



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report

Müşterinin Adı / Customer's Name	Zarenca Gıda Üretim İth. İhr. Ltd. Şti.				
Müşterinin Adresi / Customer's Address	Şükrüpaşa Mah. Şehit Halis Zeki Saltık Cad. No:14 Kahraman Apt. A Blok A1 EDİRDE				
Telefon Numarası ve e-mail / Phone Number and e-mail	05443333221 info@zarenca.com				
Numunenin Adı ve Tarifi / Name and Description of the Sample	Zarenca 500ml (Gıda Onay numarası 017131-13.04.2023)				
Deney Adı / Test Name	Doku Takibi ve Parafine Bloklama, Mikrotom Kesit Alma, Hematoksilen Eozin Boyama, Histolojik ve Histopatolojik Analiz ve Raporlama				
İlgili Laboratuvar / Related Laboratory	DOKU BİLİMLERİ LABORATUVARI				
Kullanılan Cihaz Adı / Used Device Name	Kapalı Doku Takip Cihazı (Thermo Excelsior ES), Rotary Mikrotom (Leica RM 2255), Trinoküler Araştırma Mikroskopu (Leica DM5000)				
Kullanılan Metot Adı / Used Method Name	-				
Numune Kabul Kayıt Numarası / Sample Acceptance Registration Number	2023/0486				
Numune Kabul Tarihi / Sample Acceptance Date	29.12.2023	Deney Tarihi / Date of Test	29.12.2023	Deney Sayısı / Number of Test	5
Numune Alma Tarihi / Sampling Date	29.12.2023				

Rapor Numarası / Report Number	2023/0486-DBL-2, 2023/0486-DBL-3, 2023/0486-DBL-4, 2023/0486-DBL-5, 2023/0486-DBL-6		
Rapor Tarihi / Report Date	08.01.2024	Rapor Toplam Sayfa Sayısı / Report Total Page	7

Deney Sonuçlarına göre Uygunluk/Uymazlık Değerlendirmesi alındı mı? ☐ Evet ☐ Hayır	Açıklamalar
Feragat Beyanı ☐ Alındı ☐ Alınmadı	Açıklamalar

Bu deney raporu, yukarıda yazılı Numune Kabul Kayıt Numaralı talebe istinaden yapılan deney sonucunda ilgili Rapor Numarası ile hazırlanmıştır. Bu deney raporu, deney yapılan cihazdan alınan sonuç çıktısıyla birlikte yukarıda belirtilen sayfa sayısındadır. Sonuçlar yukarıda adı ve kayıt numarası yazan numuneye aittir. Numune müşteri tarafından sağlandığı için, bu deney raporunda yer alan sonuçlar numunenin teslim alındığı hali için geçerlidir. Deney sonuçları cihaz çıktısı (varsa) ve KÜBTUAM tarafından verilen bu raporla birlikte bir bütün olduğundan rapordan bölümler halinde alıntı yapılamaz. Bu rapor 1 adedi müşteriye verilmek üzere, 1 adedi de KÜBTUAM' de kalmak üzere 2 adet hazırlanmıştır. Sonuç raporu deney yapan personel ve laboratuvar sorumlusu tarafından imzalanır. Cihaz çıktıları ise paraflanır. İmza ve paraf bulunmayan rapor geçersizdir. Rapor çoğaltılması işlemi KÜBTUAM sorumluluğundadır. Haricinde raporun tamamı veya bir kısmı çoğaltılamaz. Sonuç raporu KÜBTUAM' in onayı alınmadan ticaret ve reklam amaçlı kullanılamaz. Deney sonuçlarının Bilimsel Yayın, Konferans vb. için kullanılması durumunda deneylerin yapıldığı yer Olarak Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama Ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM) yazılması zorunludur.

This test report has been prepared with the relevant report number as the result of the test made in the request of the customer. This test report is the number of pages mentioned above together with the result from the experiment device. The results belong to the sample with the above name and registration number. As the test sample provided by the customer, the test results given in the report are viable for the received sample condition at registration. Since the test results are whole with output from the device and report given by KÜBTUAM, they can not be quoted in sections from test results. This report has been prepared in duplicate to be given to a customer and one to stay in KÜBTUAM. The test report is signed by the laboratory staff and the laboratory officer. The device outputs are signed with initials of the responsible persons. The report without signature and paraphrase is invalid. The process of replicating the report is the KÜBTUAM responsibility. The test report may not be reproduced in whole or in part. The final report can not be used for commercial or advertising purposes without KÜBTUAM's approval. it is necessary to write Kırıkkale University Scientific And Technological Research Application And Research Center (KÜBTUAM) when test result using for scientific publication.



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report

Rapor Numarası / Report Number

2023/0486-DBL-2, 2023/0486-DBL-3, 2023/0486-DBL-4, 2023/0486-DBL-5, 2023/0486-DBL-6

DENEY SONUCU / Test Result:

1. Amaç ve Tanım

Bu çalışmada, ratlarda % 4 DSS oral yolla verilerek kolon mukoza epiteli hasarı ve başlıca nötrofilik reaksiyonla karakterize ülseratif kolitis oluşturulması ve insanlarda enflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD; Chron hast., ülseratif kolitis) benzeri deney hayvanın modelinde, testi talep eden firma tarafından temin edilen oral gıda takviyesi ticari ürünün (Zarenca, 500ml) hastalığı önleyici etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Analizler

Çalışmada; 8 haftalık erkek wistar albino ratlara oral yolla DSS (Dekstran 40, 100mg/ml) % 4 konsantrasyonda 14 gün süreyle uygulanarak ülseratif kolitis modeli oluşturuldu (Chassing ve ark., 2014, Current Protoc Immunol, 104:15-25). Deney grupları aşağıdaki şekilde dizayn edildi;

Grup 1: Ülseratif kolitis grubu (n=3), Bu grupta deney süresince yalnız %4 DSS 14 gün içme suyu ile uygulandı.

Grup 2: Tedavi grubu (n=3), 14 gün süreyle DSS (Dekstran 40, 100mg/ml) %4 içme suyu ile verilirken, 1.5 ml Zarenca oral gıda takviyesi günlük olarak oral gavaj ile uygulandı.

Çalışma süresince; ratların canlı ağırlıkları günlük olarak ölçüldü ve gruplardaki ratların % vücut ağırlığı değişimleri ölçüm yapılan gün ağırlığı ile deney başlangıcındaki ağırlıkları arasındaki fark alınarak, % değişim şeklinde hesaplandı. %10 ve daha yüksek canlı ağırlık azalması DSS uygulaması ile kolitis modelinin oluştuğunun doğrulanmasında kriter olarak kabul edildi. Diğer taraftan, 3 günde bir feces görünümü, kıvamı ve rengi yönünden değerlendirildi.

Distal kolon uzunluğu, sekum ile rektum arasındaki kalın bağırsak bölümleri mezenteriyal bağlantılar abdomende kalacak şekilde diseke edildikten sonra ölçülerek kaydedildi.

Histopatolojik incelemeler için alınan koronal kolon dokuları 24-48 saat süreyle %10 tamponlu formalinde tespit edilecek ve rutin doku takip prosedürlerinden sonra parafine emdirilerek 4um kalınlığında alınan kesitleri HE ile boyandı ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede; mukoza epitel bütünlüğü, L propriyada enflamasyon, hiperemi/hemoraji, nekroz ve kript hasarı kriterleri dikkate alınarak aşağıdaki tanımlandığı şekilde semikantitatif skorlama yapıldı (Clin Exp Immunol. 1998 Dec; 114(3): 385–391). Herbir kriter skoru, lezyon yaygınlığı ile çarpıldıktan sonra, her üç kriterin skoru toplanarak toplam skor belirlendi.

Enflamasyon şiddeti; 0: Yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Şiddetli

Enflamasyon yayılımı; 0: Yok, 1: Mukoza, 2: Submukoza, 3: Transmural

Kript hasarı; 0: Yok, 1: Bazal 1/3 hasarlı, 2: Bazal 2/3 hasarlı, 3: Total kript kaybı, 4: Kript ve yüzey epiteli kaybı

Yüzde tutulum; 0: %0, 1: %1-25, 2: %26-50, 3: %51-75, 4: %76-100

3. Hematoksilen Eozin Boyama

Mikrotom kullanılarak 4-5µ kalınlığında alınan kesitler, üç seri ksilolde toplamda 5'er dakika sürelerle deparafinize edildi. Ardından, kesitler sırasıyla 3 dakika boyunca absolut alkole, 2'er dakika boyunca %96, %80, %70 ve %50'lik alkolde bekletildi. Alkol serisinden çıkan doku preparatları distile su içerisinde 2 dakika



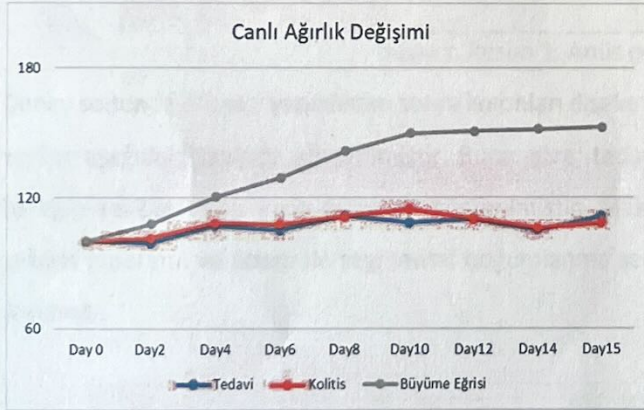
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report

bekletildi. Mayer's Hematoksilen solüsyonunda 6 dakika boyunca bekletildi ve sonra akan çeşme suyu altında yıkandı. Daha sonra, 1 dakika boyunca Eosin solüsyonunda bekletilen kesitler, sırasıyla %50, %70, %80 ve %96 alkol serilerinin her birinde 1 dakika bekletildikten sonra absolut alkolde 3 dakika bekletildi. Son olarak, 3 seri ksilolde 5'er dakika boyunca bekletildi ve Entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. Boyanan kesitler histopatolojik yönden değerlendirilerek, Leica DMI 5000B mikroskop ve Leica DFC 425C dijital kamera kullanılarak mikrofotografı çekildi.

4. Sonuçlar

Deney süresince ratların canlı ağırlık değişiminin, başlangıç ağırlıklarına göre % olarak değeri Figür 1'de verilmiştir. Bu figürde, wistar albino rat ırkına ait eşzamanlı yaş büyüme eğrisi de referans olarak gösterilmiştir. Buna göre, DSS uygulamasını 4ncü gününden itibaren ağırlık kaybının kolitis ve tedavi gruplarında %10'un üzerinde şekillendiği tespit edildi. DSS uygulamasının 8 nci günden itibaren ise tedavi grubunda yatay bir seyir izleyerek deney sonuna kadar sabit kaldığı, ilaç uygulanmayan kolitis grubunda ise hafif derecede daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir.



Figür 1. Canlı ağırlık değişim grafiği

	Day 0	Day2	Day4	Day6	Day8	Day10	Day12	Day14	Day15
Tedavi	100	99,36	107,19	105,11	111,82	108,66	110,41	105,20	111,42
Kolitis	100	101,55	108,54	108,00	111,63	114,92	110,61	106,36	108,82
Büyüme Eğrisi	100	108	120,4	129,1	141,4	149,6	150,6	151,6	152,6

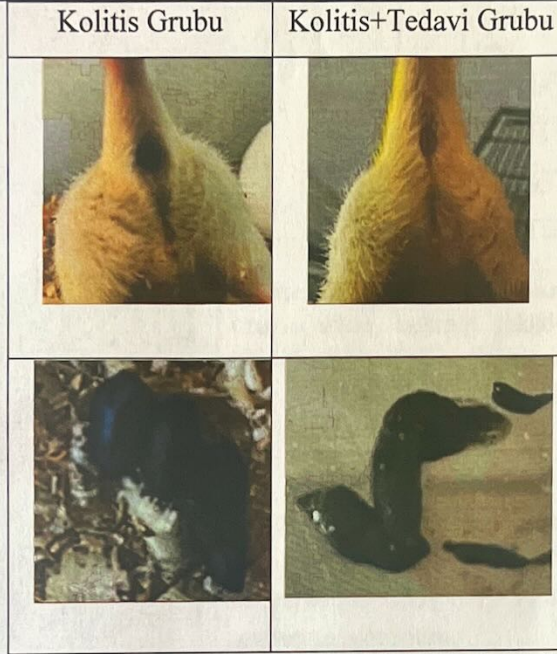
Ratların feces görünüşleri, her iki deney grubunda da 5 nci günden itibaren koyu siyah renkli ve kanla karışık görünümdeydi. Kolitis grubunda, daha sulu ve dağınık görünümde olmakla birlikte anüs çevresinin feces bulaşık görünümüne sahipti. 10 ncu günden itibaren ratların anüs çevresi ve feces daha çok mukuslu ve açık kahverengi görünümüne sahipti.

19M



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report



Resim 1. Resim 1. Anüs çevresi ve feces görünümü

Deney sonunda ötenazi yapıldıktan sonra kolonları diseke edilerek, ölçülen sekum sınırı-rektum arası uzunluklarına ait veriler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Buna göre; tedavi grubu kolon uzunluklarının, tedavi almayan gruba göre belirgin şekilde daha uzun oldukları gösterilmiştir. Makrosopik değerlendirmede ise serozal yüzeyden seçilebilir şekilde hiperemi ve ödem ile segmental boğumlanma şeklindeki daralmalara kolitis grubunda daha belirgin şekilde rastlandı.



194



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report

	Kolitis Grubu (cm)	Kolitis+Tedavi Grubu (cm)
1	19	20,5
2	16	19,5
3	19,5	20
Ort	18,16	20,33



Resim 2. Kolitis grubunda kolon uzunluğunun, belirgin şekilde daha kısa olduğu, sekumdan başlayan daralmalar ile serozadan seçilebilen ödem ve hiperemi dikkati çekmekte.



Resim 3. Kolitis+Tedavi grubunda birbirine yakın uzunlukta kolon yapısı ve daha çok distale doğru belirginleşen hafif derecede segmental görünüm.

	Enflamasyon Şiddeti	Enflamasyon Yayılımı	Kript Hasarı	Yüzde Tutulum	Toplam Skor
Kolitis1	2	1	2	2	10
Kolitis2	2	2	2	2	12
Kolitis3	1	1	2	1	4
				Ortalama	8.66
Tedavi1	1	1	1	1	3
Tedavi2	1	1	1	2	6
Tedavi3	2	1	2	1	5
				Ortalama	4.66

Enflamasyon şiddeti; 0: Yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Şiddetli

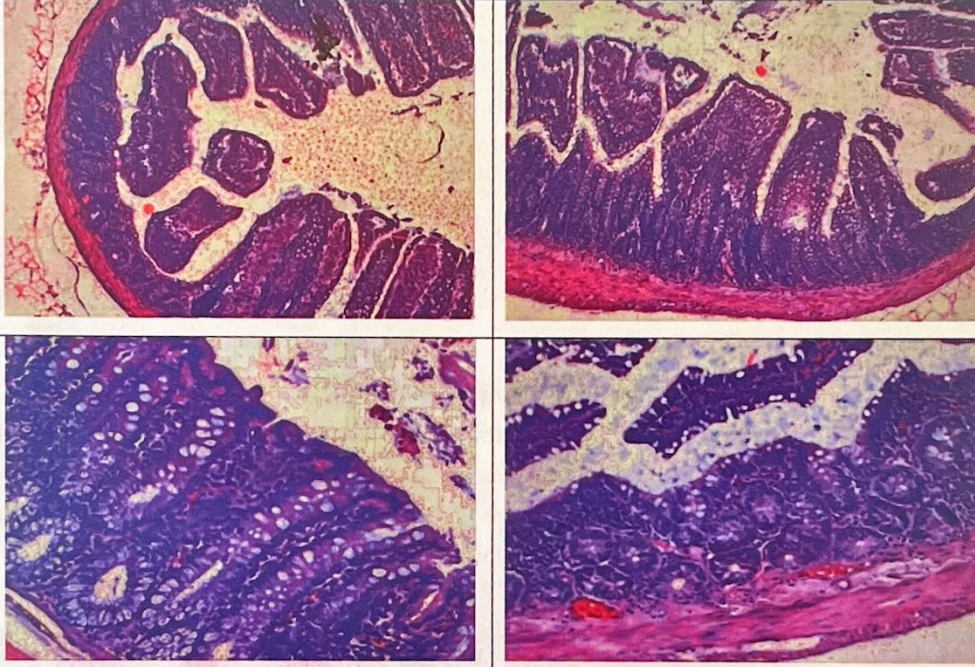
Enflamasyon yayılımı; 0: Yok, 1: Mukoza, 2: Submukoza, 3: Transmural

Kript hasarı; 0: Yok, 1: Bazal 1/3 hasarlı, 2: Bazal 2/3 hasarlı, 3: Total kript kaybı, 4: Kript ve yüzey epiteli kaybı

Yüzde tutulum; 0: %0, 1: %1-25, 2: %26-50, 3: %51-75, 4: %76-100

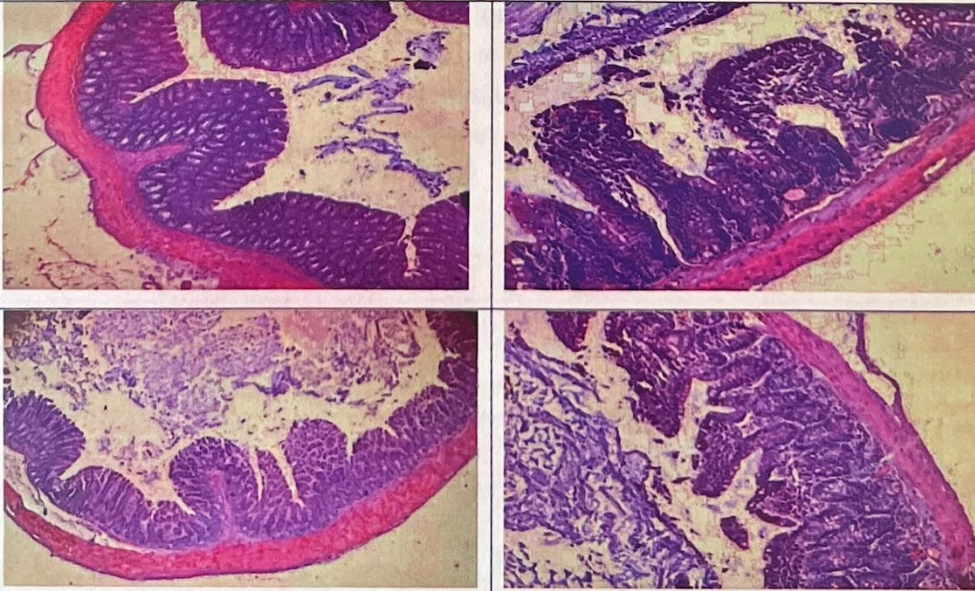
174

Kolitis



Resim 4. Villus uzantılarının kütleşerek yer yer düzleştiği, propriyada şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu ve kript yapılarında atrofi ve ileri derecede dejeneratif ve nekrotik değişiklikler.

Kolitis+Tedavi



Resim 5. Propriyada hafif ve orta dereceli enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve villus epitel hücrelerinde yersel dejenrasyon ve dökülme.



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
(KÜBTUAM)

Deney Sonuç Raporu
Test Result Report

KOLİTİS HİSTOPATOLOJİK SKOR



Histopatolojik değişiklikler yönünden değerlendirildiğinde, kolitis grubu kolon örneklerinde kolon mukoza epitelinde deskuamasyon, L.propriyada yoğun olarak nötrofil lökosit, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile az sayıda eozinofil lökosit birikimleri gözlemlendi. L. propriya ve submukozal damarlarda hiperemi, fokal hemorajiler ve yer yer subserozal bölgeye kadar ilerleyebilen ödem dikkati çekti. En belirgin değişiklikler, villus atrofi ile kriptlerde atrofik ve kistik yapılar ile bazı şiddetli olgularda total nekroz ile gözden kayboldukları izlendi.

Kolitis+tedavi grubunda; enflamatuvar değişiklikler hafif ve orta şiddetli olup, sıklıkla villusların uçlarına doğru lokalizasyon gösteren fokal kümeler şeklindeydi. Villus yüzey epitelinde yine yersel nekrotik değişiklikler ve dökülmeye ait bulguların yanı sıra, kript epitelinin belirgin derecede hiperplazik oldukları dikkati çekti.

Sonuç olarak, kolon uzunluğunun kolitis grubunda (ort.18,16cm), tedavi uygulanan gruba (ort.20,33) göre belirgin şekilde daha kısa olduğu, kolon mukozasında tespit edilen histopatolojik değişikliklerin şiddetine göre de; test edilen ürün kullanılan grupta (Zarenca, Gıda Onay numarası 017131-13.04.2023) 4.66, tedavi almayan kontrol grubunda ise 8.66 ortalama lezyon skoru elde edildiğinden, deneysel kolitis ilişkili lezyonların daha düşük seviyede şekillendiği yönünde değerlendirilmiştir.

DENEYİ YAPAN ADI/SOYADI/ÜNVANI Experimenter Name/Surname/Title	DENEY YETKİLİSİ/ LABORATUVAR SORUMLUSU ADI/SOYADI/ÜNVANI Experiment Authority / LaboratortRes. Name/Surname/Title	LABORATUVAR MÜDÜRÜ ADI/SOYADI/ÜNVANI Laboratory Manager Name/Surname/Title
Dr.Öğretim Görevlisi Tuğçe ANTEPLİOĞLU	Prof.Dr. Oğuz KUL	Prof.Dr. Siyami KARAHAN