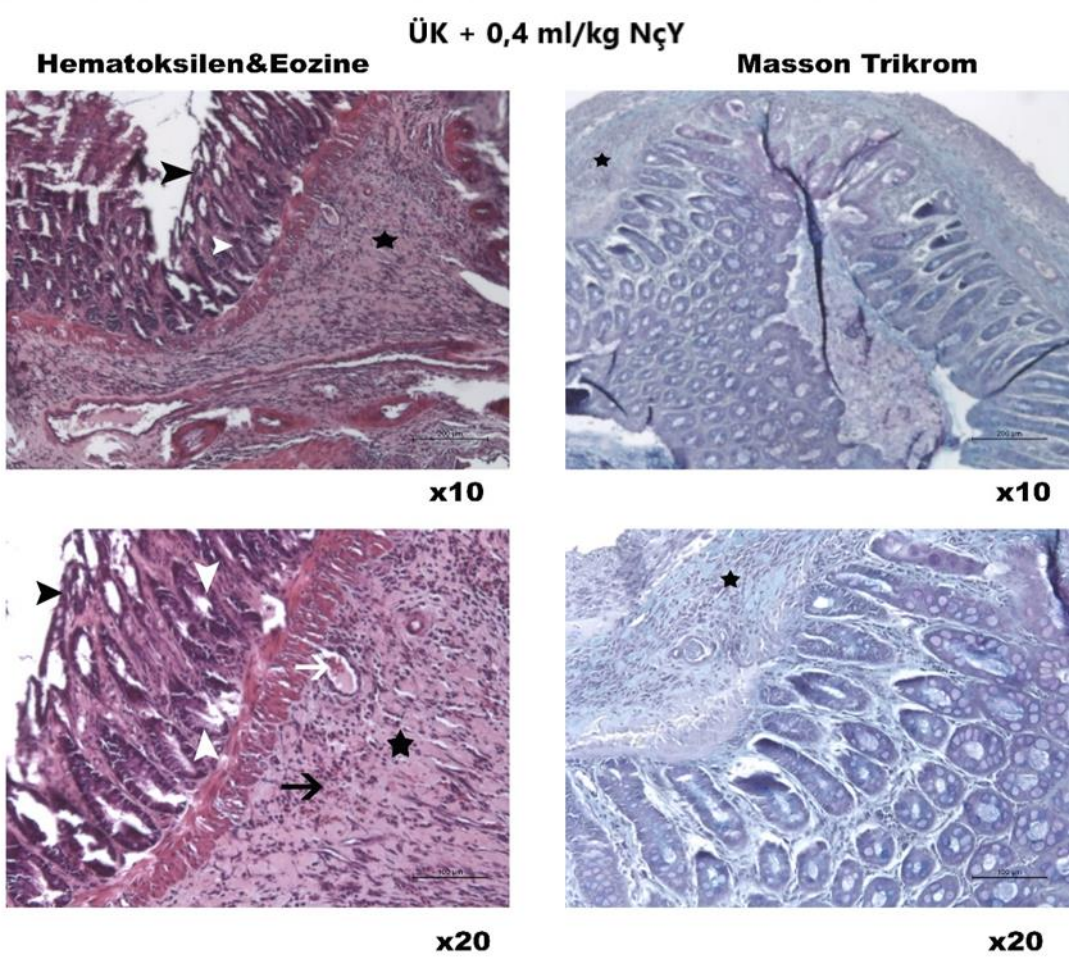
Resim 4.1: Kontrol grubuna ait bağırsak kesitleri

Resim 4.2’de ÜK grubuna ait bağırsak kesitleri görülmektedir. Resimlerde siyah ok başları bağırsaktaki epitel dokusunu, beyaz ok başları bağırsak bezlerini, beyaz yıldız tunika mukozadaki bağ dokusunu, siyah yıldız ise tunika submukozadaki bağ dokusunu, siyah ok tunika submukozadaki kanamayı ve beyaz ok ise yangısal infiltrasyonu göstermektedir. Resimlerde Masson trikrom ve Hematoksilen Eozin tekniği kullanılmıştır. Ülseratif kolit grubunda tunika mukozadaki bağırsak bezleri hasara uğramıştır. Tunika submukozadaki yangısal infiltrasyon ve kanama ise hasarın çok fazla olduğunu göstermektedir. Resimler x10’luk büyütmede skala 200 mikrometre ve x20’luk büyütmede skala 100 mikrometredir.



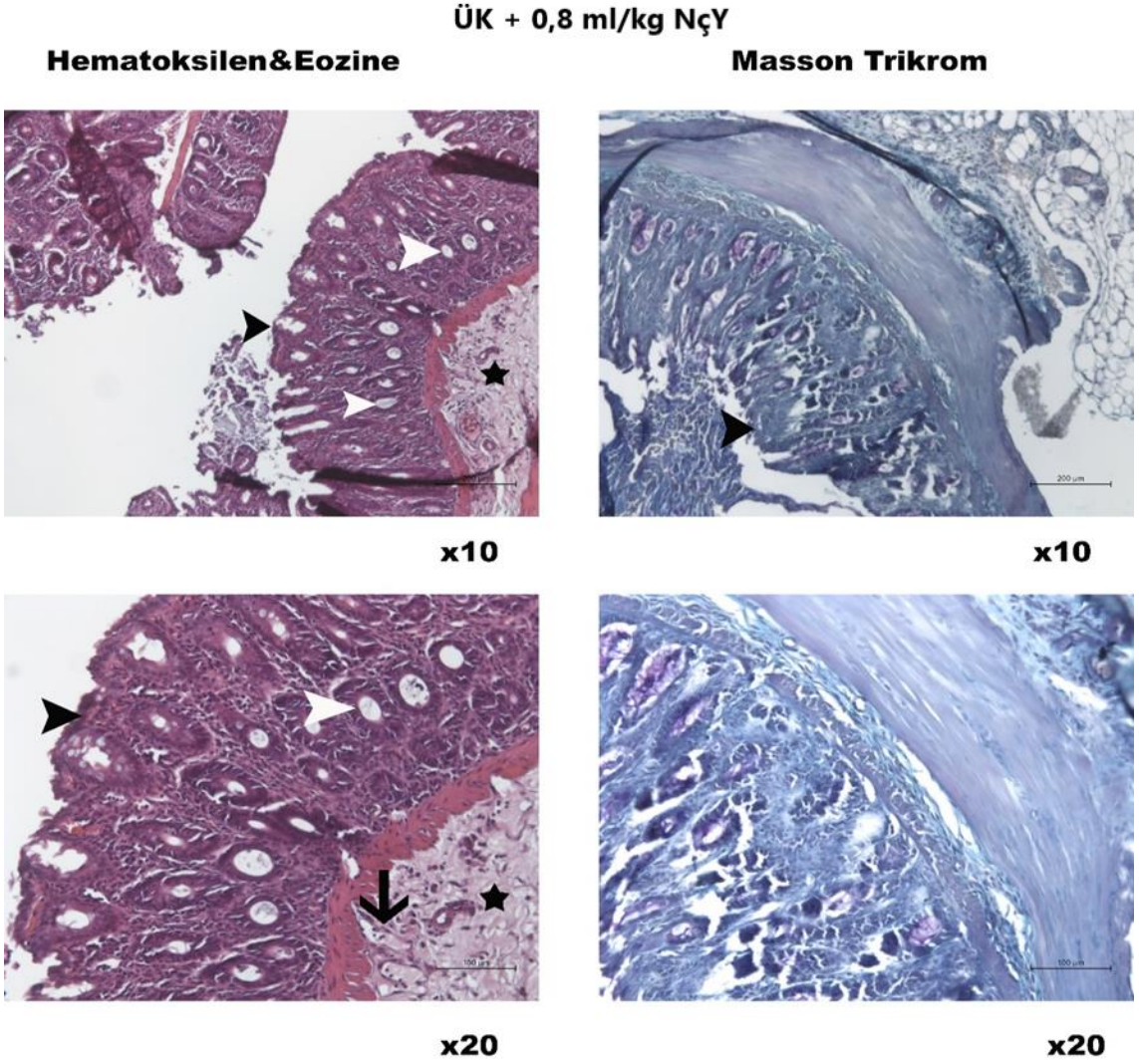
Resim 4.2: Ülseratif kolit grubuna ait bağırsak kesitleri

Resim 4.3’te ÜK + 0,4 ml/kg NÇY grubuna ait bağırsak kesitleri görülmektedir. Resimlerde siyah ok başları bağırsaktaki epitel dokusunu, beyaz ok başları bağırsak bezlerini, siyah yıldız ise tunika submukozadaki bağ dokusunu, siyah ok tunika submukozadaki kanamayı ve beyaz ok ise yangısal infiltrasyonu göstermektedir. Resimlerde Masson trikrom ve Hematoksilen Eozin tekniği kullanılmıştır. 0,4 ml/kg NÇY grubunda tunika mukozadaki bağırsak bezlerinin hasarı azalmıştır. Tunika submukozadaki yangısal infiltrasyon ve kanama da hafif azalmalar olmuştur. Resimler x10’luk büyütmede skala 200 mikrometre ve x20’luk büyütmede skala 100 mikrometredir.



Resim 4.3: Ülseratif kolit+0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı grubuna ait bağırsak kesitleri

Resimde 4.4'te ÜK + 0,8 ml/kg NÇY grubuna ait bağırsak kesitleri görülmektedir. Resimlerde siyah ok başları bağırsaktaki epitel dokusunu, beyaz ok başları bağırsak bezlerini, siyah yıldız ise tunika submukozadaki bağ dokusunu, siyah ok tunika submukozadaki kanamayı ve beyaz ok ise yangısal infiltrasyonu göstermektedir. Resimlerde Masson trikrom ve Hematoksilen Eozin tekniği kullanılmıştır. 0,8 ml/kg NÇY grubunda tunika mukozadaki bağırsak bezlerin histolojik yapıları olağandır. Tunika submukozadaki yangısal infiltrasyon ve kanama da belirgin şekilde azalmalar olmuştur. Resimler x10'luk büyütmede skala 200 mikrometre ve x20'luk büyütmede skala 100 mikrometredir.



Resim 4.4: Ülseratif kolit+0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı grubuna ait bağırsak kesitleri

4.13. MAKROSKOBİK BULGULAR

Makroskobik hasar kontrol grubunda 0,50 ± 0,53, ÜK grubunda 7,37±1,18; ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunda 3 ± 1,6, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubunda ise 8,00 ± 5,33 olarak belirlenmiştir. Makroskobik skorun gruplar arası karşılaştırılması sonucunda (Tablo 4.14); kontrol grubu ortalamasının ÜK grubu (ortalamalar farkı=-6,37), ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=-7,5) ve ortalamasından anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). ÜK grup ortalamasının ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=4,37) ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalamalar farkı=2,04) ortalamasından anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca ÜK+0,4 ml/kg NÇY grup ortalamasının, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubu (ortalama farkı=-5) ortalamasından anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.14: Deney gruplarının makroskobik hasar skorlamasının karşılaştırılması

Grup	Ort ± SS	p
K; ÜK	0,50 ± 0,53; 7,37±1,18	**<0,001**
K; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	0,50 ± 0,53; 3 ± 1,62	0,075
K; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	0,50 ± 0,53; 8,00 ± 5,33	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY	7,37±1,18; 3 ± 1,62	**0,001**
ÜK; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	7,37±1,18; 8,00 ± 5,33	**0,016**
ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY	3 ± 1,62; 8,00 ± 5,33	**0,002**

Mann-Whitney U test; $p<0,05$; K: Kontrol; ÜK: Ülseratif kolit; ÜK+ 0,4 ml/kg NÇY; Ülseratif kolit ile birlikte 0,4 ml/kg nar çekirdeği yağı; ÜK+ 0,8 ml/kg NÇY: Ülseratif kolit ile birlikte 0,8 ml/kg nar çekirdeği yağı

5. TARTIŞMA

İnflamatuar bağırsak hastalığının neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik ve çevresel faktörler, bağırsak bariyer fonksiyonunun düzensizliği, mukozal bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonu gibi faktörlerle ilişkilendirilir (25,26,37). İBH, sitokinler, proteolitik enzimler ve serbest radikaller üreten nötrofil ve makrofajların akışı ile karakterize edilir (29). İBH için erken teşhis ve tedavi kritiktir (38). Hastalığın tedavi seçenekleri arasında beslenme, ilaç veya cerrahi müdahaleler bulunur (25). Fakat geleneksel ve yeni tedavilerin, değişken yanıt oranları ve dikkate değer yan etkileri farklı tamamlayıcı tıbba ve alternatif tedavi yöntemlerine olan yönelimi arttırmıştır (42). Mevcut literatürde, İBH dahil çeşitli inflamasyon hastalıklarında ve gastrointestinal hastalıklarda diyet polifenollerinin yararlı etkisi olduğu mevcuttur. *P. granatum*'un, bir dizi inflamasyonlu hastalıkta sağlık yararları sağladığı bilinmektedir (11). Daha önce yapılan çalışmalar, nar suyunun polifenolik özellikleri (11), nar bileşenleri (20) ve NÇY'nin kolitten koruyu etkisi (19) ile ilgilidir. Fakat NÇY'nin akut koliti tedavi edici etkisi ile ilgili çalışmalar yetersizdir. Bu sebeple çalışmamızda sıçanlarda AA ile oluşturulan deneysel akut kolit modelinde NÇY'nin tedavi edici etkisi, proinflamatuar sitokinler üzerine etkisi ve antioksidan etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmanın biyokimyasal verileri incelendiğinde ÜK grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı bir ağırlık kaybı ve artmış IL-6, IL-1β ve TNF- α düzeyleri saptanmıştır. Farklı dozlarda NÇY uygulaması NF-κB düzeylerini, MPO aktivitesini ve TOS'u anlamlı şekilde azaltmış, fakat dozlar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarına göre NÇY suplementasyonu uygulanan gruplarda ÜK tedavisi anlamlı şekilde gerçekleşmiştir. Toplam hasar skoru bu iki grupta ÜK grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NÇY takviyesinin 0,8 ml/kg uygulanmasının toplam hasarda daha iyi iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir.

Vücut ağırlığı kaybı İBH'de yaygın görülen semptomlardan biridir ve hastalık aktivitesinin bir belirteci olarak kabul edilebilir (181). Bu çalışmada deney öncesinde ve sonunda kaydedilen ağırlık değişim yüzdeleri incelendiğinde ÜK grubunda, kontrol ve ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubuna kıyasla anlamlı bir ağırlık kaybı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Vücut ağırlığı kaybına hastalığın şiddetinin ve yumuşak dışkılamanın neden olduğu düşünülmektedir.

Hastalık aktivite indeksi genellikle inflamatuar yaralanmaların şiddetini değerlendirmek için kullanılan bir indekstir ve tedavide HAİ skorunun azalması teröpatik ajanın etkinliği hakkında bilgi verir (182). Ağırlık kaybı, dışkı kıvamı ve dışkıda kan varlığı HAİ skoru belirtecidir (172). Çalışmamızda ÜK grubundaki HAİ skorunun ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundakinden anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca 0,4 ml/kg NÇY suplementasyonu 0,8 ml/kg NÇY suplementasyonuna göre HAİ skorlarını anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0,05$). Bizim çalışmamızın sonucuna benzer şekilde Chen ve ark. (183) çalışmalarında kolit geliştirilen grupta kilo ve iştahta önemli bir azalma olduğunu bildirmiştir. Ayrıca kolit grubunda daha yüksek diyare, rektal kanama insidansı ile ilişkili HAİ skorlarının daha yüksek olduğu tedavi gruplarında ise HAİ skorları daha düşük olduğunu belirtmiştir. Başka bir kolit modelinde de, HAİ skorunun yüksek olduğu gruplarda kilo kaybı ve gevşek, kanlı dışkı gibi İBH'nin belirgin semptomları mevcutken istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ellajik asit suplementasyonun bu semptomları hafifçe azalttığı bildirilmiştir (20).

Proinflamatuar sito/kemokinlerin bağırsakta üretimi, mukozal bağışıklık ve bağırsak epitel hücrelerini aktive etmeyi amaçlayan fizyolojik ve hayati bir olaydır. IL-6, IL-1 ve TNF-α akut faz tepkilerini düzenleyen inflamasyon aracılardır (140,184,185). Nar meyvesi ekstratının ve NÇY'deki punisik asitin TNF-α ve inflamatuar hastalıkların önlenmesinde etkili olabileceği düşünülür (10,160,186). Bir çalışmada akut kolit oluşturulan sıçanlarda, IL-1β, IL-6, TNF-a ve IFN-y, proinflamatuar sitokinlerinde artış bildirilirken ellajik asitle uygulanan gruplarda, IL-6, IFN-y ve TNF-a seviyelerinde sırasıyla %35, %86 ve %55 oranında azalma bildirilmiştir (20). Dekstran sodyum sülfat ile oluşturulan başka bir kolit modelinde mango ve nar içeceklerinin, sıçanlarda bağırsak inflamasyonu ile birlikte mukoza ve serumdaki proinflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (187). Nar ekstratlarının, yüksek yağlı diyetin neden olduğu metabolik inflamasyondan (örneğin kolit) koruduğu bildirilmiştir. Zhao ve ark. (188) çalışmalarında nar kabuğu polifenollerinin sıçanlarda yüksek yağlı diyetin neden olduğu obeziteyi, dolaşımdaki proinflamatuar sitokinleri (IL-6, IL-1β ve TNF-a,), kolonik doku hasarını ve depresif kolonik sıkı bağlantı protein ekspresyon seviyesini azalttığını bulmuştur. Ayrıca nar kabuğu polifenolleri uygulamasının toplam SOD ve toplam antioksidan kapasiteyi etkili bir şekilde geliştirdiğini de belirtilmiştir. Spilmont ve ark. (160) çalışmalarında osteoblast hücrelerinde NÇY uygulamasının pro-inflamatuar sitokin olan IL-1 ve IL-6'nın ekspresyonunu azalttığını göstererek NÇY'nin inflamasyonu

azaltma eğilimi gösterdiğini bildirmiştir. Sıçan nekrozitan enterekolit modelinde oral yoldan uygulanan NÇY'nin nekrozitan enterekolit gelişimi, bağırsak epitel proliferasyonu ve sitokin regülasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda formülle beslenen sıçanların ileumunda proinflamatuar TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-23 seviyeleri artarken, formüle NÇY eklenenlerde bu seviyelerin kontrollerde görülen değerlere indiği, nekrozitan enterekolit insidansının ve ileal hasar şiddetinin önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. NÇY uygulamasının nekrozitan enterekolite karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir (10). Bizim çalışmamızda literatür bilgilerini destekler sonuçlara sahiptir. Serum IL-6, IL-1β ve TNF- α düzeyi diğer gruplara kıyasla ÜK grubunda anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Serum IL-1β düzeyi ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubuna göre kontrol grubunda anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Bu veriler sayesinde NÇY'nin güçlü bir anti-inflamatuar etki göstererek proinflamatuar sitokinleri azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir.

Transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B, inflamasyonun merkezi bir düzenleyicisidir ve çeşitli biyolojik süreçleri modüle eder. İBH, proinflamatuar ve anti-inflamatuar sinyal yollarının aktivasyonundaki dengesizlik ile ilişkilidir. Bu sinyal yolları, gen transkripsiyonunun ana düzenleyicisi olan NF-κB tarafından kontrol edilir. İBH hastalarında, NF-κB sinyali genellikle düzensizdir ve bu durum aşırı inflamasyona neden olur (189). Nar suyunun ve saflaştırılmış punikalajin'in NF-κB ve kolon inflamasyonunda ekspresyonuna yol açan sinyal yolları üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, kolit geliştirilen grupta TNF-α, IL-1β, IL-18 ve NF-κB genlerinde aşırı ekspresyon gözlenirken, nar suyu, saflaştırılmış punikalajin ve 5-ASA tedavisi uygulanan gruplarda gen ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (11). Deneysel kolit geliştirilen başka bir çalışmada ise ellajik asit uygulamasının p38MAPK, NF-κB ve STAT3 sinyal yollarını bloke ettiği belirtilmiştir (20). İnsan bağırsak epitelinin in vitro bir modeli olan Caco-2 hücrelerinde, punikalajin açısından zengin nar meyve kabuğunun polifenolik ekstraktının antiinflamatuar özellikler gösterdiği bulunmuştur. Hem proinflamatuar gen transkripsiyonu hem de protein seviyeleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (140). RAW264.7 hücrelerinde lipopolisakkarit ile indüklenen inflamasyonda punikalajin tedavisinin IL-1β, IL-6 ve TNF-α'yı azaltabildiği ve NF-κB'nin aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (190). Hollebeeck ve ark.'da (140) nar kabuğunun kronik bağırsak inflamasyonunu önlemeye katkıda bulunan doğal bir kaynak olabileceğini belirtmiştir. Urolithin A, ellajitanninlerin bağırsak bakterileri tarafından dönüştürülmesinden

kaynaklanan bir metabolit bileşiğidir. Nar alımının ve ürolitin-A'nın kolon inflamasyonu üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmada, sıçanlarda 25 gün boyunca 250 mg/kg^{-1}/gün^{-1} nar ekstresi veya 15 mg/kg^{-1}/gün^{-1} ürolitin-A uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda hem nar ekstresinin hem de ürolitin-A'nın kronik mukozada inflamasyon belirteçlerini azalttığı, nar ekstresinin plazma ve kolon mukozasında oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (191). Başka bir çalışmada da başta urolithin A olmak üzere urolithinlerin, narın antiinflamatuar özelliklerinden sorumlu ana bileşikler biri olabileceği gösterilmiştir. Bu bileşiklerin, NF-κB ve MAPK aktivasyonunun inhibisyonu, COX-2 ve mPGES-1 ekspresyonlarının aşağı regülasyonu yolu ile etkili olabileceği bildirilmiştir (192). Bizim çalışmamızın sonuçları da diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızın kontrol grubunun NF-κB düzeyi, ÜK, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür ($p<0,05$). ÜK gurubunun NF-κB değeri ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundan anlamlı derece yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlar NÇY uygulamasının proinflamatuar ve antiinflamatuar sinyalleri modüle ederek inflamatuar yolaklar üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Dokudaki düzensiz ROS üretimi, oksidatif hasar ve inflamasyon ile ilişkilendirilir ve mukozal hasarın şiddetlenmesine neden olur. MPO, ROS üretimini katalize eden bir enzimdir (193). Ayrıca inflamasyonlu gastrointestinal dokuda nötrofil akışının göstergesidir (11). Marín ve ark.'da (20) dekstran sodyum sülfat ile kolit geliştirdikleri sıçanlarda MPO aktivitesini oldukça yüksek bulmuştur. Başka bir çalışmanın kolit geliştirilen grubunda kontrol grubuna göre MPO aktivitesinde artış saptanmıştır. Ayrıca nar suyu ve punikalajin uygulanan gruplarda düşük MPO aktivitesi ölçülerek nötrofil infiltrasyonunun önemli ölçüde önlendiği bildirilmiştir (11). Deneysel kolon inflamasyonun oluşturulduğu hayvan çalışmasında punisik asitin MPO salınımını engellediği bildirilmiştir (19). Ogawa ve ark. (194) yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında polifenol olan ellajik asidin, brüt mukozal hasarını azalttığını ve MPO aktivitesinin inhibisyonunu sağladığını göstermişlerdir. NÇY'de bulunan konjuge linolenik bir yağ asidi olan punisik asidin ROS / MPO aracılı doku hasarını azalttığı ve kolon inflamasyonundan koruduğunu göstermiştir (19). Çalışmamızda literatüre benzer şekilde, MPO aktivitesi ÜK grubunda, kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Kolitli dokularda farklı

dozlarda NÇY suplementasyonu MPO aktivitesini anlamlı şekilde azaltmıştır fakat dozlar arasında bir fark saptanamamıştır.

Bağırsaklardaki infiltrasyon, membran lipidlerindeki yağ asidi kalıntıları üzerinde toksik etkiler göstererek serbest radikal salınımını tetikleyebilir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA hücre içeriğinin salınmasına ve hücre ölümüne sebep olarak doku ve organ hasarına yol açabilir. Yapılan bir çalışmada kolit geliştirilen gruba kıyasla nar suyu ve punikalajin uygulanan gruplarda düşük MDA seviyeleri bildirilmiştir (11). Nar suyu tüketiminin hemodiyaliz hastalarının lipid profili, oksidatif ve inflamatuar biyobelirteçlerine etkisini araştıran çalışmada da nar suyunun MDA ve IL-6 seviyelerini azaltarak antioksidan ve antiinflamatuar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (195). Benzer şekilde oksidatif hasarın ve biliyer obstrüksiyonun neden olduğu fibrozise karşı nar kabuğu ekstresi uygulamasının, MDA seviyelerini, MPO aktivitesini, TNF-α ve IL-1β seviyelerini azalttığı bulunmuştur (196). Taher Boroushaki ve ark. (197) sıçanlarda diazinon ile indüklenen nefrotoksisite de NÇY'nin etkisini araştırmıştır. Diazinon sıçanlarda MDA seviyelerini arttırmış 0,64ml/kg NÇY tedavisi ise MDA seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışmada ÜK grubunun MDA düzeyi, kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). NÇY'nin 0,4 ml/kg uygulanması, 0,8 ml/kg uygulamasına kıyasla MDA seviyelerini daha fazla azaltmıştır fakat istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır. NÇY suplementasyonu ile oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonunun azaltılabileceği ön görülmektedir.

Kronik inflamatuar hastalıkların tedavisinde oksidatif strese karşı antioksidan veya endojen antioksidan seviyelerini artırmak, faydalı bir yaklaşım olabilir (196). Nar aracılı antioksidan aktivite, inflamasyonu azaltmanın bir yolu olarak düşünülebilir (13). Nar suyu polifenoller, tanenler, punisik asit ve askorbik asit gibi antioksidanları içerir. Ayrıca nardan elde edilen yağ, bu antioksidanların zengin bir kısmını içerir (198). Ayrıca NÇY'de bulunan punisik asit antioksidatif özellik gösterir (160). Soğuk preslenmiş çekirdek yağının hem COX hem de lipooksijenaz enzimlerini in vitro olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (13). Nekooeian ve ark. (199) çalışmalarında NÇY ile tedavi edilen diyabetik sıçanların daha yüksek glutatyon peroksidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiş, NÇY ve ana bileşeni olan punisik asidin antioksidan aktivite göstererek oksidatif stresi azalttığı sonucuna varmıştır. Mollazadeh ve ark. (200) sıçanlarda ve H9c2

hücre hattında yaptıkları çalışmalarında, NÇY tedavisinin diyabetik gruba göre hem doku hem de mitokondriyal fraksiyonlarda, antioksidan enzim aktivitesinde anlamlı artış ve oksidatif stres indeks değerlerinde azalma bulmuşlardır (200). Boldaji ve ark. (195) çalışmalarında nar suyunun TAS'ı arttırarak anti-inflamatuar etkiler gösterdiğini bildirmiştir (195). Toklu ve ark.'da (196) nar kabuğu ekstresinin antioksidan kapasiteyi ve glutatyon seviyelerini arttırdığını bulmuştur. Punisik asidin sodyum arsenit kaynaklı oksidatif strese karşı antioksidan aktiviteyi arttırdığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (201). Yayla ve ark. (202) güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuar ajan olan NÇY'nin sıçanlarda ovaryan iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerine terapötik etkilerini araştırmış ve sonucunda düşük doz NÇY (0,32 ml/kg-intraperitonal) uygulamasının hem iskemik hem de iskemik/reperfüzyon gruplarında oksidatif stresi, NADPH oksidaz aktivitesini ve TNF-α seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığını bulmuştur. Benzer şekilde H9c2 kardiyomiyositlerinde hidrojen peroksitin neden olduğu hasara karşı NÇY ön tedavisi, kardiyomiyositlerin canlılığını arttırmış, yüksek ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu (MDA) azaltmıştır. NÇY'nin kardiyomiyositlerde oksidatif stres kaynaklı hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (203). Çalışmamızda antioksidan durumu göstergesi olan TAS'ın ÜK grubunda kontrol ve ÜK+0,4 ml/kg NÇY gruplarına kıyasla düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). NÇY'nin 0,4 ml/kg uygulamasında, 0,8 ml/kg uygulamasına kıyasla TAS daha yüksektir fakat istatistiksel fark görülmemiştir. Bir başka oksidan durum göstergesi TOS ise ÜK grubunda kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Dokudaki endojen antioksidan miktarı göstergesi olan GSH ise ÜK grubunda kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarından anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p<0,05$). NÇY'nin antioksidan özelliği sayesinde oksidan seviyeleri azaltılabilir, antioksidan belirteçler arttırılabilir. Çalışmamızın sonuçları literatürü destekler niteliktedir.

Bu çalışmanın histopatolojik sonuçlarında, ÜK grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede hasar bulgusuna rastlanılmıştır. NÇY suplementasyonu uygulanan her iki grupta ÜK tedavisi anlamlı şekilde gerçekleşmiştir. Toplam hasar skoru bu iki grupta ÜK grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$). NÇY suplementasyonunun 0,8 ml/kg uygulanmasının toplam hasarı daha iyi azalttığı gözlemlenmiştir. Shah ve ark. (11) kolit dokularının histolojik görünümünü, ödem, kanama, epitelyal eksfoliasyon vepolimorfonükleer lökositlerin, makrofajların, eozinofillerin ve lenfositlerin

infiltrasyonu şeklinde belirtmiştir. Nar suyu, saflaştırılmış punikalajin ve 5-ASA tedavisi uygulanmasından sonra mikroskobik ve mukozal hasarın azaldığını bildirilmiştir. Benzer şekilde başka bir çalışmada, kolit grubunda ülserasyon ve muskularis mukoza etkilenmesi ile birlikte kript apsesi ve inflamatuar hücre infiltrasyonu ile karakterize edilen yüksek derecede kronik inflamasyonlu dokulara rastlanmış, ellajik asit uygulamasının ise mukozal ülserasyonu azalttığı saptanmıştır (20). Zangeneh ve ark. (204) sıçanlarda deneysel akut kolit modelinde nar, hurma ve incir meyvelerinin günlük diyetteki terapötik ve profilaktik etkilerini incelemiştir. Dokuların histolojik değerlendirmesinde nar suyunun ödem ve submukozal hücre infiltrasyonunu ortadan kaldırabileceği gösterilmiştir. Ek olarak, nar suyu ve hurma meyvesinin kolit üzerinde profilaktik etki oluşturduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada makroskobik hasarın ÜK grubunda, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunun makroskobik skorunu ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundan anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuç doza bağlı mikroskobik sonuçtan farklı çıkmış olsa da NÇY'nin her iki dozda da hasarı azalttığı ve tedavi edici etki gösterdiğini desteklemiştir. Murin kronik CH modelinde ellajik asit ile zenginleştirilmiş nar ekstresinin etkilerini araştırılan çalışma sonucunda, ellajik asit ve nar ekstrelerinin uygulandığı gruplarda makroskobik inflamasyon ve kolonik hasarda azalma gözlenmiştir (8). Kolit indüksiyonundan sonra oral olarak uygulanan kaynatılan narın, polisakkaritlerin ve ellajitanninlerin makroskobik ve mikroskobik değerlendirmelerinde, üç preparasyonun da toplam mast hücrelerinin miktarını, degranüle olmuş mast hücrelerinin sayısını ve mukozal stromadaki kollajen liflerinin yoğunluğunu azalttığı bulunmuştur (205) .

Çalışmamızın sınırlılıkları:

Bu çalışmada asetik asit ile oluşturulan kolit modeli hastalığın akut evresini yansıtmaktadır ve daha çabuk iyileşme eğilimindedir. İnsanlarda görülen ÜK'in kronik evresini ve immünolijk yanıtı içermemektedir.

Çalışmamızın güçlü yanları:

Literatür incelendiğinde daha önce yapılan çalışmalar, nar suyunun polifenolik özellikleri, nar bileşenleri ve NÇY'nin kolitten koruyu etkisi ile ilgilidir. NÇY'nin akut kolit modelinde tedavi edici etkisi ve farklı dozların nasıl etki göstereceği ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Çalışmamız farklı dozlarda NÇY uygulamasının koliti

tedavi edici, pro-inflamatuar sitokinler ve antioksidan etkisini analiz edebilmek için tasarlanmıştır. Çalışmamız bu açıdan özgündür. Ek olarak çalışmamız NÇY'nin kolit tedavisinde tamamlayıcı veya destekleyici bir yaklaşım olarak değerlendirilmesi için umut verici sonuçlar vermiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İnflamatuar bağırsak hastalığı, bağırsak mukozasının inflamasyonu, ishal, kanlı dışkı, kilo kaybı ve ülserasyona neden olan sitokinler, proteolitik enzimler ve serbest radikaller üreten nötrofil ve makrofajların akışı ile karakterizedir. Diğer inflamatuar hastalıkların aksine, İBH kolayca bastırılamaz bu nedenle de erken teşhis ve tedavi oldukça önemlidir. Geleneksel tedaviler pahalıdır, değişken yanıt oranları ve ciddi yan etkilere sahiptir. Bu nedenle de farklı tamamlayıcı ve alternatif tıp ilaçlarına olan yönelimi arttırmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar nar suyunun polifenolik özellikleri, nar bileşenleri ve NÇY'nin kolitten koruyu etkisi ile ilgilidir. Bu sebeple çalışmamızda sıçanlarda AA ile oluşturulan deneysel akut kolit modelinde NÇY'nin tedavi edici, pro-inflamatuar stokinler üzerine ve antioksidan etkisi araştırılmış ve sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Bu çalışmada ağırlık değişim yüzdeleri incelendiğinde ÜK grubunda, kontrol ve ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubuna göre anlamlı bir ağırlık kaybı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Kilo kaybına hastalığın şiddetinin ve yumuşak dışkılamanın neden olduğu düşünülmektedir.

2. Genellikle inflamatuar yaralanmaların şiddetini değerlendirmek için kullanılan ve tedavide teröpatik ajanın etkinliği hakkında bilgi veren HAİ skoru ÜK grubunda; ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundakinden anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Ayrıca ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunun HAİ'nin, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundakinden anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). NÇY suplementasyonun kilo kaybı ve gevşek, kanlı dışkı (HAİ skor belirteçleri) gibi İBH'nin belirgin semptomlarını azaltabileceği düşünülmektedir. 0,4 ml/kg NÇY uygulamasının daha etkili olacağı bulunmuştur.

3. Çalışmamızda serum IL-6, IL-1β ve TNF- α düzeyi ÜK grubunda; kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Fakat serum IL-1B düzeyi kontrol grubunda ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubuna kıyasla anlamlı derece yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). Bu veriler sayesinde NÇY'nin güçlü bir anti-inflamatuar etki göstererek proinflamatuar sitokinleri azaltıcı etkisi düşünülür.

4. İnflamasyonun merkezi bir düzenleyicisi olan NF-κB kontrol grubunda; ÜK, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). ÜK grubunun NF-κB değeri ise, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunun NF-κB düzeyi ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundakinden daha azdır fakat anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar NÇY uygulamasının inflamatuar yolaklar üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

5. Nötrofil infiltrasyonu belirteci olan MPO aktivitesi ÜK grubunda, kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 0,4 ml/kg NÇY uygulamasında, 0,8 ml/kg NÇY uygulamasına kıyasla MPO aktivitesi daha düşüktür fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$).

6. Malondialdehit düzeyi ÜK grubunda; kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). 0,4 ml/kg NÇY uygulaması, 0,8 ml/kg NÇY uygulamasına kıyasla MDA seviyelerini azaltmıştır fakat istatistiksel bir ilişki belirlenememiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlar NÇY uygulamasının oksidatif strese karşı etkili olabileceğini düşündürmektedir.

7. Antioksidan seviyeyi göstergesi olan TAS ÜK grubunda; kontrol ve ÜK+0,4 ml/kg NÇY gruplarına göre istatistiksel olarak düşüktür ($p<0,05$). Ayrıca ÜK grubunda TAS düzeyi, ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundan düşüktür fakat anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$). 0,4 ml/kg NÇY uygulamasında, 0,8 ml/kg NÇY uygulamasına kıyasla TAS daha yüksektir fakat anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar NÇY'nin antioksidan özelliği ile ilişkilendirilir.

8. Oksidan seviyeyi gösteren TOS ise ÜK grubunda kontrol; ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 0,4 ml/kg NÇY uygulamasında, 0,8 ml/kg NÇY uygulamasına kıyasla TOS daha düşüktür ancak istatistiksel bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$). NÇY'nin oksidatif hasarı azaltabileceği düşünülebilir.

9. Dokudaki endojen antioksidan miktarı göstergesi olan GSH ise ÜK grubunda kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarından anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p<0,05$). 0,4 ml/kg NÇY uygulamasında, 0,8 ml/kg NÇY

uygulamasına kıyasla GSH daha düşüktür ancak istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$).

10. Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarında, ÜK grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede hasar bulgusuna rastlanılmıştır. 0,4 ml/kg ve 0,8 ml/kg NÇY suplementasyonu uygulanan gruplarda ÜK tedavisi anlamlı şekilde gerçekleşmiştir. Toplam hasar skoru bu iki grupta ÜK grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$). 0,8 ml/kg NÇY suplementasyonu uygulanan toplam hasarı daha iyi azalttığı gözlemlenmiştir.

11. Makroskobik hasarın ÜK grubunda, kontrol, ÜK+0,4 ml/kg NÇY ve ÜK+0,8 ml/kg NÇY gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca ÜK+0,4 ml/kg NÇY grubunun makroskobik skorunu ÜK+0,8 ml/kg NÇY grubundan anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$).

Bu çalışma ile deneysel akut kolit modelinde NÇY'nin hastalık semptomlarını hafifletici, pro-inflamatuar stokinler ve oksidatif belirteçleri azaltıcı ve antioksidan etkisi gösterilmiştir. Bu veriler İBH tedavisinde NÇY'yi tamamlayıcı veya destekleyici bir yaklaşım olarak değerlendirilmesi için umut vericidir. Bu sayede hastalığın semptomları azalabilecek ve hastaların yaşam kaliteleri artabilecektir. Hastaneye yatış sıklığı, tedavi süresinin kısaltılması gibi etkileri nedeniyle medikal harcamalar da azalma beklenebilmektedir. Bu çalışma hem ulusal hem uluslararası litaratüre katkısı açısından bir ilktir ve klinik çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Tedavide uygun NÇY dozunun belirlenmesi için farklı doz ve sürelerde daha fazla deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların sonuçların duyurulması ile doğal anti inflamatuar ve antioksidan kaynağı olan NÇY'nin tamamlayıcı tedavi yaklaşımları arasında yer alması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Arıkan, T., Akcan, A., Dönder, Y., Yılmaz, Z., Sözüer, E., Öz, B., Poyrazoğlu, B. (2019). Effects of erythropoietin on bacterial translocation in a rat model of experimental colitis. *Turkish journal of surgery*, *35*(3), 202.
2. Dönder, Y., Arikan, T. B., Baykan, M., Akyüz, M., Öz, A. B. (2018). Effects of quercitrin on bacterial translocation in a rat model of experimental colitis. *Asian journal of surgery*, *41*(6), 543-550.
3. Ryan, U, Saurabh. M, Patrick, B.A., Laurent, P.B. (2017). Ulcerative Colitis. *Lancet,* 389(10080) 139–48.
4. Larussa, T., Imeneo, M., & Luzza, F. (2017). Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, *23*(14), 2483.
5. Arya, V. S., Kanthlal, S. K., & Linda, G. (2020). The role of dietary polyphenols in inflammatory bowel disease: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of immune and inflammatory reactions. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(11), e13369.
6. Moldoveanu, A. C., Diculescu, M., & Braticevici, C. F. (2015). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Romanian Journal of Internal Medicine*, *53*(2), 118-127.
7. Isik, F., Tunali Akbay, T., Yarat, A., Genc, Z., Pisiriciler, R., Caliskan-Ak, E., Sener, G. (2011). Protective effects of black cumin (Nigella sativa) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, *56*(3), 721-730.
8. Rosillo, M. A., Sanchez-Hidalgo, M., Cárdeno, A., De La Lastra, C. A. (2011). Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochemical pharmacology*, *82*(7), 737-745.
9. Castagnini, C., Luceri, C., Toti, S., Bigagli, E., Caderni, G., Femia, A. P., Dolara, P. (2009). Reduction of colonic inflammation in HLA-B27 transgenic rats by feeding Marie Ménard apples, rich in polyphenols. *British journal of nutrition*, *102*(11), 1620-1628.
10. Coursodon-Boyiddle, C. F., Snarrenberg, C. L., Adkins-Rieck, C. K., Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., Lawrence, P., Dvorak, B. (2012). Pomegranate seed oil reduces intestinal damage in a rat model of necrotizing enterocolitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *303*(6), 744- 751.
11. Shah, T. A., Parikh, M., Patel, K. V., Patel, K. G., Joshi, C. G., Gandhi, T. R. (2016). Evaluation of the effect of Punica granatum juice and punicalagin on NFκB modulation in inflammatory bowel disease. *Molecular and cellular biochemistry*, *419*(1), 65-74.
12. Białek, A., Stawarska, A., Bodecka, J., Białek, M., Tokarz, A. (2017). Pomegranate seed oil influences the fatty acids profile and reduces the activity of desaturases in livers of Sprague-Dawley rats. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *131*, 9-16.
13. Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): A review. *Altern Med Rev;* 13:128–44.
14. Pereira de Melo, I. L., Teixeira de Carvalho, E. B., & Mancini-Filho, J. (2014). Pomegranate seed oil (Punica granatum L.): a source of punicic acid (conjugated α-linolenic acid). *J Hum Nutr Food Sci*, *2*, 1024-35.
15. Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, *109*(2), 177-206.
16. Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *The Journal of nutritional biochemistry*, *24*(6), 929-939.
17. Carvalho, E. B. T. D., Melo, I. L. P. D., & Mancini-Filho, J. (2010). Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. *Food Science and Technology*, *30*, 295-307.
18. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirlini M, Bruni R. (2010). Characterization of a Potential Nutraceutical Ingredient: Pomegranate (Punica granatum L.) Seed Oil Unsaponifiable Fraction. *Plant Foods Hum Nutr*; 65:277–83.
19. Boussetta T, Raad H, Lettéron P, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Driss F, et al. (2009) Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNFα-induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One*;4(7), e6458
20. Marín M, María Giner R, Ríos JL, Carmen Recio M. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *J Ethnopharmacol*; 150:925–34.
21. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*; 12:113–22.

22. Garber A, Regueiro M. (2019). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. *Curr Gastroenterol Rep*;21(7), 1-13.
23. Eichele DD, Young R. (2019). Medical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*; 99:1223–35.
24. Jeong DY, Kim S, Son MJ, Son CY, Kim JY, Kronbichler A, et al. (2019). Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease: A comprehensive review. Autoimmun Rev; 18:439–54.
25. Day AS, Leach ST, Lemberg DA. (2017). An update on diagnostic and prognostic biomarkers in inflammatory bowel disease. Expert Rev Mol Diagn; 17:835–43.
26. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. (2019). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. Gastroenterology157:647-659.
27. Fallahi F, Borran S, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Pourhanifeh MH, Khaksary Mahabady M, et al. (2021). Curcumin and inflammatory bowel diseases: From in vitro studies to clinical trials. *Mol Immunol;* 130:20–30.
28. Younis N, Zarif R, Mahfouz R. (2020). Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. M*ol Biol Rep*; 47:3053–63.
29. Guan Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*;2019, 1-16
30. Du L, Ha C. (2020). Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am*; 49:643–54.
31. Flynn S, Eisenstein S. (2019). Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surg Clin North Am*; 99:1051–62.
32. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. (2020). The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. J Gastroenterol Hepatol; 35:380–9.
33. Limdi JK. (2018). Dietary practices and inflammatory bowel disease. *Indian J Gastroenterol*;37:284–92.
34. Barnes EL, Loftus E V., Kappelman MD. (2020). Effects of Race and Ethnicity on Diagnosis and Management of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology; 160*:677–89. .
35. Burisch J, Vardi H, Schwartz D, Friger M, Kiudelis G, Kupčinskas J, et al. (2020). Health-care costs of inflammatory bowel disease in a pan-European, community-based, inception cohort during 5 years of follow-up: a population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*; 5:454–64.
36. Windsor JW, Kaplan GG. (2019). Evolving Epidemiology of IBD. Curr Gastroenterol Rep 2019;21.
37. Guilherme Piovezani Ramos M and K. (2019). Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases; *Mayo Clinic Proceedings*. *Elsevier*,94(1):155–66.
38. Wright EK, Ding NS, Niewiadomski O. (2018). Management of inflammatory bowel disease. *Med* 209:318–23.
39. Burgmann T, Clara I, Graff L, Walker J, Lix L, Rawsthorne P, et al. (2006). The Manitoba Inflammatory Bowel Disease Cohort Study: prolonged symptoms before diagnosis--how much is irritable bowel syndrome? *Clin Gastroenterol Hepatol;* 4:614–20.
40. Pithadia AB, Jain S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Reports*; 63:629–42.
41. Corica D, Romano C. (2015). Renal involvement in inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis;* 10:1–10.
42. Gilardi D, Fiorino G, Genua M, Allocca M, Danese S. (2014). Complementary and alternative medicine in inflammatory bowel diseases: What is the future in the field of herbal medicine? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*; 8:835–46.
43. Kaplan GG, Windsor JW. (2021). The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. N*at Rev Gastroenterol Hepatol;* 18(1), 56-66
44. Ananthakrishnan AN. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepato*l; 12(4), 205-217.
45. Ahmed I, Roy B, Khan S, Septer S, Umar S. (2016). Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms;*4(2):20.
46. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nuñez G. (2011).The ever-expanding function of NOD2: Autophagy, viral recognition, and T cell activation. T*rends Immunol*; 32:73–9.
47. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature;* 474:307–17.
48. Huang C, Haritunians T, Okou DT, Cutler DJ, Zwick ME, Taylor KD, et al. (2015) Characterization of Genetic Loci That Affect Susceptibility to Inflammatory Bowel Diseases in African Americans. Gastroenterology; 149:1575–86.

49. Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. (2015).Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*; 47:979–86.
50. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. (2016). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol*;22 (27),6296.
51. Vedamurthy A, Ananthakrishnan AN. (2019). Influence of Environmental Factors in the Development and Outcomes of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* ;15(2),72.
52. Nishida A, Inoue R, Inatomi · Osamu, Shigeki Bamba ·, Naito Y, Andoh A. (2018;).Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*; 11:1–10.
53. Saleh M, Elson CO. (2011). Experimental inflammatory bowel disease: Insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*; 34:293–302.
54. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. (2018). Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol;* 15:39–49.
55. Comito D, Cascio A, Romano C. (2014). Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Ital J Pediatr*;40(1),1-6.
56. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol;*11(1),1-10.
57. Kuhnen A. (2019). Genetic and Environmental Considerations for Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am;* 99:1197–207.
58. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. (2011).Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*; 60:631–7.
59. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, et al. (2007). Impact of Clostridium difficile on Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepato*l; 5:345–51.
60. Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, LaMont JT. (2007). Inflammation and Apoptosis in Clostridium difficile Enteritis Is Mediated by PGE2 Up-Regulation of Fas Ligand. *Gastroenterology;* 133:875–86.
61. Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, et al. (2016). Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* 93(1), 59-65
62. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. (2013) T reg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, *500*(7461), 232-236
63. Shivashankar R, Lewis JD. (2017).The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep*; 19:1–7.
64. Lewis JD, Abreu MT. (2017). Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology;* 152:398-414
65. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*; 519:92–6.
66. Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD, et al. (2015). Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; 148:1087–106.
67. Kanai T, Matsuoka K, Naganuma M, Hayashi A, Hisamatsu T. (2014). Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: Lessons from Japanese foods. *Korean J Intern Med*; 29:409–15.
68. Racine A, Carbonnel F, Chan SSM, Hart AR, Bas Bueno-De-Mesquita H, Oldenburg B, et al. (2016).Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. *Inflamm Bowel Dis*;22(2):345–54.
69. Dolan KT, Chang EB. (2017). Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Molecular nutrition & food research*, 61(1), 1600129.
70. Knight-Sepulveda K, Kais S, Santaolalla R, Abreu MT. (2018). Diet and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 511.
71. Grosse CSJ, Christophersen CT, Devine A, Lawrance IC. (2020). The role of a plant-based diet in the pathogenesis, etiology and management of the inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*; 14:137–45.
72. Chan SSM, Luben R, Olsen A, Tjonneland A, Kaaks R, Lindgren S, et al. (2014).Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 39:834–42.
73. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol;* 106:563–73.
74. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Fuchs CS, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2014; 63:776–84.
75. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. (2014). Microbial exposure during early

life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*; 336:489–93.
76. Cholapranee A, Ananthakrishnan AN. (2016). Environmental Hygiene and Risk of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis Background: According to the hygiene hypothesis, individuals raised in a sanitary environment have a higher risk of developing inflammatory bowel. *Inflammatory bowel diseases*, *22*(9), 2191-2199.
77. Shapiro JM, Subedi S, LeLeiko NS (2016). Inflammatory bowel disease. *Pediatr Rev*; 37:337–47.
78. Nasef NA, Mehta S, Ferguson LR. (2017). Susceptibility to chronic inflammation: an update. *Arch Toxicol;* 91:1131–41.
79. Lee SH, Kwon J eun, Cho M La. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res;* 16:26–42.
80. Choy M. C., Visvanathan K., De Cruz P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, *23*(1), 2-13.
81. Abraham C., Cho JH (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, *361*, 2066-2078.
82. Ince M. N., Elliott D. E. (2007). Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surgical Clinics of North America*, *87*(3), 681-696.
83. De Souza HSP, Fiocchi C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*;13(1):13–27.
84. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*;13(1):3–10.
85. Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *53*(4), 379-389.
86. Zhang, T., Ma, C., Zhang, Z., Zhang, H., Hu, H. (2021). NF-κB signaling in inflammation and cancer. *MedComm*.;2:618–53.
87. Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R. S., Kaser, A. (2011). Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*, *60*(11), 1580-1588.
88. Negroni, A., Pierdomenico, M., Cucchiara, S., Stronati, L. (2018). NOD2 and inflammation: current insights. *Journal of inflammation research*, *11* (49).
89. Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y. G., Magalhães, J. G., Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*, *11*(1), 55-62.
90. Arseneau, K. O., Cominelli, F. (2015). Targeting leukocyte trafficking for the treatment of inflammatory bowel disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *97*(1), 22-28.
91. Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Tarlinton, D. M. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell–intrinsic mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(2), 365-378.
92. Rovedatti, L., Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C. H., Rampton, D. S., MacDonald, T. T. (2009). Differential regulation of interleukin 17 and interferon γ production in inflammatory bowel disease. *Gut*, *58*(12), 1629-1636.
93. Mittal, S. K., Cho, K. J., Ishido, S., Roche, P. A. (2015). Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(45), 27158-27167.
94. Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology*, *3*, 51.
95. Biancheri, P., Di Sabatino, A., Corazza, G. R., MacDonald, T. T. (2013). Proteases and the gut barrier. *Cell and tissue research*, *351*(2), 269-280.
96. MacDonald, T. T., Biancheri, P., Sarra, M., & Monteleone, G. (2012). What's the next best cytokine target in IBD? *Inflammatory bowel diseases*, *18*(11), 2180-2189.
97. Krzystek-Korpacka, M., Kempiński, R., Bromke, M. A., Neubauer, K. (2020). Oxidative stress markers in inflammatory bowel diseases: Systematic review. *Diagnostics*, *10*(8), 601.
98. Dudzińska, E., Gryzinska, M., Ognik, K., Gil-Kulik, P., Kocki, J. (2018). Oxidative stress and effect of treatment on the oxidation product decomposition processes in IBD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*.
99. Tian, T., Wang, Z., Zhang, J. (2017). Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*.
100. Schoepfer, A. M., Beglinger, C., Straumann, A., Trummler, M., Vavricka, S. R., Bruegger, L. E., Seibold, F. (2010). Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, *105*(1), 162-169.

101. Van Rheenen, P. F., Van de Vijver, E., & Fidler, V. (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *Bmj*, *341*.
102. Bryant, R. V., Friedman, A. B., Wright, E. K., Taylor, K. M., Begun, J., Maconi, G., ... & Gibson, P. R. (2018). Gastrointestinal ultrasound in inflammatory bowel disease: an underused resource with potential paradigm-changing application. *Gut*, *67*(5), 973-985.
103. Oliveira, S. B., & Monteiro, I. M. (2017). Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *Bmj*, *357*.
104. Mowat, C., Cole, A., Windsor, A. L., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, *60*(5), 571-607.
105. Levine, A., Koletzko, S., Turner, D., Escher, J. C., Cucchiara, S., de Ridder, L., Wilson, D. C. (2014). ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *58*(6), 795-806.
106. Spiceland, C. M., Lodhia, N. (2018). Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World journal of gastroenterology*, *24*(35), 4014.
107. Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W., Sands, B. E., Reinisch, W., Bemelman, W., Bryant, R. V., Colombel, J. F. (2015). Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): determining therapeutic goals for treat-to-target. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, *110*(9), 1324-1338.
108. Sabino, J., Verstockt, B., Vermeire, S. (2019). New biologics and small molecules in inflammatory bowel disease. *An update. Therap Adv Gastroenterol*, *12*, 1756284819853208.
109. Chapman, T. P., Frias Gomes, C., Louis, E., Colombel, J. F., Satsangi, J. (2020). withdrawal of 5-aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *52*(1), 73-84.
110. Abraham, B. P., Ahmed, T., Ali, T. (2017). Inflammatory bowel disease: pathophysiology and current therapeutic approaches. *Gastrointestinal Pharmacology*, 115-146.
111. Shivaji, U. N., Sharratt, C. L., Thomas, T., Smith, S. C., Iacucci, M., Moran, G. W., Bhala, N. (2019). managing the adverse events caused by anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *49*(6), 664-680.
112. Panaccione, R., Ghosh, S., Middleton, S., Márquez, J. R., Scott, B. B., Flint, L., Rutgeerts, P. (2014). Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, *146*(2), 392-400.
113. Colombel, J. F., Sandborn, W. J., Reinisch, W., Mantzaris, G. J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Rutgeerts, P. (2010). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *New England journal of medicine*, *362*(15), 1383-1395.
114. Croft, A., Walsh, A., Doecke, J., Cooley, R., Howlett, M., Radford-Smith, G. (2013). Outcomes of salvage therapy for steroid-refractory acute severe ulcerative colitis: ciclosporin vs. infliximab. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *38*(3), 294-302.
115. Magro, F., Cordeiro, G., Dias, A. M., Estevinho, M. M. (2020). Inflammatory bowel disease–non-biological treatment. *Pharmacological Research*, *160*, 105075.
116. Dias, C. C., Portela, F., Fernandes, S., Ministro, P., Lago, P., Rosa, I., Magro, F. (2018). The timing of early therapeutic strategies has a significant impact on Crohn's disease prognosis. *Digestive and Liver Disease*, *50*(5), 462-468.
117. Solina G, Mandalà S, La Barbera C, Mandalà V. (2016). Current management of intestinal bowel disease: the role of surgery. *Updates Surg*; 68:13–23.
118. Ponsioen, C. Y., de Groof, E. J., Eshuis, E. J., Gardenbroek, T. J., Bossuyt, P. M., Hart, A., Morar, P. (2017). Laparoscopic ileocaecal resection versus infliximab for terminal ileitis in Crohn's disease: a randomised controlled, open-label, multicentre trial. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, *2*(11), 785-792.
119. Sica, G. S., & Biancone, L. (2013). Surgery for inflammatory bowel disease in the era of laparoscopy. *World journal of gastroenterology: WJG*, *19*(16), 2445.
120. Feinberg, A. E., Valente, M. A. (2019). Elective abdominal surgery for inflammatory bowel disease. *Surgical Clinics*, *99*(6), 1123-1140.
121. Gaglani, T., Davis, C. H., Bailey, H. R., Cusick, M. V. (2019). Trends and outcomes for minimally invasive surgery for inflammatory bowel disease. *Journal of Surgical Research*, *235*, 303-307.
122. Loftus Jr, E. V. (2019). The impact of biologic therapy on outcomes of inflammatory bowel disease surgery. *Gastroenterology & Hepatology*, *15*(5), 274.
123. Cohen, A. B., Lee, D., Long, M. D., Kappelman, M. D., Martin, C. F., Sandler, R. S., & Lewis, J. D. (2013). Dietary patterns and self-reported associations of diet with symptoms of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, *58*(5), 1322-1328.
124. Casanova, M. J., Chaparro, M., Molina, B., Merino, O., Batanero, R., Dueñas-Sadornil, C., Gisbert, J.

P. (2017). Prevalence of malnutrition and nutritional characteristics of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *11*(12), 1430-1439.
125. Zallot, C., Quilliot, D., Chevaux, J. B., Peyrin-Biroulet, C., Guéant-Rodriguez, R. M., Freling, E., Peyrin-Biroulet, L. (2012). Dietary beliefs and behavior among inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases*.
126. Bischoff, S. C., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S., Forbes, A. (2020). ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, *39*(3), 632-653.
127. Schreiner, P., Martinho-Grueber, M., Studerus, D., Vavricka, S. R., Tilg, H., Biedermann, L. (2020). on behalf of Swiss IBDnet, an official working group of the Swiss Society of Gastroenterology. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*, *101*(Suppl 1), 120-135.
128. Vidal-Lletjós, S., Beaumont, M., Tomé, D., Benamouzig, R., Blachier, F., Lan, A. (2017). Dietary protein and amino acid supplementation in inflammatory bowel disease course: what impact on the colonic mucosa? *Nutrients*, *9*(3), 310.
129. Mentella, M. C., Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gasbarrini, A., Miggiano, G. A. D. (2020). Nutrition, IBD and gut microbiota: a review. *Nutrients*, *12*(4), 944.
130. Sasson, A. N., Ananthakrishnan, A. N., Raman, M. (2021). Diet in treatment of inflammatory bowel diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *19*(3), 425-435.
131. Shafiee, N. H., Manaf, Z. A., Mokhtar, N. M., Ali, R. A. R. (2021). Anti-inflammatory diet and inflammatory bowel disease: what clinicians and patients should know?. *Intestinal research*, *19*(2), 171.
132. Rolandsdotter, H., Jönsson-Videsäter, K., L Fagerberg, U., Finkel, Y., Eberhardson, M. (2019). Exclusive enteral nutrition: Clinical effects and changes in mucosal cytokine profile in pediatric new inflammatory bowel disease. *Nutrients*, *11*(2), 414.
133. Levine, A., Wine, E., Assa, A., Boneh, R. S., Shaoul, R., Kori, M., Van Limbergen, J. (2019). Crohn's disease exclusion diet plus partial enteral nutrition induces sustained remission in a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, *157*(2), 440-450.1.
134. Martin, D. A., & Bolling, B. W. (2017). Food & Function. *Image*, *8*, 1438.
135. Kaulmann, A., & Bohn, T. (2016). Bioactivity of polyphenols: preventive and adjuvant strategies toward reducing inflammatory bowel diseases promises, perspectives, and pitfalls. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2016*.
136. Lu, Y., Zamora-Ros, R., Chan, S., Cross, A. J., Ward, H., Jakszyn, P., ... & Hart, A. R. (2017). Dietary polyphenols in the aetiology of crohn's disease and ulcerative colitis—a multicenter European prospective cohort study (EPIC). *Inflammatory bowel diseases*, *23*(12), 2072-2082.
137. de Oliveira, G. A. L., de la Lastra, C. A., Rosillo, M. Á., Martinez, M. L. C., Sánchez-Hidalgo, M., Medeiros, J. V. R., & Villegas, I. (2019). Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats is associated with inflammatory mediators inhibition and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways. *Chemico-Biological Interactions*, *297*, 25-33.
138. Rogler, G. (2015). Where are we heading to in pharmacological IBD therapy?. *Pharmacological research*, *100*, 220-227.
139. Vezza, T., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M. P., Rodriguez-Cabezas, M. E., Galvez, J. (2016). Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. *Nutrients*, *8*(4), 211.
140. Hollebeeck, S., Winand, J., Hérent, M. F., During, A., Leclercq, J., Larondelle, Y., Schneider, Y. J. (2012). Anti-inflammatory effects of pomegranate (Punica granatum L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food & function*, *3*(8), 875-885.
141. Scaioli, E., Belluzzi, A., Ricciardiello, L., Del Rio, D., Rotondo, E., Mena, P., Danesi, F. (2019). Pomegranate juice to reduce fecal calprotectin levels in inflammatory bowel disease patients with a high risk of clinical relapse: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *20*(1), 1-9.
142. Kim, H., Banerjee, N., Sirven, M. A., Minamoto, Y., Markel, M. E., Suchodolski, J. S., Mertens-Talcott, S. U. (2017). Pomegranate polyphenolics reduce inflammation and ulceration in intestinal colitis involvement of the miR-145/p70S6K1/HIF1α axis in vivo and in vitro. *The Journal of nutritional biochemistry*, *43*, 107-115.
143. Danesi, F., & Ferguson, L. R. (2017). Could pomegranate juice help in the control of inflammatory diseases?. *Nutrients*, *9*(9), 958.
144. Romier-Crouzet, B., Van De Walle, J., During, A., Joly, A., Rousseau, C., Henry, O., Schneider, Y. J. (2009). Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1221-1230.
145. Rasheed, Z., Akhtar, N., Anbazhagan, A. N., Ramamurthy, S., Shukla, M., Haqqi, T. M. (2009). Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-κB in human KU812

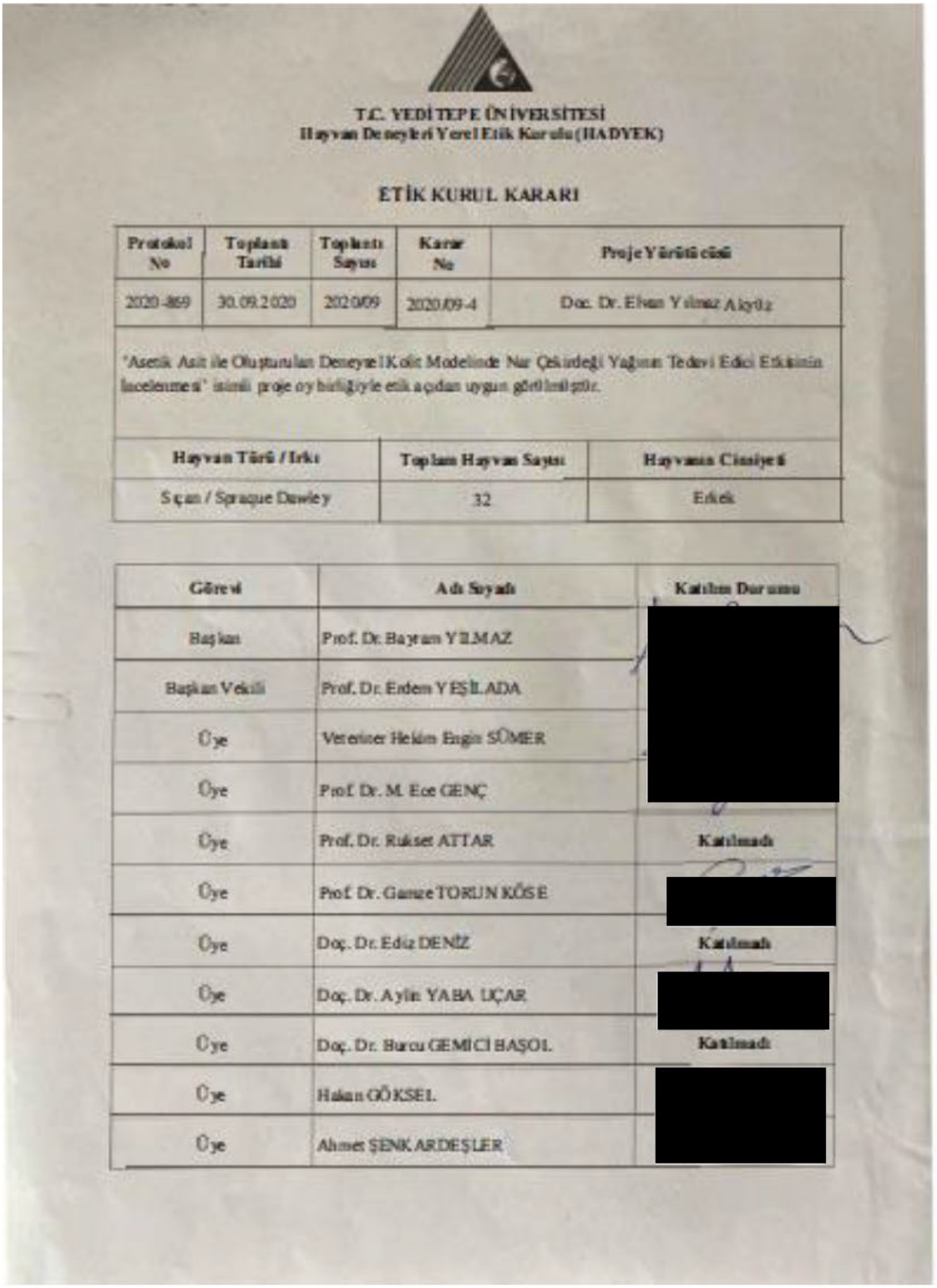
cells. *Journal of inflammation*, *6*(1), 1-12.
146. Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). A review study on Punica granatum L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *21*(3), 221-227.
147. Karimi, M., Sadeghi, R., Kokini, J. (2017). Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 59-73.
148. Aruna, P., Venkataramanamma, D., Singh, A. K., Singh, R. P. (2016). Health benefits of punicic acid: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 16-27.
149. Ge, S., Duo, L., Wang, J., Yang, J., Li, Z., Tu, Y. (2021). A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, Punica granatum L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology*, *271*, 113877.
150. Darabinia, M., Gorji, A. M., Chabra, A. (2016). Medicinal properties of pomegranate in Quran and Islamic Traditions (Hadith). *International Journal of Humanities and Cultural Studies*, *1*(1), 1591-601.
151. Saeed, M., Naveed, M., BiBi, J., Kamboh, A. A., Arain, M. A., Shah, Q. A., Dhama, K. (2018). The promising pharmacological effects and therapeutic/medicinal applications of Punica granatum L. (Pomegranate) as a functional food in humans and animals. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, *12*(1), 24-38.
152. Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010). Pomegranate: constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, *4*(2), 77-87.
153. Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *9*(6), 635-654.
154. Stojanović, I., Šavikin, K., Đedović, N., Živković, J., Saksida, T., Momčilović, M., Menković, N. (2017). Pomegranate peel extract ameliorates autoimmunity in animal models of multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, *35*, 522-530.
155. Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N., Chujo, H., Maeda, H., Kohno-Murase, J., Yamada, K. (2006). Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition*, *22*(1), 54-59.
156. Drinić, Z., Mudrić, J., Zdunić, G., Bigović, D., Menković, N., Šavikin, K. (2020). Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate seed oil. *Food Chemistry*, *333*, 127501.
157. Melgarejo, P., & Artes, F. (2000). Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(10), 1452-1454.
158. Badr, A. N., Ali, H. S., Abdel-Razek, A. G., Shehata, M. G., Albaridi, N. A. (2020). Bioactive components of pomegranate oil and their influence on mycotoxin secretion. *Toxins*, *12*(12), 748.
159. Mollazadeh, H., Sadeghnia, H. R., Hoseini, A., Farzadnia, M., Boroushaki, M. T. (2016). Effects of pomegranate seed oil on oxidative stress markers, serum biochemical parameters and pathological findings in kidney and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal failure*, *38*(8), 1256-1266.
160. Spilmont, M., Léotoing, L., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mercier, S., Miot-Noirault, E., Coxam, V. (2013). Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *The Journal of nutritional biochemistry*, *24*(11), 1840-1848.
161. Rahimi, R., Mozaffari, S., & Abdollahi, M. (2009). On the use of herbal medicines in management of inflammatory bowel diseases: a systematic review of animal and human studies. *Digestive diseases and sciences*, *54*(3), 471-480.
162. Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D., Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(3), 980-985.
163. Singh, K., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2009). Exploring the ameliorative potential of Punica granatum in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytotherapy Research*, *23*(11), 1565-1574.
164. Cagin, Y. F., Parlakpinar, H., Vardi, N., Polat, A., Atayan, Y., Erdogan, M. A., Tanbek, K. (2016). Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *12*(5), 2958-2964.
165. MacPherson, B. R., & Pfeiffer, C. J. (1978). Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, *17*(2), 135-150.
166. Osafo, N., Obiri, D. D., Danquah, K. O., Essel, L. B., Antwi, A. O. (2019). Potential effects of xylopic acid on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, *30*(8), 732.
167. Aguilar-Nascimento, J. E., França-da-Silva, L. R., De-Oliveira, A. F., Gomes-da-Silva, M. H. (1999). Enhanced mucosal re-epithelialization induced by short chain fatty acids in experimental colitis. *Brazilian journal of medical and biological research*, *32*(8), 961-966.
168. Kayha, E. (2013). Asetik asit ile deneysel kolit oluşturulan sıçanlarda Sirolimus kullanımının

inflamatuvar sürece etkisi.
169. Boroushaki, M. T., Rajabian, A., Farzadnia, M., Hoseini, A., Poorlashkari, M., Taghavi, A., Bazmandegan, G. (2015). Protective effect of pomegranate seed oil against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *Renal failure*, *37*(8), 1338-1343.
170. Boroushaki, M. T., Mollazadeh, H., Rajabian, A., Dolati, K., Hoseini, A., Paseban, M., Farzadnia, M. (2014). Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. *Renal failure*, *36*(10), 1581-1586.
171. Boroushaki, M. T., Asadpour, E., Sadeghnia, H. R., & Dolati, K. (2014). Effect of pomegranate seed oil against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Journal of food science and technology*, *51*(11), 3510-3514.
172. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, *98*(3), 694-702.
173. Yagi, K. (1984). Assay for blood plasma or serum. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 328-331). Academic press.
174. Beutler, E. (1975). Glutathione in red blood cell metabolism. *A manual of biochemical methods*, 112-114.
175. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, *37*(4), 277-285.
176. Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2014*(6), pdb-prot073411.
177. Serafino, A., Moroni, N., Zonfrillo, M., Andreola, F., Mercuri, L., Nicotera, G., Pierimarchi, P. (2014). WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer. *Oncotarget*, *5*(4), 978.
178. Chen, J., Jayachandran, M., Zhang, W., Chen, L., Du, B., Yu, Z., Xu, B. (2019). Dietary supplementation with sea bass (Lateolabrax maculatus) ameliorates ulcerative colitis and inflammation in macrophages through inhibiting Toll-like receptor 4-linked pathways. *International journal of molecular sciences*, *20*(12), 2907.
179. Bancroft, J. D., & Gamble, M. (Eds.). (2008). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.M., Sharkey, K. A., & Wallace, J. L. (1994). Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *266*(4), G560-G567.
180. McCAFFERTY, D. M., Sharkey, K. A., & Wallace, J. L. (1994). Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *266*(4), G560-G567.
181. Elsherif, Y., Alexakis, C., & Mendall, M. (2014). Determinants of weight loss prior to diagnosis in inflammatory bowel disease: a retrospective observational study. *Gastroenterology Research and Practice*, *2014*.
182. Yuan, H., Ji, W. S., Wu, K. X., Jiao, J. X., Sun, L. H., Feng, Y. T. (2006). Anti-inflammatory effect of Diammonium Glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, *12*(28), 4578.
183. Chen, Z., Ni, W., Yang, C., Zhang, T., Lu, S., Zhao, R., Yu, J. (2018). Therapeutic effect of Amomum villosum on inflammatory bowel disease in rats. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 639.
184. Dosh, R. H., Jordan-Mahy, N., Sammon, C., Le Maitre, C. (2019). Interleukin 1 is a key driver of inflammatory bowel disease-demonstration in a murine IL-1Ra knockout model. *Oncotarget*, *10*(37), 3559.
185. Gareb, B., Otten, A. T., Frijlink, H. W., Dijkstra, G., Kosterink, J. G. (2020). local tumor necrosis factor-α inhibition in inflammatory bowel disease. *Pharmaceutics*, *12*(6), 539.
186. Asghari, G., Sheikholeslami, S., Mirmiran, P., Chary, A., Hedayati, M., Shafiee, A., Azizi, F. (2012). Effect of pomegranate seed oil on serum TNF-α level in dyslipidemic patients. *International journal of food sciences and nutrition*, *63*(3), 368-371.
187. Kim, H., Banerjee, N., Ivanov, I., Pfent, C. M., Prudhomme, K. R., Bisson, W. H., ... & Mertens-Talcott, S. U. (2016). Comparison of anti-inflammatory mechanisms of mango (Mangifera Indica L.) and pomegranate (Punica Granatum L.) in a preclinical model of colitis. *Molecular nutrition & food research*, *60*(9), 1912-1923.
188. Zhao, R., Long, X., Yang, J., Du, L., Zhang, X., Li, J., & Hou, C. (2019). Pomegranate peel polyphenols reduce chronic low-grade inflammatory responses by modulating gut microbiota and decreasing colonic tissue damage in rats fed a high-fat diet. *Food & function*, *10*(12), 8273-8285.
189. McDaniel, D. K., Eden, K., Ringel, V. M., Allen, I. C. (2016). Emerging roles for noncanonical NF-κB signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology. *Inflammatory bowel*

diseases, *22*(9), 2265-2279.
190. Xu, X., Yin, P., Wan, C., Chong, X., Liu, M., Cheng, P., Xu, J. (2014). Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF-κB activation. *Inflammation*, *37*(3), 956-965.
191. Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Espín, J. C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*, *21*(8), 717-725.
192. González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., Dolara, P., & Espín, J. C. (2010). NF-κB-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *British Journal of Nutrition*, *104*(4), 503-512.
193. Chami, B., Martin, N. J., Dennis, J. M., Witting, P. K. (2018). Myeloperoxidase in the inflamed colon: a novel target for treating inflammatory bowel disease. *Archives of biochemistry and biophysics*, *645*, 61-71.
194. Ogawa, Y., Kanatsu, K., Iino, T., Kato, S., Jeong, Y. I., Shibata, N., Takeuchi, K. (2002). Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life sciences*, *71*(7), 827-839.
195. Barati Boldaji, R., Akhlaghi, M., Sagheb, M. M., Esmaeilinezhad, Z. (2020). Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: A randomized crossover trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(2), 846-854.
196. Toklu, H. Z., Sehirli, O., Sener, G., Dumlu, M. U., Ercan, F., Gedik, N., & Gökmen, V. (2007). Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(9), 1287-1295.
197. Boroushaki, M. T., Arshadi, D., Jalili-Rasti, H., Asadpour, E., Hosseini, A. (2013). Protective effect of pomegranate seed oil against acute toxicity of diazinon in rat kidney. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *12*(4), 821.
198. Raffaele, M., Licari, M., Amin, S., Alex, R., Shen, H. H., Singh, S. P., Abraham, N. G. (2020). Cold press pomegranate seed oil attenuates dietary-obesity induced hepatic steatosis and fibrosis through antioxidant and mitochondrial pathways in obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5469.
199. Nekooeian, A. A., Eftekhari, M. H., Adibi, S., Rajaeifard, A. (2014). Effects of pomegranate seed oil on insulin release in rats with type 2 diabetes. *Iranian journal of medical sciences*, *39*(2), 130.
200. Mollazadeh, H., Boroushaki, M. T., Soukhtanloo, M., Afshari, A. R., Vahedi, M. M. (2017). Effects of pomegranate seed oil on oxidant/antioxidant balance in heart and kidney homogenates and mitochondria of diabetic rats and high glucose-treated H9c2 cell line. *Avicenna journal of phytomedicine*, *7*(4), 317.
201. Saha, S. S., & Ghosh, M. (2009). Comparative study of antioxidant activity of α-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(10), 2551-2556.
202. Yayla, M., Cetin, D., Adali, Y., Kilicle, P. A., Toktay, E. (2018). Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, *21*(12), 1262.
203. Bihamta, M., Hosseini, A., Ghorbani, A., & Boroushaki, M. T. (2017). Protective effect of pomegranate seed oil against H2O2-induced oxidative stress in cardiomyocytes. *Avicenna journal of phytomedicine*, *7*(1), 46.
204. Zafari Zangeneh, F., Naghizadeh, M. M., & Amini, F. (2015). The effect of pomegranate juice, date palm and fig fruit in treatment and prevention of experimental acute colitis model on rat: Immunopathogenesis aspect. *J. Biol. Today's World*, *4*(4), 95-102.
205. Parisio, C., Lucarini, E., Micheli, L., Toti, A., Khatib, M., Mulinacci, N., Ghelardini, C. (2020). Pomegranate Mesocarp against Colitis-Induced Visceral Pain in Rats: Effects of a Decoction and Its Fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4304.

EKLER

EK-1.Etik Kurul İzni



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

ETİK KURUL KARARI

Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2020-869	30.09.2020	2020/09	2020/09-4	Doç. Dr. Ebru Yılmaz Akyüz

"Asetik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Nar Çekirdeği Yağının Tedavi Edici Etkisinin İncelenmesi" isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.

Hayvan Türü / Irkı	Toplam Hayvan Sayısı	Hayvanın Cinsiyeti
Sıçan / Sprague Dawley	32	Erkek

Görevi	Adı Soyadı	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	[redacted]
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Üye	Veteriner Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	Katılmadı
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	[redacted]
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	Katılmadı
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	[redacted]
Üye	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL	Katılmadı
Üye	Hakan GÖKSEL	[redacted]
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	

EK-2.Bilimsel Araştırma Proje Onayı

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNATÖRLÜĞÜ
DOKTORA PROJESİ SÖZLEŞMESİ

..../..../ 20... Prof. Dr. Yunus KARAKOÇ Rektör Yardımcısı	..../..../ 20... Doç. Dr. Elvan YILMAZ AKYÜZ Proje Yürütücüsü

Proje Yürütücüsü Tarafından Doldurulacak Alanlar	
Proje Başlığı	Asetik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Nar Çekirdeği Yağının Tedavi Edici Etkisinin İncelenmesi
Projenin Süresi (ay)	24 Ay
Proje Türü	Doktora Projesi
BAP Birimi Tarafından Doldurulacak Alanlar	
Proje Kodu	2021/079
Başlangıç Tarihi	05-05-2021
Proje Bütçesi	28.727,71 TL

SÖZLEŞME METNİ

1-Çalışmanın, Sağlık Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü Uygulama Yönergesi ve destekleme esaslarına bağlı kalarak BAP Komisyonun kabul ettiği süre, amaç kapsam, bütçe ve diğer şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasında proje yürütücüsü sorumludur.

a)İnsanlar üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalar için Etik Kurul İzni alınması zorunludur.

b)Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalar için Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul izni alınması zorunludur.

c)İnsanlar ve Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalar için zorunlu olan Etik Kurul onayının alınması proje yürütücüsünün sorumluluğundadır.

d) Desteklenmesine karar verilen projenin, amaç, kapsam, süre, isim, program ve bütçesinde SBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.

2-İlgili Birime teçhizat sağlamayı öngören türden proje başvuruları desteklenmez. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından yurt içinde veya yurt dışından temin edilerek projeye tahsis edilen her türlü teçhizat ilgili proje yürütücüsünün bağlı olduğu Birim demirbaşına kayıt edilir ve yetkili mutemede zimmet edilir. Gerektiğinde ilgili demirbaş, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenen diğer projelerde kullanılabilir. Demirbaşlar proje süresince, yürütücünün gözetimi ve sorumluluğundadır.

3-Proje yürütücüsü, sözleşme tarihinden itibaren altı aylık dönemlerde BAP Komisyonu'nun belirlediği format ve kapsama uygun olarak ara rapor vermekle yükümlüdür. Yürütücü BAP Komisyonu'nun talep etmesi durumunda proje çalışması ile ilgili diğer bilgileri de BAP Koordinatörlüğü'ne vermekle yükümlüdür.

4-Komisyon gerekli gördüğü hallerde proje çalışmasını doğrudan yerinde inceleyebilir veya konunun uzmanlarına inceletebilir. Bu durumlarda yürütücü çalışma ile ilgili her türlü teknik idari ve mali bilgiler ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla yükümlüdür. Ara raporların zamanında verilmemesi, projenin başvuruda öngörülen amaca uygun olarak yürütülmemesi, yapılan harcamaların projenin amacı ve içeriğine veya sözleşme şartlarına uygun olarak kullanılmaması gibi durumlarda projeler Komisyon kararı ile iptal edilebilir. Bu kapsamda iptal edilen proje yürütücülerine 2 yıl süreyle herhangi bir türde proje desteği sağlanmaz. Ayrıca, proje kapsamında BAP Birimi tarafından temin edilmiş olan araç, gereç ve donanım ile kalan sarf malzemesi derhal geri alınır ve Komisyon tarafından uygun görülen başka bir araştırıcı veya araştırma grubuna güdümlü olarak verilir.

5-Proje yürütücüsü, çalışmanın yürütüldüğü yerde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından İş Kanunu, Sosyal Sigortalar Kanunu ve ilgili diğer kanun, tüzük ve yönetmenliklere göre gerekli her türlü güvenlik tedbirlerinin alınmasından sorumludur.

6-Proje kapsamında gerçekleştirilen satın alma işlemlerinin, onaylanan bütçenin altında bir meblağ ile gerçekleşmesi durumunda kalan tutarın ilave alımları için kullanılabilmesi Komisyonun iznine bağlıdır.

7-Avans veya Kredi talebi ve alınan avans veya kredinin mahsubu, proje yürütücüsünün bağlı olduğu birimce görevlendirilen kişi tarafından kanıtlayıcı evrak karşılığı yapılır. Proje yürütücüsü, avans veya krediyi süresi içinde kapatılmasının takibinden sorumludur. Verilen avans veya kredinin usulüne uygun mahsubu yapılmadan yeniden avans veya kredi verilmez.

8-Komisyon kararı ile projeye ek süre verilmesi durumunda bu sözleşme, söz konusu süreyi kapsayacak şekilde uzamış sayılır. Sözleşme süresinin uzatılması, proje yürütücüsünün yazılı talebi ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca uygun görülmesine bağlıdır. Ancak bu şekilde verilecek ek süre Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Yönetmeliği gereği projeye verilecek süre ek süreler dahil 3 yılı aşamaz.

9-Proje yürütücüsü, protokolde belirtilen bitiş tarihini izleyen 3 ay içerisinde, Komisyon'un belirlediği formata uygun olarak hazırlanmış proje sonuç raporunu teslim etmek zorundadır. Ayrıca, var ise araştırma devam ederken yayımlanan bilimsel yayınların birer örneği de raporu ile birlikte sunulur.

10-Bağımsız Araştırma Projelerinde, yeni bir proje desteği verilebilmesi için, çalışmanın uluslararası atıf indekslerine giren dergilerde bir yayın ile sonuçlanması ve yayında "SBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü" desteğinin belirtilmesi zorunludur.

11-BAP Birimince desteklenen projeler kapsamında gerçekleştirilen her türlü yayın ve tezde "Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce Desteklenmiştir. Proje Numarası: 2021/079" ("This work was supported by Research Fund of the Sağlık Bilimleri University. Project Number: 2021/079") şeklinde veya benzer anlama gelecek bir ibareye yer verilmesi zorunludur.

12-Proje ekibi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilim Etiği Normları, Etik Kurulu ve Çalışma Esaslarına uymakla yükümlüdür. Etik ilkelere aykırılık tespit edilmesi durumunda, proje için yapılan harcamalar proje yürütücüsünden yasal faizi ile birlikte geri alınır ve etik ihlali yapanlar 4 yıl süre ile BAP birimi desteklerinden faydalandırılmazlar.

13-Proje yürütücüleri, satın alınmasına karar verilen mal ve hizmetlerin, ilgili firmalar tarafından ihale sözleşmesinde belirtilen sürelerde kendilerine teslim edilmemesi durumunda, BAP birimini bilgilendirmekle yükümlüdür. Aksi takdirde söz konusu ihaleler iptal edilir.

14-Projeler kapsamında, Sağlık Bilimleri Üniversitesi birimleri veya diğer kurumlar tarafından sağlanan seyahat, kongre/sempozyum katılım bedeli gibi herhangi bir destek türü için, BAP birimince ayrıca destek sağlanmaz. Bu ilkeye aykırı hareket edildiğinin tespit edilmesi durumunda gerçekleştirilen harcamaların bedelleri yasal faizi ile birlikte ilgili araştırmacıdan geri alınır ve ilgili araştırmacı 4 yıl süre ile BAP birimi desteklerinden faydalandırılmaz.

15-Proje yürütücüsü projeye ait tüm kayıt ve verileri beş yıl süre ile saklamak zorundadır.

16-Bu sözleşme ile ilgili yazışma ve tebligat proje yürütücüsünün başvuru aşamasında görev yapmakta olduğu adrese yapılır. Proje sahibi, adresini değiştirdiği takdirde bunu en geç on gün içerisinde BAP birimine bildirmekle yükümlüdür. Adres değişikliği bildirilmemiş ise eski adrese gönderilen yazı ve tebligat yeni adrese yapılmış sayılır.

17-Sözleşmede belirtilmeyen hususlar ile ilgili olarak, Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü uygulama yönergesi ve ilgili yönetmelik hükümleri ile genel mevzuat hükümleri uygulanır.

18-Anlaşmazlık halinde yetkili merci İstanbul mahkeme ve İcra Daireleridir.

Yukarıda yazan sözleşme maddelerini okudum ve tamamını kabul ettim. .... /.... / 20...

Doç. Dr. Elvan YILMAZ AKYÜZ
İmza

EK-3.G Power Güç Analizi

G-POWER SONUÇ RAPOR

F tests - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

Analysis:	A priori: Compute required sample size		
Input:	Effect size f	=	0,65
	α err prob	=	0,05
	Power (1-β err prob)	=	0,8
	Number of groups	=	4
Output:	Noncentrality parameter λ	=	13,5200000
	Critical F	=	2,9466853
	Numerator df	=	3
	Denominator df	=	28
	Total sample size	=	32
	Actual power	=	0,8315831

Yapılan literatür taramasında üzerinde çalışılacak yöntemlere ilişkin yüzde ölçüm değerleri baz alınarak 0,65 etki büyüklüğü, % 80 güç ve 0,05 hata payı ile G-POWER programı kullanılarak bulunan toplam örneklem büyüklüğü n=32'dir.

Hesaplamanın temelinde 4 bağımsız grup düşünülerek ANOVA Testi için örneklem sayısı belirlenmiştir. Grup oranları birbirine eşittir. Her bir grup için n= 8 olarak düzenlenmiştir.

EK-4.Nar Çekirdeği Yağı Analiz

1888'den beri
Helvacızade

ZADE VİTAL İLAÇ KİMYA GIDA SAN. VE TİC. A.Ş.
SOĞUK PRES YAĞ KONTROL SERTİFİKASI
ZADE VITAL PHARMA CHEMICALS & FOOD INC.
COLD PRESSED OIL CONTROL CERTIFICATE

ZADE|VITAL

Ürün İsmi (Product name)	: SOĞUK PRES NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI (COLD PRESSED POMEGRANATE SEED Oil)	Üretici (Manufacturer)	: ZADE VİTAL
Ürün Kod no (Product Code no)	: YAG_004	Üretim tarihi (Manufacturing date)	: 03.2019
Parti no (Batch no)	: 900401	Son kullanma tarihi (Expiry date)	: 03.2022
Doküman kod no (Document code no)	: KM_YAG-004_01_SER	Numune alma tarihi (Sampling date)	: 20.03.2019
Saklama koşulları & önlemler (Storage conditions & precautions)	: 25°C nin altında kuru ortamda ışıktan korunarak saklayınız. (Keep away from sunlight and store at room temperature below 25°C)		

	ANALİZ PARAMETRELERİ	ANALYSIS PARAMETERS	SPESİFİKASYONLAR SPECIFICATION	SONUÇLAR RESULTS	BİRİM UNIT	METODLAR METHODS
1.	Görünüş	Appearance	Sarı, berrak sıvı Yellow, clear liquid	Uygun Complies		Organoleptic
2.	Koku	Odor	Kendine özgü Characteristic	Uygun Complies		Organoleptic
3.	Tat	Taste	Kendine özgü Characteristic	Uygun Complies		Organoleptic
4.	Yağ Asit Kompozisyonu	Fatty Acid Composition			% Alan Area %	Firma içi metod inhouse method
		Palmitic Acid C 16:0	2.00 – 4.50	2.18		
		Stearic Acid C 18:0	1.00 – 3.00	1.69		
		Oleic Acid C 18:1	3.50 – 10.00	3.80		
		Linoleic Acid C 18:2	4.00 – 12.00	4.50		
		Linolenic Acid C 18:3	Max. 2.00	0.10		
		Arachidic Acid C 20:0	Max. 1.00	0.43		
		Eicosenic Acid C 20:1	Max. 1.00	0.69		
		Behenic Acid C 22:0	Max. 2.00	0.10		
		Punicic Acid C 18:3 n-5	65.00 – 90.00	85.26		
5.	Asit Değeri	Acid Value	Max. 5.0	1.5	mg KOH / g yağ (of oil)	Ph. Eur. 2.5.1
6.	Kırılma İndisi	Refractive Index	1.4770 - 1.5150	1.5038	(40°C)	Ph. Eur. 2.2.6
7.	Peroksit	Peroxide Value	Max. 10.0	1.5	meq O_2 / kg yağ (of oil)	Ph. Eur. 2.5.5
8.	Sabunlaşmayan Madde Miktarı	Unsaponifiable Matter	Max. 2.0	1.2	%	Ph. Eur. 2.5.7
9.	Sabunlaşma Sayısı	Saponification Value	180.0 – 200.0	193.0		Ph. Eur. 2.5.6
10.	İyot Sayısı	Iodine Value	220.0 – 239.0	232.0	Wijs	Ph. Eur. 2.5.4
11.	Özgül Ağırlık	Relative Density	0.925 - 0.945	0.938	(25°C) g/ml	Ph. Eur. 2.2.5
12.	Mikrobiyal Kontaminasyon	Microbial Contamination				Ph. Eur. 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4, 5.1.8
		TAMC	Max. 10^4	$< 1.0^4$	cfu / g	
		TYMC	Max. 10^2	$< 10^2$	cfu / g	
		Bile-tolerant gram-negative bacteria	Max. 10^2	$< 10^2$	cfu / g	
		Escherichia coli	Negative / g	Negative		
		Salmonella	Negative /10 g	Negative		

KABA (Brief result)	ANALİZİ YAPAN (Analysis by)	KONTROL EDEN (Control by)	ONAYLAYAN (Approved by)
	ADI/SOYADI/TARİH/İMZA (Name/Surname/Date/Signature)	ADI/SOYADI/TARİH/İMZA (Name/Surname/Date/Signature)	ADI/SOYADI/TARİH/İMZA (Name/Surname/Date/Signature)
[V] UYGUN (Approved)	Kalite Kontrol Analisti (Quality Control Analyst) Zeliha SARI 28.03.2019	Mikrobiyoloji Laboratuvar Sorumlusu (Microbiology Laboratory Supervisor) Şeyma AKALIN BENDİ 28.03.2019	Kalite Kontrol Sorumlusu (Quality Control Responsible) Ali GÖKYER 28.03.2019	Kalite Güvence Sorumlusu (Quality Assurance Responsible) Gizem NAHRAMAN 28.03.2019
[ ] UYGUN DEĞİL (Not Approved)				
AÇIKLAMA (Explanation)				