

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL TIKANMA SARILIĞI MODELİNDE ÇÖREKOTU
YAĞININ KARACİĞER HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Girayhan ÇELİK

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANLARI

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Zafer SABUNCUOĞLU

Prof. Dr. İbrahim BARUT

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi
tarafından 4396-TU2-15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2016

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkıda bulunan danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Zafer SABUNCUOĞLU ve Prof. Dr. İbrahim BARUT'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, değerli hocalarım Prof. Dr. Mahmut BÜLBÜL, Prof. Dr. Recep ÇETİN, Prof. Dr. Hasan Erol EROĞLU, Prof. Dr. Ömer Rıdvan TARHAN'a,

Tez çalışmam sırasındaki değerli katkılarından dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kemal Kürşat BOZKURT, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Fatma Nihan CANKARA ve hayvan deneyi laboratuvarı çalışanlarına,

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübelerini benimle paylaşan kliniğimizin kıdemli uzmanlarına, eğitimim boyunca cerrahinin yoğun çalışma şartlarında yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma, cerrahi servisimizin ve ameliyathanemizin kıymetli hemşirelerine, servis, poliklinik ve ameliyathane çalışanlarına,

Tez çalışmam sürecindeki sağladığı destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca benim için her şeyin en iyisini yapmaya çalışan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, abime,

Zorlu uzmanlık eğitimim boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, bu süreçte ailemizin tüm yükünü üstlenen, bana her konuda destek olan sevgili eşim Elif ÇELİK'e; varlıklarıyla hayatıma anlam katan, karşıma çıkan tüm zorlukları kolaylaştıran oğullarım Osmangazi Bartu ÇELİK ve Baybars Alp ÇELİK'e,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Girayhan ÇELİK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tıkanma Sarılığı.....	4
2.1.1. TS’de Bakteriyel Translokasyon, Endotoksemi ve Karaciğer Hasarı.....	4
2.2. Çörekotu	6
2.2.1. Çörekotu’nun Bileşenleri	6
2.2.2. Çörekotu’nun Antioksidan Etkisi.....	7
2.2.3. Çörekotu’nun Antiinflatuar ve Analjezik Etkisi	7
2.2.4. Çörekotu’nun Karaciğer Koruyucu Etkisi	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	9
3.2. Çalışmanın Yürütüldüğü Laboratuvarlar ve Proje Desteği	10
3.3. Deney Hayvanlarının Temini ve Seçimi	10
3.4. Deney Hayvanlarının Bulunduğu Ortam Koşulları.....	10
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	10
3.6. Anestezi ve Cerrahi İşlem.....	11
3.7. Karaciğer Dokusunun ve Kan Örneklerinin Alınması	12
3.8. Biyokimyasal Analizler.....	13
3.9. Histopatolojik Analizler	13
3.10. İstatistiksel Analizler	14
4. BULGULAR	15
4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	15
4.1.1. IL-6.....	17
4.1.2. IL-8.....	18

4.1.3. TNF- α	19
4.1.4. CRP	20
4.1.5. MDA	21
4.1.6. GSH-Px	22
4.1.7. SOD.....	23
4.1.8. CAT.....	24
4.1.9. MPO	25
4.2. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	26
5. TARTIŞMA	32
ÖZET.....	36
ABSTRACT	37
KAYNAKLAR	38

SİMGELER ve KISALTMALAR

TS	: Tıkanma sarılığı
TNF- α	: Tümör nekroz faktör-alfa
IL-6	: İnterlökin-6
IL-1	: İnterlökin-1
ROS	: Reaktif oksijen türleri
IFN-γ	: İnterferon-gama
LP	: Lipit peroksidasyonu
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehid
MPO	: Miyeloperoksidaz
CAT	: Katalaz
SOD	: Superoksit dismutaz
HSH	: Hepatik stellat hücreleri
ÇY	: Çörekotu yağı
RES	: Retiküloendotelyal sistem
Ig A	: İmmünglobulin A
IL-8	: İnterlökin-8
TK	: Timokinon
SDÜ	: Süleyman Demirel Üniversitesi
DEHATAM	: Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Araştırma ve Uygulama Merkezi
K	: Kontrol
T	: Tıkanma
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
CRP	: C reaktif protein
HE	: Hematoksilen-eozin
MT	: Masson trikrom

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Biyokimyasal verilerin sayısal değerleri ve p değerleri.....	15
Tablo 2. Grupların biyokimyasal sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılmaları ve p değerleri.	16
Tablo 3. Ratların histopatolojik bulgularının vaka sayılarına göre değerlendirilmesi.....	27
Tablo 4. Histopatolojik bulguların istatistiksel karşılaştırılması.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Timokinon molekülünün kimyasal yapısı	6
---	---

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ana safra kanalının diseksiyonu ve bağlanması.....	11
Resim 2. Çalışmanın 10. gününde dilate ana safra kanalı.	12
Resim 3. K grubunda normal portal alan.....	28
Resim 4. K grubunda MT ile fibrozis lehine boyanma izlenmedi.....	28
Resim 5. T grubunda şiddetli safra duktus proliferasyonu	29
Resim 6. T grubunda hepatosit nekrozu, safra duktus proliferasyonu	29
Resim 7. T grubunda belirgin portal fibrozis.....	30
Resim 8. ÇY grubunda hafif düzeyde safra duktus proliferasyonu.....	30
Resim 9. ÇY grubunda portal alanda hafif düzeyde fibrozis	31

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. IL-6'nın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	17
Grafik 2. IL-8'in ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	18
Grafik 3. TNF- α 'nın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	19
Grafik 4. CRP'nin ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	20
Grafik 5. MDA'nın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	21
Grafik 6. GSH-Px'in ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	22
Grafik 7. SOD'un ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	23
Grafik 8. CAT'ın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	24
Grafik 9. MPO'nun ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.	25

1. GİRİŞ

Skleralarda, ciltte ve dokularda ortaya çıkan ve bilirubin seviyesinin kandaki fazlalığına bağlı olan renk değişimine sarılık denir. Tıkanma sarılığı (TS) ise; intra ve ekstrahepatik safra yollarının herhangi bir seviyesindeki tıkanıklık sonucu safra akımının yavaşlaması veya durmasına bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablodur (1).

TS, cerrahi teknikler ve etkin antibiyotiklerdeki gelişmelere rağmen, pek çok sisteme olumsuz yönde etkileri olması, sık görülmesi, morbidite ve mortalite oranlarının yüksek olması nedeniyle Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji' nin önde gelen problemlerinden biridir (2).

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılıklı hastalarda oluşan postoperatif komplikasyonlar; portal ve sistemik endotoksemi, bakteriyel translokasyon ve sepsis sendromuna neden olan inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (3).

TS'deki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek birçok sitokinlerin üretimini artırır. Böylece kontrol edilemeyen inflamatuvar sürece, multiorgan disfonksiyonuna, respiratuvar distress sendromuna ve ölüme neden olur. Endotoksemisinin de tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki bu sitokinler, reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species, ROS) aşırı üretilmesine duyarlıdır (2, 4).

Gadzhiev ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada TS'de dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-6, interferon gama(IFN- γ)'nin, arttığı gösterilmiştir (5)

TS bulunan hastalarda doku hasarı patogenezi lipit peroksidasyonu (LP) ile ilişki bulunmuştur. LP, hücre membranındaki oksidatif hasarın ve hücre ölümünün önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. Doku hasarı oluşumunda ROS ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik ana nedendir. ROS'un bu patolojideki rolü oldukça önemlidir. ROS temizleyicileri TS'li ratlarda azalır. Böylece oksijen

radikallerinin yaptığı organ hasarına duyarlılık artar. Glutasyon (GSH), oksijen radikallerine karşı hücrel savunmada büyük rol oynar. GSH'nin azalmasında direkt olarak glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi rol alır. Malondialdehid (MDA), LP'nin son ürünüdür ve oksidatif stresi gösteren iyi bir belirteçtir. LP ile hasarlanan dokuda MDA, miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri artar (6, 7).

TS oluşturulan ratlarda ROS'u ortamdan uzaklaştıran GSH-Px, katalaz (catalase, CAT) ve superoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece ROS'un oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar (8).

Ana safra kanalı ligasyonu ile oluşan ekstrahepatik biliyer tıkanıklıkta; biliyer kanal epitelyal hücre hiperplazisi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve periportal fibrozis stereotipik tip karaciğer hasarına neden olur (9). Karaciğer fibrozunun patogeneğinde, serbest radikallerce oluşturulan oksidatif stres ve LP'de artış etkili bulunmuştur (10, 11). Oksidatif stres ve LP ürünleri hepatik stellat hücrelerini (HSH) uyarak kollajen sentezini artırabilmektedir (12).

Sıçanlarda ana safra kanalı ligasyonu ile indüklenen karaciğer fibrozisi, insandaki primer veya sekonder olarak gelişen karaciğer fibrozuna uygunluğu ve hızlı gelişmesi sebebiyle son zamanlardaki bilimsel çalışmalarda ilgi duyulan bir fibrozis modeli olmaktadır. Ana safra kanalı ligasyonu sıçanlara uygulandığında karaciğerde başta kollajen olmak üzere hücre dışı matriks proteinlerinin oluştuğu ve bu modelin sıçanlarda sekonder olarak karaciğer fibrozu gelişimi için uygun bir model olduğu bilinmektedir (10). Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından, bu karaciğer hasarı mekanizmalarını ortaya koymaya ve bu mekanizmaları önlemeye yönelik klinik ve deneysel çalışmalar yapılmaktadır (13). Oluşan hepatatoksitenin oksidatif stres ve LP'ye bağlı olduğu düşünüldüğünden bu ROS oluşumunu engelleyecek bir madde üzerine tedavi yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Bu amaçla kullanılabilir maddelerden biri de çörekotu yağı (ÇY)'dir. Çörekotu tohumu ve kimyasal bileşimi üzerine yapılan çok sayıda bilimsel araştırma neticesinde, çörekotunun birçok farmakolojik özelliğinin (antioksidan, antikanser, antiülser, antibakteriyel, antimikrobiyal, antitümör, antiparazitik, v.b.) olduğu belirlenmiştir (14).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar ile ÇY'nin, kemoterapinin negatif yan etkilerinin önlenmesi üzerinde başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar çörekotunun kemik iliği büyümesinde ve tümör büyümesinin engellenmesinde oldukça yüksek oranlarda başarılı olduğunu göstermiştir. Böylece immün sistem uyarılarak antiviral özellikli interferon üretimi artmaktadır (14).

Bruits ve Bucar yaptıkları bir çalışmada ÇY'nin antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve radikal süpürücü özelliklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda etkili bir hidroksil radikal süpürücü ajan olduğunu da belirtmişlerdir (15).

Timokinon çörekotu bitkisinde bulunan fotokimyasal bir bileşiktir. Yapılan hayvan çalışmalarında kalp, karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi ve antioksidan etkisi kanıtlanmıştır. Aynı zamanda antikanser etkinliği oldukça iyidir (16-18).

ÇY ile ilgili bugüne kadar farklı özelliklerine ait birçok çalışma yapılmasına rağmen TS'nin meydana getirdiği karaciğer hasarına karşı ÇY'nin etkilerine dair literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda ratlarda oluşturulan TS'ye bağlı karaciğer hasarında ÇY'nin etkinliğini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıkanma Sarılığı

İkter (sarılık) teriminin anlamı vücut dokularının sarıya boyanmasıdır. Böylece deri ve derin dokular sararır. Normalde serbest ve bileşik şekilleri içeren plazma bilirubin konsantrasyonu 0,5 mg/100 ml kadardır. Bilirubin konsantrasyonu normalin üç katına yani, 2 mg/100 ml'ye çıktığı zaman deri sararmaya başlar. Sarılığın en çok rastlanan iki tipi hemolitik ve obstrüktif sarılıktır. TS, safra kanallarının tıkanması veya karaciğer hücrelerinin haraplanmasıyla normal miktardaki bilirubin bile gastrointestinal sisteme çıkarılamamasıdır (19).

Karaciğerde safra önce hepatositler tarafından üretilir ve hepatik hücrelerin arasındaki küçük safra kanaliküllerine salgılanır, daha sonra interlobüler septumlara doğru akar. Burada kanaliküller terminal safra kanallarına dökülür ve ardından daha büyük kanallara dökülerek sonunda ana safra kanalı ulaşır. Buradan da, doğrudan duodenuma ya da sistik kanal yoluyla safra kesesine yönelir (20).

Karaciğerin safra sekretuar basıncı 120-250 mm H₂O'dur. Safra kesesi kontraksiyonu olduğunda bu basınç 300 mm H₂O'ya kadar yükselir. Bu basınç, 300 mm H₂O üzerine çıktığında karaciğerden safra salgısı inhibe olur. Basınç yükselince başta kolesterol olmak üzere safra tuzları ve fosfolipidlerin karaciğerden salınımı azalır. Normal bir safra akımının olabilmesi için ekstrahepatik safra yolu basıncının 10-15 cm H₂O olması gerekir. Ekstrahepatik safra yollarının bir nedenle tıkanması sonucu ortaya çıkan, hiperbilirubinemi ve barsakta safra asitlerinin yokluğuyla karakterize olan tıkanma sarılığında safra yolları cerrahisi yüksek mortalite ve morbidite riski taşır (19-21).

2.1.1. TS'de Bakteriyel Translokasyon, Endotoksemi ve Karaciğer Hasarı

TS olan hastalarda morbidite ve mortaliteden sorumlu olan endotoksemi başlıca iki ana faktör sonucu oluşmaktadır. Birinci faktör, barsak bariyer

fonksiyonunda bozukluk ve bunun sonucunda bakteri ve toksinlerinin portal dolaşıma geçmesi, ikinci faktör ise mononükleer fagositik fonksiyonda bozukluktur (22).

Retiküloendotelyal sistem (RES), doku makrofajları olarak tanımlanır. Başlıca karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliğinde bulunurlar. Bakteri, endotoksin, immun kompleks ve hücre debrisleri gibi partiküler materyallerin temizlenmesinden sorumludurlar (23). Karaciğerdeki Kupffer hücreleri RES aktivitesinin % 80-90'ından sorumludur. RES fonksiyonu TS, travma, cerrahi ve sepsis gibi durumlarda deprese olur. RES fonksiyonunun bozulması barsaktan endotoksin absorpsiyonunun artması ile sonuçlanır (23).

Safra tuzlarının luminal akımı antibakteriyel etki ve endotoksinler üzerinde direkt deterjan etkisine sahiptir (24). Deneysel ve klinik çalışmalarda sarılıklı hayvan ve insanlarda oral safra tuzları verilmesinin endotoksin absorpsiyonunu azaltarak postop renal yetmezlikten koruduğu gösterilmiştir (25, 26). İntraluminal safra akımının olmaması barsakta değişikliklere ve mukozal hasara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda enterositlerin bakterilerce invazyonuna karşı safranin inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (2).

Sekretuar immünglobulin A (Ig A) eksternal vücut sıvılarındaki predominant Ig'dir. Ig A selektif olarak safra içine verilir (27). TS'si olan hastalarda endotokseminin nedenlerinden biri de bu fonksiyonun bozulmasıdır (22).

Safra yolu tıkanıklığı olan hastalarda kan-safra bariyeri bozulmuştur. Bu da safrada gram (-) bakterisi olan hastalarda endotoksemiye neden olabilmektedir (4).

Ana safra kanalının tıkanması sonucu oluşan kolestaz, immun sistemin baskılanması, RES fonksiyonlarının bozulması, barsak duvarında oksidatif hasar, barsak mukoza yapı ve fonksiyonlarının bozulması gibi patolojilere yol açarak bunların sonucunda da barsaktan bakteriyel translokasyona neden olur (28-30).

Bunun yanında staz sonucu; hepatositlerde dejenerasyon ve buna bağlı olarak da karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, kanama pıhtılaşma sürelerinde uzama,

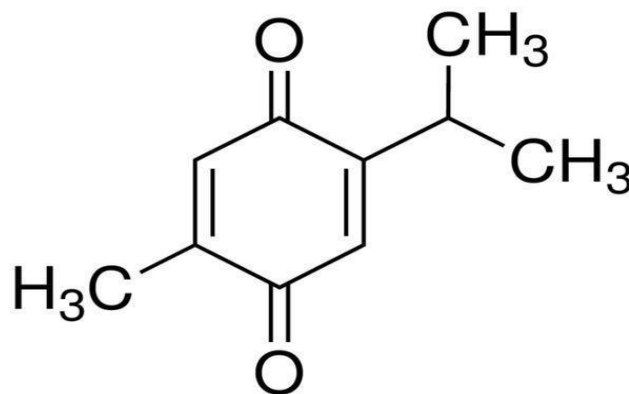
kanama diyatezi riskinin artması, bilirubin yüksekliğine bağlı mental değişiklikler meydana gelir (31).

Yapılan çalışmalarda TS'li hastalarda bulunan nötrofillerde oksidatif cevabın arttığı ve buna bağlı olarak dolaşımdaki IL-1, IL-6, interlökin-8 (IL-8), TNF- α gibi uyarıcı sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (32).

2.2. Çörekotu

2.2.1. Çörekotu'nun Bileşenleri

Çörekotu tohumu, % 36 - % 38 sabit yağları, proteinleri, alkaloidleri, saponin ve % 0,4 - % 2,5 esansiyel yağları içerir. Nadir bulunan C20:2 araşidonik ve eikosadienik asitler dahil olmak üzere doymamış yağ asitlerinden müteşekkil sabit yağlardır. Esansiyel yağlar, gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi kullanılarak Burits ve Bucar tarafından analiz edilmiştir (15). Birçok bileşen tanımlanmıştır fakat timokinon (TK) (% 27,8 - % 57), p-cymene (% 7,1 - % 15,5), karvakrol (% 5,8 - % 11,6), t-anetol (% 0,25 - % 2,3), 4-terpineol (% 2,0 - % 6,6) ve longifolin (% 1,0 - % 8,0) ana bileşenlerdir (Şekil 1). Çörekotu çekirdeğinin bileşeni olarak dört alkaloid bildirilmiştir. İkiisi, nigellicine ve nigellidine indazol çekirdeğe sahiptir; diğerleri nigellimine ve nigelliminenin N-oksit formudur. Nigellimine ve N-oksit formuda izokinoleindir (14).



Şekil 1. Timokinon molekülünün kimyasal yapısı. (14)

2.2.2. Çörekotu'nun Antioksidan Etkisi

ÇY bileşenlerinin lipozomlardaki non-enzimatik LP'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (16). İnce katmanlı kromatograf kullanımı ile çörekotundan izole edilen bileşimlerin, kayda değer serbest radikal temizleme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (15). Bu bileşimlerin diğer in vitro test serilerinde, değişken antioksidan etkilerinin olduğu fakat prooksidan etkilerinin olmadığı bulunmuştur. Yağlardaki farklı bileşimlerin sinerjistik yolla etki ettiği bulunmuştur. Farmakolojik çalışmalarda kullanılan ÇY'nin tamamının kullanılmasının önemi bu sinerjistik etkidir (33).

İnsanlarda görülen hastalık veya durumların birçoğunun altında yatan temel neden serbest radikal oluşumdur. Bundan dolayı, çörekotunun antioksidan etkisi, geleneksel tıpta iddia edilen faydasını açıklayabilir. Bu antioksidan özellik, karbontetraklorür hepatotoksitesine, karaciğer fibrozisi ve sirozuna ve Schistosoma mansoni enfeksiyonu kaynaklı hepatik hasara karşı olan etkisini açıklayabilir (34-36).

2.2.3. Çörekotu'nun Antiinflatuar ve Analjezik Etkisi

Khanna ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, ratlarda ve farelerde üç antinosiseptif testi (sıcak zemin testi, kuyruk sıkıştırma testi, asetik asit indüklü ağrı testi) kullanarak, çekirdeğin sabit yağlarının güçlü antinosiseptif etkiye sahip olduğu ve bu sabit yağlardaki opioid temelinde etkileri olduğu ve nalokson tarafından antagonize edildiği sonucuna varılmıştır (37). Bu sonuçlar dört farklı analjezi modeli (sıcak zemin testi, kuyruk sıkıştırma testi, asetik asit indüklü ağrı testi ve formalin indüklü ağrı testi) kullanan Abdel-Fattah tarafından 2000 yılında yapılan başka bir çalışmayla doğrulanmıştır (38). Çörekotunun insanlarda inflamatuvar durumlarda kullanılma iddiasını denemek için, çörekotu tohumunun sıvı özütünün antiinflatuar, analjezik ve antipiretik etkileri farelerde test edilmiş. İnflamasyon modeli olarak karragenanla indüklenen pençe ödemi ve nosisepsiyon modeli olarak da sıcak zemin reaksiyon süresi kullanılmış ve bitki özütünün anlamlı antiinflatuar ve analjezik etkiye sahip olduğu bulunmuş, fakat maya ile

indüklenen pireksiyi başlatmada başarısız olduğu görülmüş. Bu bulgular, bitkinin antiinflamatuvar ve analjezik madde olarak geleneksel tıpta kullanımının doğru kabul edilmesine katkıda bulunmuş ve ayrıca, antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkileri üzerine olan önceki raporları doğruladığı görülmüştür (14).

2.2.4. Çörekotu'nun Karaciğer Koruyucu Etkisi

Daba ve Abdel-Rahman tarafından 1998 yılında yapılan bir çalışmada ratların hepatositleri izole edilerek çörekotundan izole edilen TK'nın tert-butil hidroperoksit (TBHP)'in hepatotoksitesine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. TK, TBHP'ye karşı koruyucu etki göstermiştir. TK'nın karaciğer üzerindeki koruyucu etkisinin mekanizması belli değildir, ama intraselüler GSH'ın (oksidatif stres ile azalması irreverzibl hücre hasarına yatkınlığı arttığı bilinmektedir) koruyucu etkinliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (39).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Soğutmalı mikro santrifüj (Nüve NF 800R)

Soğutmalı makro santrifüj (Hettich Rotina 35)

Derin dondurucu (Indesit, -20°C)

Hassas terazi (Shimadzu AY220)

Vorteks (Velp Scientifica ZX Classic)

Otomatik pipetler (Brand transferpette)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Labart SH-5)

Homojenizatör (ika ultra turrax t25)

Sonikatör (Bandenus sonicaplus)

Microplate reader (Organon technika microwell system)

Otomatik mikroplate yıkayıcı (Bio-tek Instruments, Inc., ELx50)

CRP rat elisa kiti (Assaypro)

MPO rat elisa kiti (Sunred)

MDA rat elisa kiti (Sunred)

IL-8 rat elisa kiti (Sunred)

GSH-Px rat elisa kiti (Cayman)

SOD rat elisa kiti (Cayman)

CAT rat elisa kiti (Cayman)

IL-6 rat elisa kiti (Affymetrix, ebioscience)

TNF- α rat elisa kiti (Affymetrix, ebioscience)

3.2. Çalışmanın Yürütüldüğü Laboratuvarlar ve Proje Desteği

Bu çalışmada TS modelinin oluşturulması, ÇY uygulaması ve hayvanların barındırılması Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEHATAM)'nde gerçekleştirildi. Diğer deneysel uygulamalar ise SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. Çalışmamız SDÜ Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından 4396-TU2-15 proje numarası ile desteklendi.

3.3. Deney Hayvanlarının Temini ve Seçimi

Deneysel çalışmamızda 12-14 haftalık, 150-200 gram ağırlığında, 34 adet, sağlıklı, dişi, Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları, SDÜ DEHATAM'dan temin edildi. Bu çalışma SDÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 16.04.2015 tarihli ve 05 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

3.4. Deney Hayvanlarının Bulunduğu Ortam Koşulları

Çalışmamızdaki tüm deney gruplarındaki hayvanlar $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında, rölatif nemi % 55 olan, 12 saat gündüz - 12 saat gece döngüsünün uygulandığı kontrollü odaya alındı. Çeşme suyu ve standart pellet yem (*ad libitum*) ile beslendi.

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle üç farklı grup aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol (K); 10 adet rattan oluşan kontrol grubu. Laparotomi yapılarak ana safra kanalı ortaya konulup batın kapatıldı.

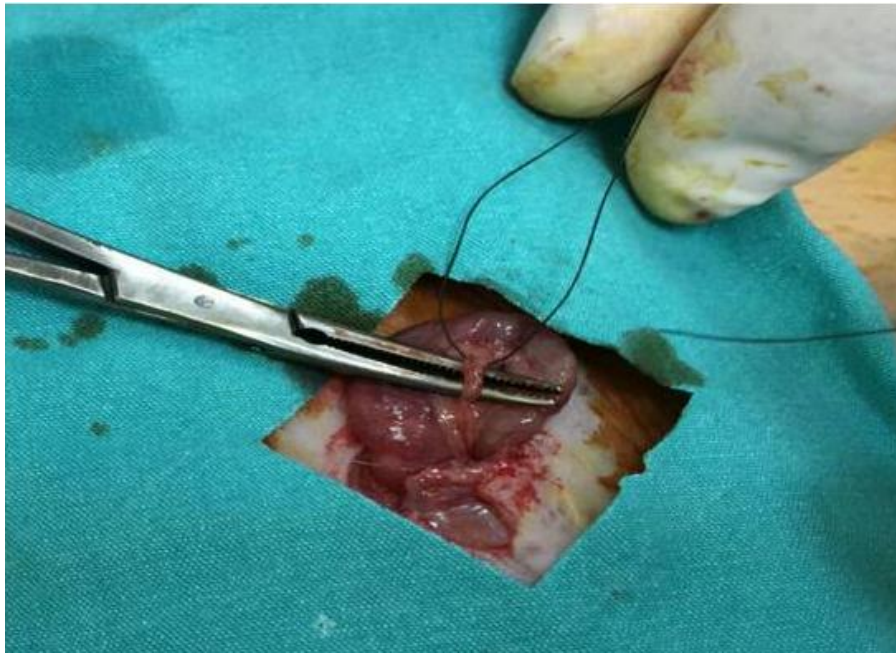
Grup 2: Tıkanma (T); 12 adet rattan oluşan TS oluşturulan grup. Laparotomi yapılarak ana safra kanalı ortaya konup 4/0 ipekle bağlanıp kesilerek TS oluşturuldu ve batın kapatıldı.

Grup 3: ÇY; 12 adet rattan oluşan ve TS oluşturup 1ml/kg/gün gavaj ile oral ÇY verilen grup.

3.6. Anestezi ve Cerrahi İşlem

Her üç gruba da yapılacak bütün cerrahi işlemler öncesi genel anestezi oluşturmak amacıyla sağ arka bacaklarından intramuskuler olarak 50 mg/kg ketamin HCL ve 25 mg/kg ksilazin HCL uygulandı. Anestezik etki başladıktan sonra tüm hayvanların batın bölgesindeki kılları tıraş edildi. Ratlar supin pozisyona getirildi ve ekstremiteler ile boynun üst kısmı hariç tutulmak şartıyla tamamen % 10 povidon iyot ile boyanarak dezenfekte edildi. Steril örtüler batın orta hattı açıkta kalacak şekilde örtülerek cerrahiye hazırlık tamamlandı.

Batında ksifoid çıkıntıdan aşağıya doğru uzanan yaklaşık 2- 2,5 cm'lik bir orta hat kesisi yapıldı. Mide ve pilor takip edilerek duodenum bulundu. Duodenum hafifçe öne ve aşağı çekilerek karaciğer hilusundan duodenuma doğru uzanan ve ince bir tubuler yapı olarak izlenen ana safra kanalı görüldü. Ana safra kanalı, çevresindeki yağlı dokulardan tutularak asıldı ve ucu ince olan bir disektör ile diseke edilerek ortaya kondu. (Resim 1)



Resim 1. Ana safra kanalının diseksiyonu ve bağlanması.

K grubundaki ratlarda ana safra kanalı ortaya konduktan sonra batınları kapatıldı. T grubunda ve ÇY grubunda ise disektörle ana safra kanalı izole edildi ve 4/0 ipekle bağlanıp kesilerek TS oluşturuldu. İşlemler tamamlandıktan sonra her üç grupta da batın katları uygun olarak 3/0 prolenele kapatıldı. Suture hattı povidon iyot ile temizlendi ve hayvanlar anesteziden çıktıktan sonra kafeslerine alındılar. Laparatomiden 12 saat sonra oral beslenmeye başladılar.

Laparotomi yapıldıktan sonraki ilk 24 saatte T grubundan 2, ÇY grubundan da 3 ratın öldüğü gözlemlendi ve çalışmadan çıkarıldı.

3.7. Karaciğer Dokusunun ve Kan Örneklerinin Alınması

Her üç gruba da çalışmanın 1. ve 10. gününde olacak şekilde iki kere laparotomi uygulandı.



Resim 2. Çalışmanın 10. gününde dilate ana safra kanalı.

Çalışmanın 10. gününde her üç gruptan; histopatolojik ve biyokimyasal analizler için karaciğer dokuları, biyokimyasal analizler için ise vena kava inferiordan kan örnekleri alındı. Bu işlemleri takiben hayvanlar sakrifiye edildi.

3.8. Biyokimyasal Analizler

SDÜ Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D. laboratuvarında çalışmanın 10. gününde alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konularak 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri çalışılmaya kadar -20° C'de saklandı.

Kan alma işlemi sonrası sakrifiye edilen ratların karaciğer dokuları tartıldı, 1:10 oranında pH 7,4 olan fosfat tamponu dilüe edilerek tüplere konuldu ve homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından dokulara 30 saniye boyunca sonikasyon işlemi uygulandı. Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri buz dolu beherler içerisinde gerçekleştirildi. Doku örnekleri +4° C'de 5000 devir/dk'da 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar analizler gerçekleştirilene kadar -20° C'de saklandı.

Karaciğer dokusunda, LP'nin son ürünü olan MDA, polimorf nüveli lökosit (PMNL) stimülasyonunun indeksi olan MPO, anahtar antioksidan GSH'ı okside eden GSH-Px ve yine ROS'u yok eden CAT ve SOD enzim seviyesi ölçüldü. Değerlerin hepsi rat spesifik kitlerle çalışıldı.

-20° C'de saklanan serum örneklerinden, inflamasyonun göstergesi olarak TNF- α , IL-6, IL-8 ve c reaktif protein (CRP) değerleri çalışıldı. Değerlerin hepsi rat spesifik kitlerle çalışıldı.

3.9. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme için her üç gruptan alınan karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlanmış formolde 24 saat fikse edildi. Standart laboratuvar takiplerinden sonra parafine gömülerek 5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı, hematoksilin-eozinle (HE) ve fibrozisi araştırmak için de Masson Trikrom (MT) ile boyandı. Aynı patolog tarafından örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeden incelendi. Histopatolojik incelemede safra duktus proliferasyonu, nekroz, portal inflamasyon, PMNL infiltrasyonu ve fibrozis değerlendirildi.

İncelenen örneklerde nekroz 1: yok, 2: var olarak; fibrozis 1: yok, 2: hafif, 3: şiddetli olarak; safra duktus proliferasyonu 1: yok, 2: hafif, 3: orta, 4: şiddetli olarak;

inflamasyon 1: yok, 2: hafif, 3: şiddetli olarak; PMNL infiltrasyonu 1: yok, 2: hafif, 3: şiddetli olarak skorlandı.

3.10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 16 programı kullanılarak yapılmış olup, incelenen değişkenler Kolmogorov – Simirov testiyle, normal dağılımda olanlar One-Way Anova Tukey testiyle, normal dağılımda olmayanlar ise Kruskal-Wallis ile anlamlılık açısından bakılıp anlamlı olan değerler ikişerli olarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirilmiş ve "p" değerinin 0,05'den küçük olması "anlamlı" olarak yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma için alınan örnekler SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında değerlendirilmiştir.

4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Tablo 1’de biyokimyasal parametrelerin ortalama değerleri görülmektedir.

Tablo 1. Biyokimyasal verilerin sayısal değerleri ve p değerleri.

	K	TS	ÇY	p değeri
	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	
IL-6	18,03±3,51	21,67±4,07	12,99±2,64	<0,001
IL-8	169,88±26,67	117,78±29,68	154,91±50,29	0,011
TNF-α	15,77±5,25	30,7±2,25	22,46±0,95	<0,001
CRP	1,27±0,69	2,10±0,79	1,07±0,53	0,007
MDA	15,32±5,93	14,92±4,39	8,49±4,98	0,013
SOD	0,11±0,02	0,12±0,06	0,13±0,02	0,566
CAT	116,07±13,62	94,87±25,80	127,60±17,20	0,004
MPO	11,56±4,09	13,56±2,94	10,25±4,77	0,186
GSH-Px	73,37±55,77	92,06±35,07	91,74±47,04	0,603

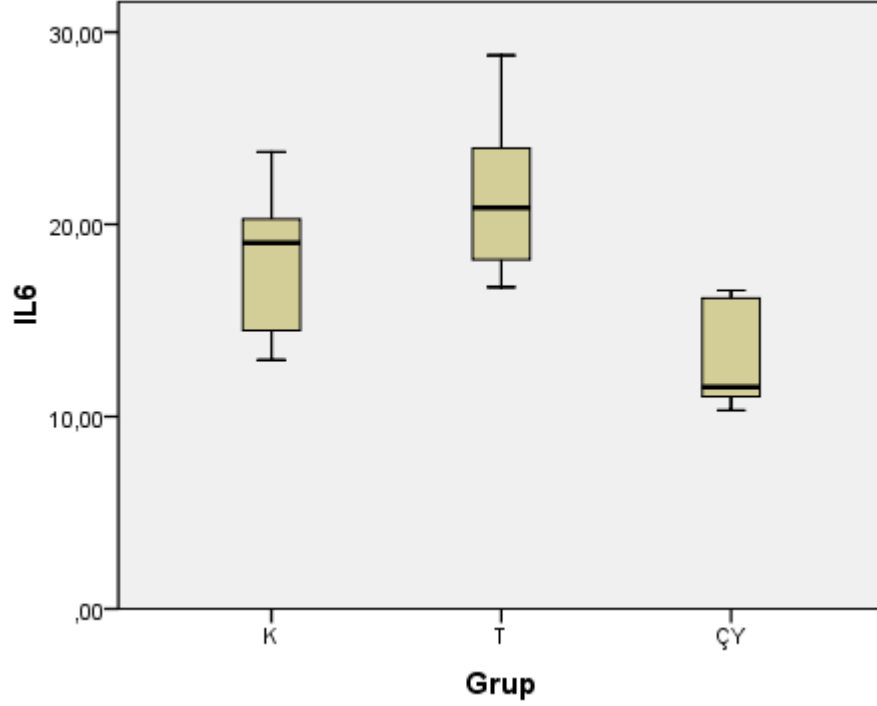
Grupların birbirleriyle karşılaştırılmaları ve p değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara baktığımızda K grubuyla T grubu arasında, TNF- α ve CRP açısından, K grubuyla ÇY grubu arasında IL-6 ve MDA açısından ve T grubuyla ÇY grubu arasında IL-6, TNF- α , CRP, MDA ve CAT açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü.

Tablo 2. Grupların biyokimyasal sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılmaları ve p değerleri.

	Grup Karşılaştırmaları		
	K-T	K-ÇY	T-ÇY
IL-6	0,069	0,011	<0,001
IL-8	0,010	0,649	0,087
TNF-α	<0,001	0,001	<0,001
CRP	0,031	0,807	0,008
MDA	0,980	0,020	0,030
SOD	0,740	0,556	0,945
CAT	0,058	0,420	0,003
MPO	0,507	0,757	0,186
GSH-Px	0,649	0,673	>0,950

4.1.1. IL-6

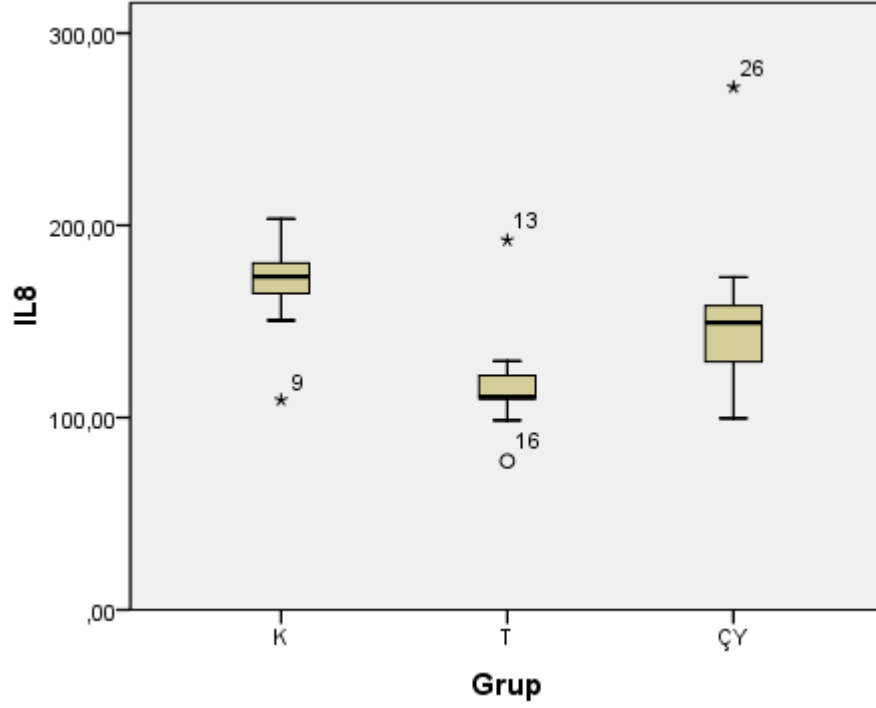
IL-6 sonuçlarını karşılaştırdığımızda K grubu ile T grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. K grubu ile ÇY grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk. (Tablo 2, Grafik 1).



Grafik 1. IL-6'nın ortalama değeri gruplar arası dağılımı.

4.1.2. IL-8

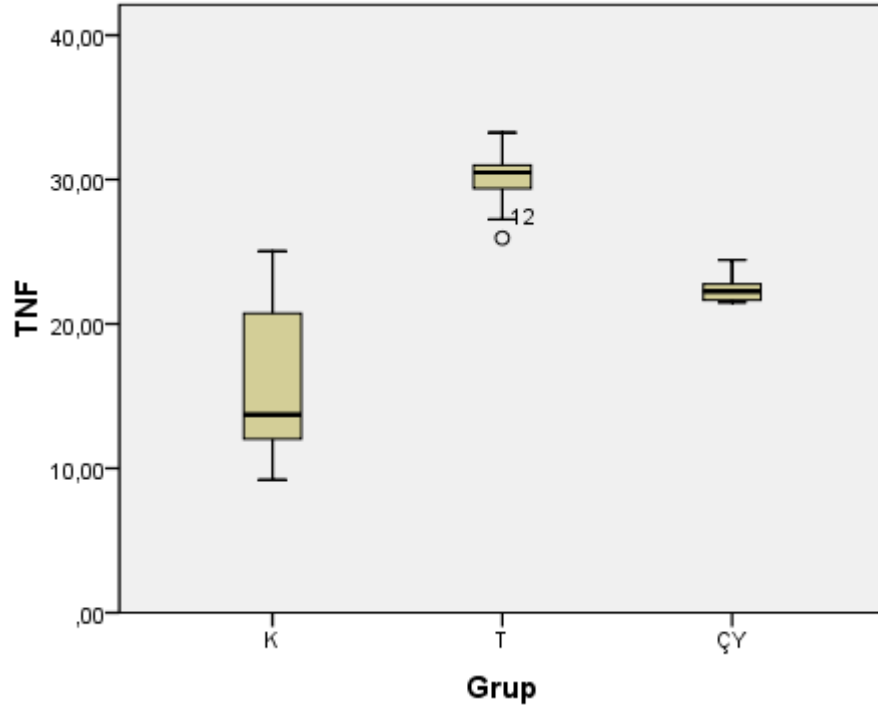
IL-8 sonuçlarını karşılaştırdığımızda sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 2).



Grafik 2. IL-8'in ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.3. TNF- α

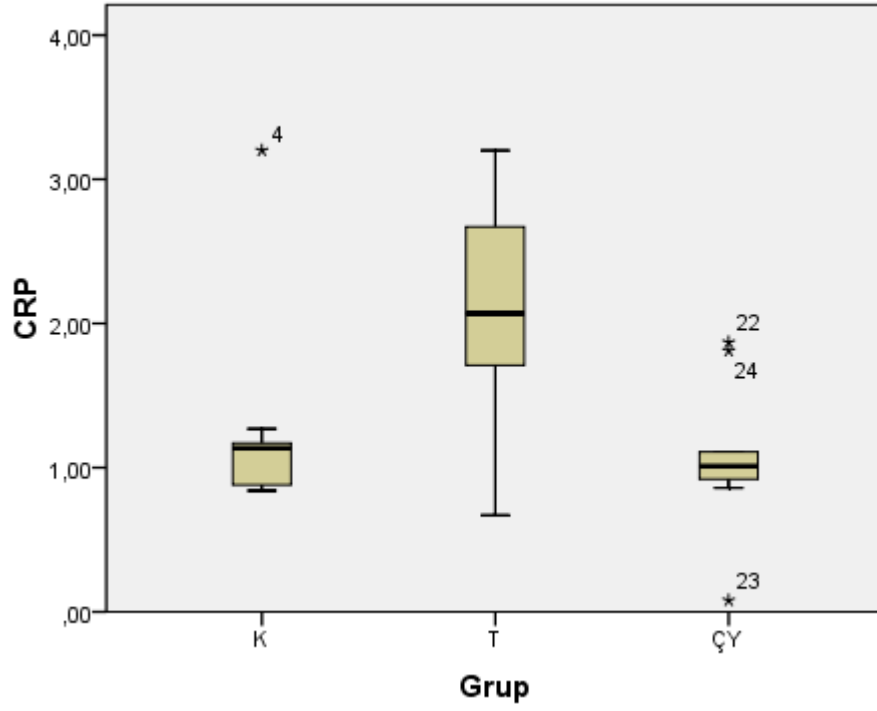
TNF- α sonuçlarını karşılaştırdığımızda K grubu ile T grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. K grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. (Tablo 2, Grafik 3).



Grafik 3. TNF- α 'nın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.4. CRP

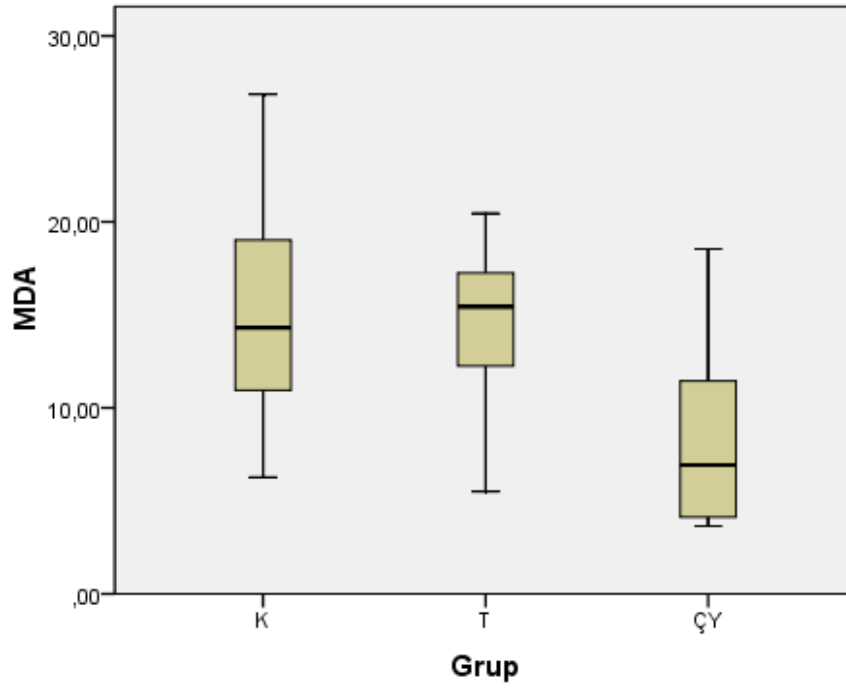
CRP sonuçlarını karşılaştırdığımızda K grubu ile T grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. K grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. (Tablo 2, Grafik 4).



Grafik 4. CRP'nin ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.5. MDA

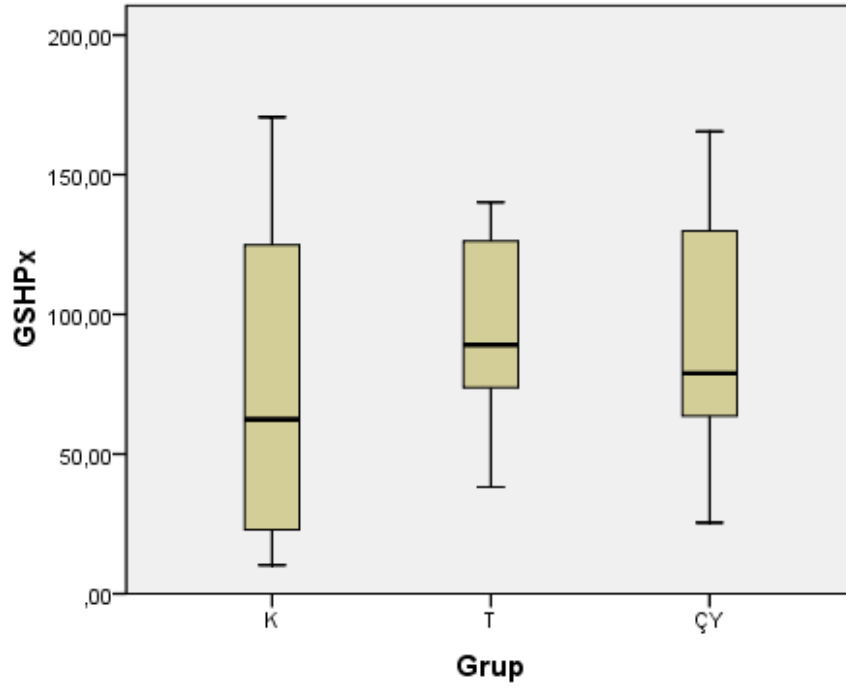
MDA sonuçlarını karşılaştırdığımızda K grubu ile T grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. K grubu ile ÇY grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk. (Tablo 2, Grafik 5).



Grafik 5. MDA'nın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.6. GSH-Px

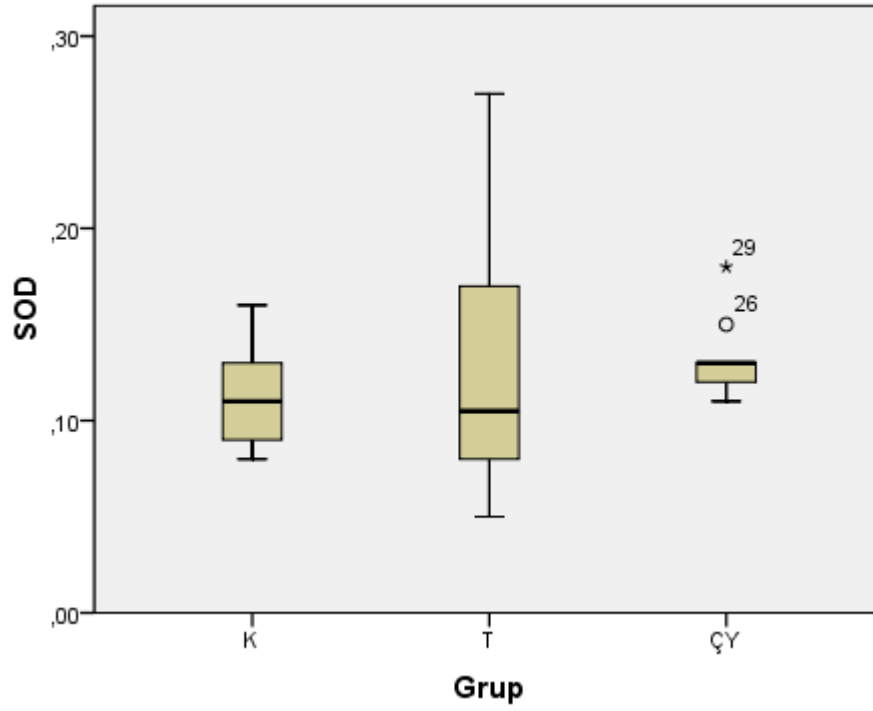
GSH-Px sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 6).



Grafik 6. GSH-Px'in ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.7. SOD

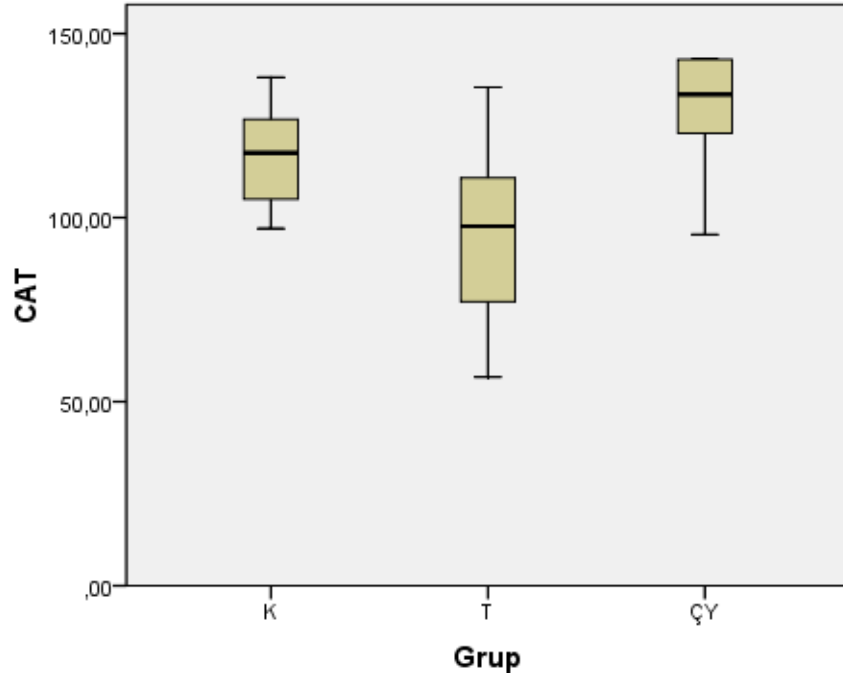
SOD sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 7).



Grafik 7. SOD'un ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.8. CAT

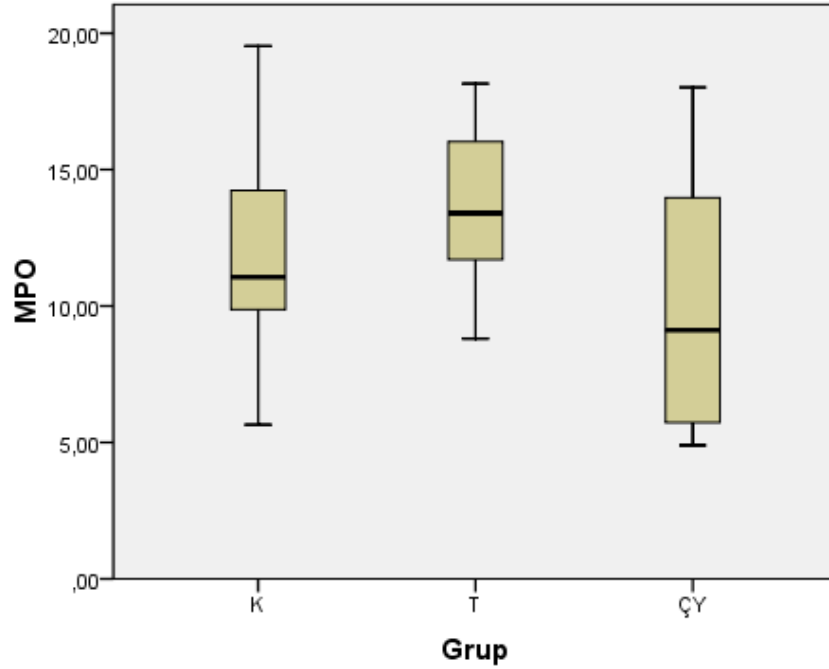
CAT sonuçlarını karşılaştırdığımızda K grubu ile T grubu arasında ve K grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk. (Tablo 2, Grafik 8).



Grafik 8. CAT'ın ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.1.9. MPO

MPO sonuçlarını karşılaştığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 9).



Grafik 9. MPO'nun ortalama değerlerinin gruplar arası dağılımı.

4.2. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Ratlardan alınan karaciğer doku örneklerinde dokular inflamasyon, portal fibrozis, safra duktus proliferasyonu, PMNL infiltrasyonu ve nekroz açısından değerlendirildi. Yapılan ki-kare testi sonucunda K grubunda beklendiği üzere herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmadı.

T grubu ve ÇY grubunda değişik derecelerde inflamasyon, portal fibrozis, safra duktus proliferasyonu, PMNL infiltrasyonu ve nekroz gözlemlendi.

T grubunun bütün üyelerinde nekroz görülürken ÇY grubunda sadece 2 ratta nekroz olduğu saptandı.

Portal fibrozis açısından karşılaştığımızda T grubunda hafif portal fibrozis (skor: 2) 6 ratta görülürken gruptaki diğer 4 ratta şiddetli portal fibrozis (skor: 3) görüldü. ÇY grubunda ise 5 ratta portal fibrozis gözlenmezken (skor: 1), diğer 4 ratta hafif portal fibrozis (skor: 2) saptandı.

T grubunda safra duktus proliferasyonu 5 ratta hafif (skor: 2), 3 ratta şiddetli (skor: 4), 2 ratta da orta düzeydeydi (skor: 3). ÇY grubunda ise 2 ratta safra duktus proliferasyonu yokken (skor: 1), 4 ratta hafif düzeyde (skor: 2), 3 ratta da orta düzeydeydi (skor: 3).

T grubunda 5 ratta hafif inflamasyon (skor: 2), 5 ratta da şiddetli inflamasyon (skor: 3) gözlenirken, ÇY grubunda ise 7 ratta hafif inflamasyon (skor: 2) gözlenirken 2 ratta şiddetli inflamasyon (skor: 3) gözlemlendi.

T grubunda PMNL infiltrasyonu daha şiddetli iken, ÇY grubunda daha hafif düzeyde PMNL infiltrasyonu olduğu görüldü.

Bu bulgulara dayanak ÇY verilen grupta karaciğer hasarına yönelik histopatolojik göstergeler T grubuna göre daha hafif seyretti.

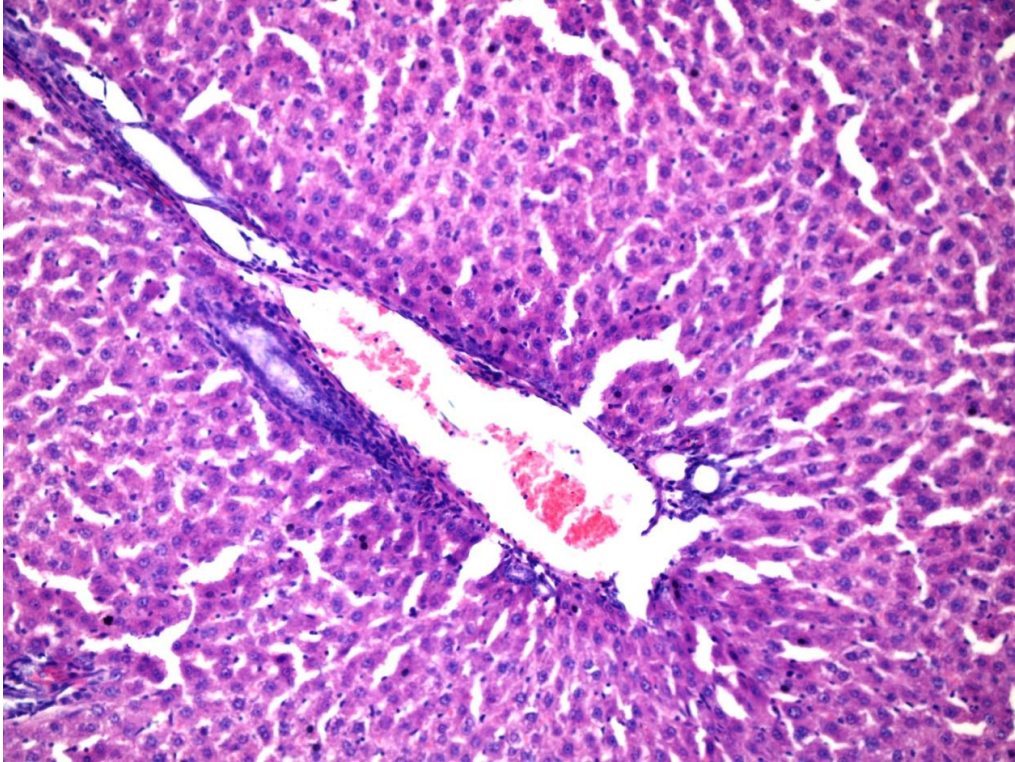
Tablo 3. Ratların histopatolojik bulgularının vaka sayılarına göre değerlendirilmesi.

	Nekroz		Portal Fibrozis			İnflamasyon			Safra Duktus Proliferasyonu				PMNL		
	Var	Yok	Yok	Hafif	Şiddetli	Yok	Hafif	Şiddetli	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli	Yok	Hafif	Şiddetli
T	10	0	0	6	4	0	5	5	0	5	2	3	0	3	7
ÇY	2	7	5	4	0	0	7	2	2	4	3	0	0	9	0

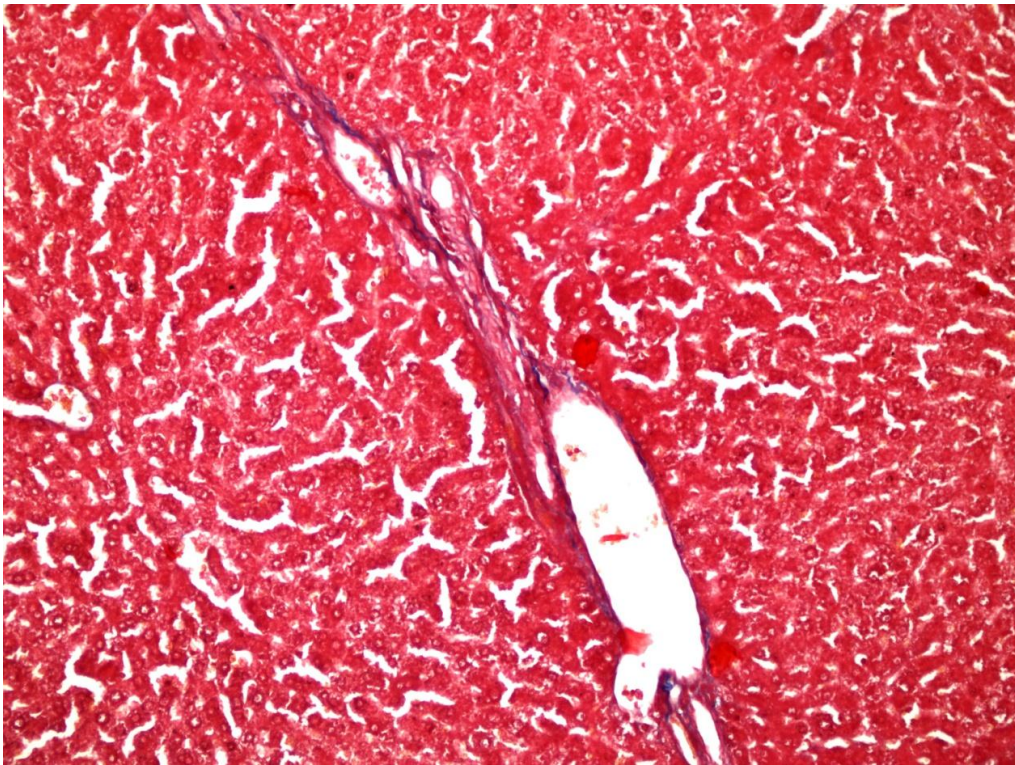
Histopatolojik bulguları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda ise; nekroz, portal fibrozis ve PMNL infiltrasyonunun ÇY grubunda, T grubuna göre daha az olduğunu belirgin olarak gördük.

Tablo 4. Histopatolojik bulguların istatistiksel karşılaştırılması.

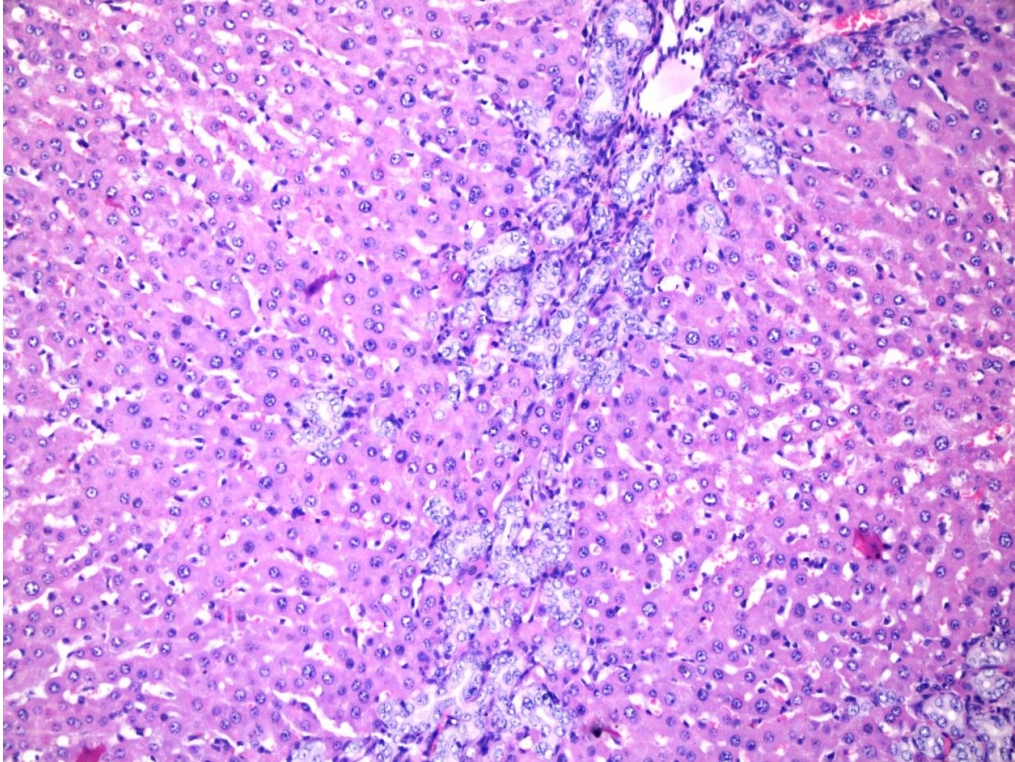
	K	T	ÇY	P değeri	Grup Karşılaştırmaları		
					K-T	K-ÇY	T-ÇY
Nekroz	1±0	2±0	1,22±0,14	<0,001	0,001	0,125	0,001
Portal Fibrozis	1±0	2,40±0,16	1,44±1,75	<0,001	0,001	0,021	0,003
İnflamasyon	1±0	2,80±0,91	2,11±0,78	<0,001	<0,001	0,005	0,097
Safra Duktus Proliferasyonu	1±0	2,50±0,52	2,22±0,44	<0,001	<0,001	<0,001	0,293
PMNL	1±0	2,7±0,48	2,00±0	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001



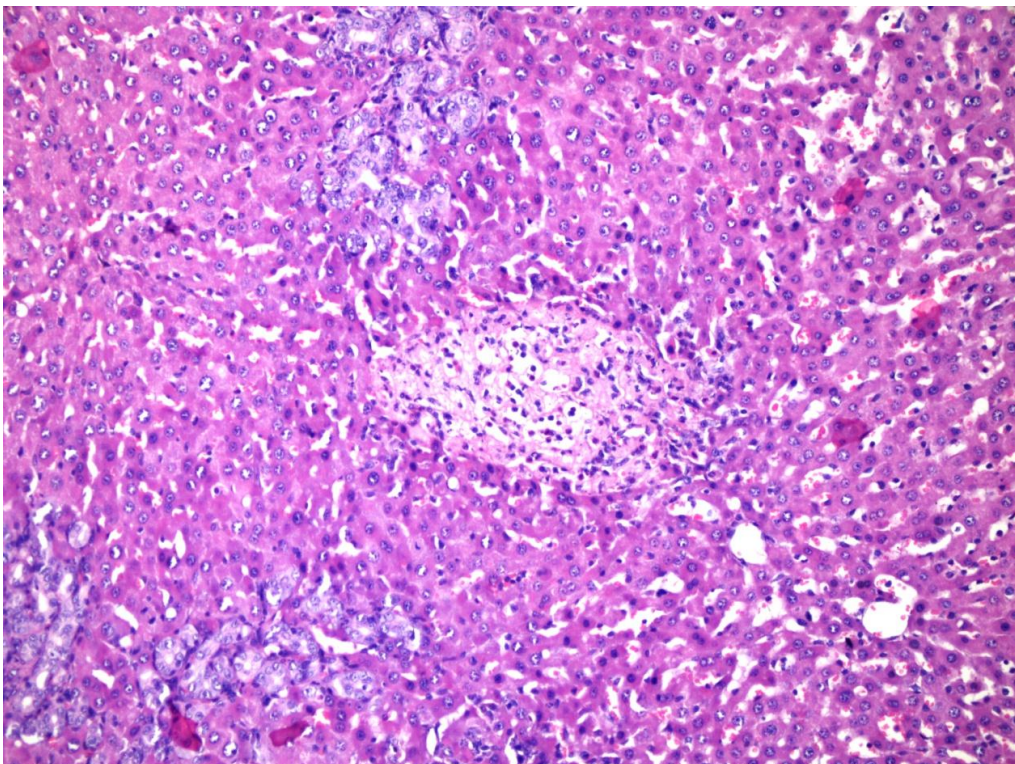
Resim 3. K grubunda normal portal alan. (HEx200)



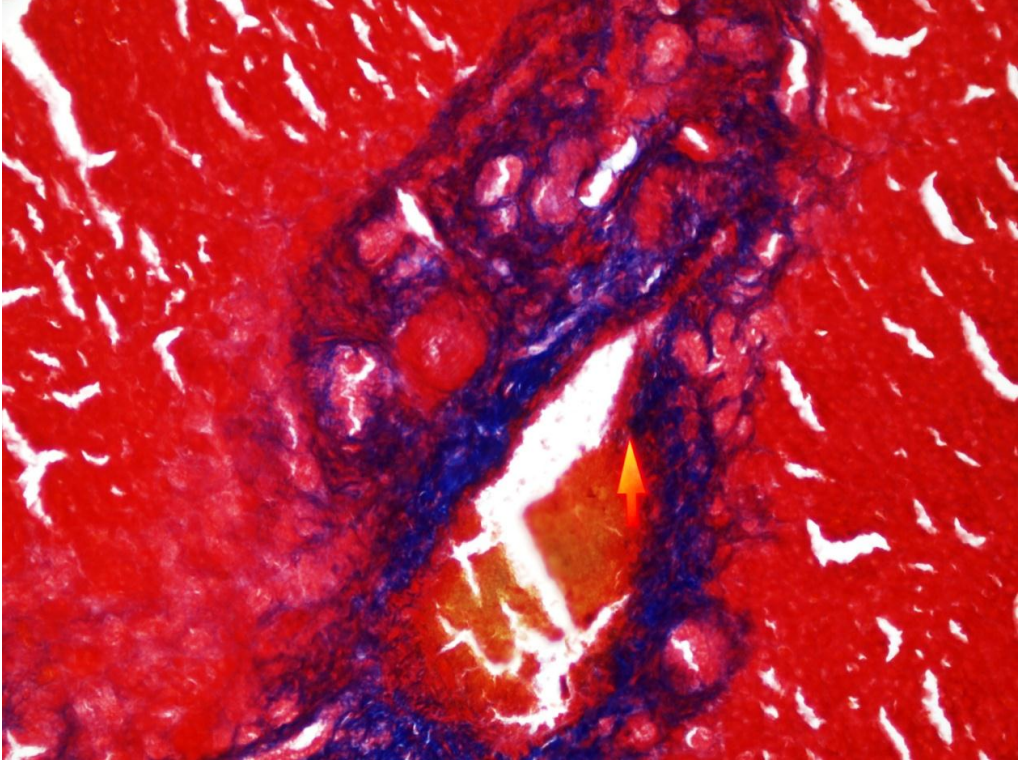
Resim 4. K grubunda MT ile fibrosis lehine boyanma izlenmedi. (MTx200)



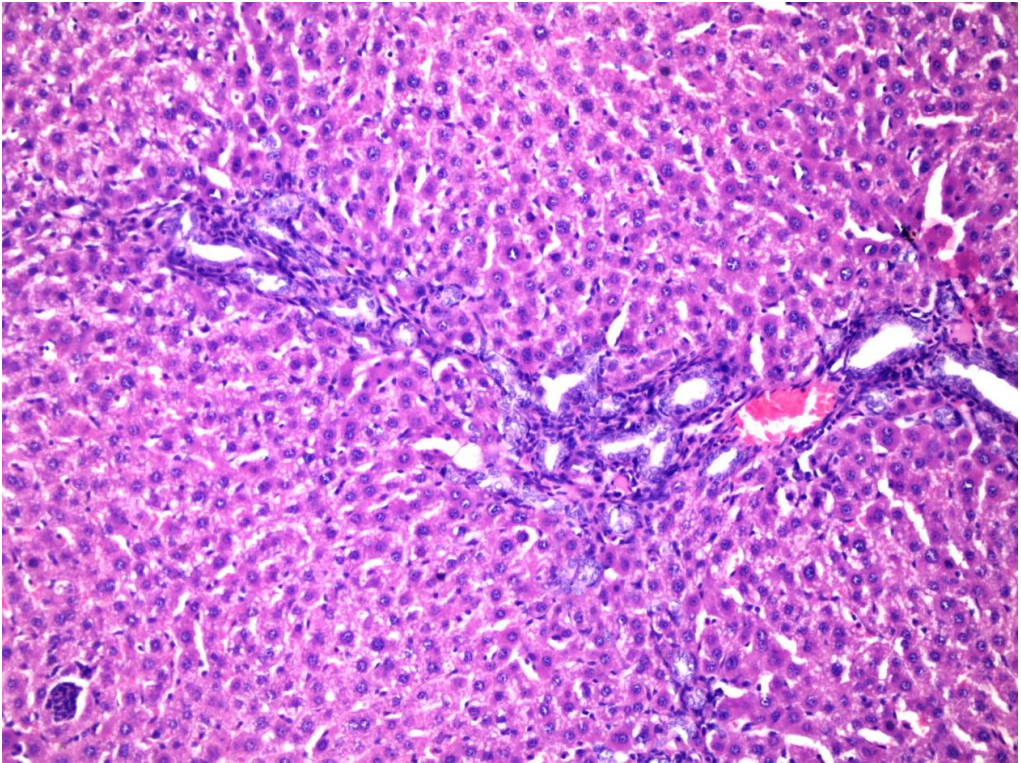
Resim 5. T grubunda şiddetli safra duktus proliferasyonu. (HEx200)



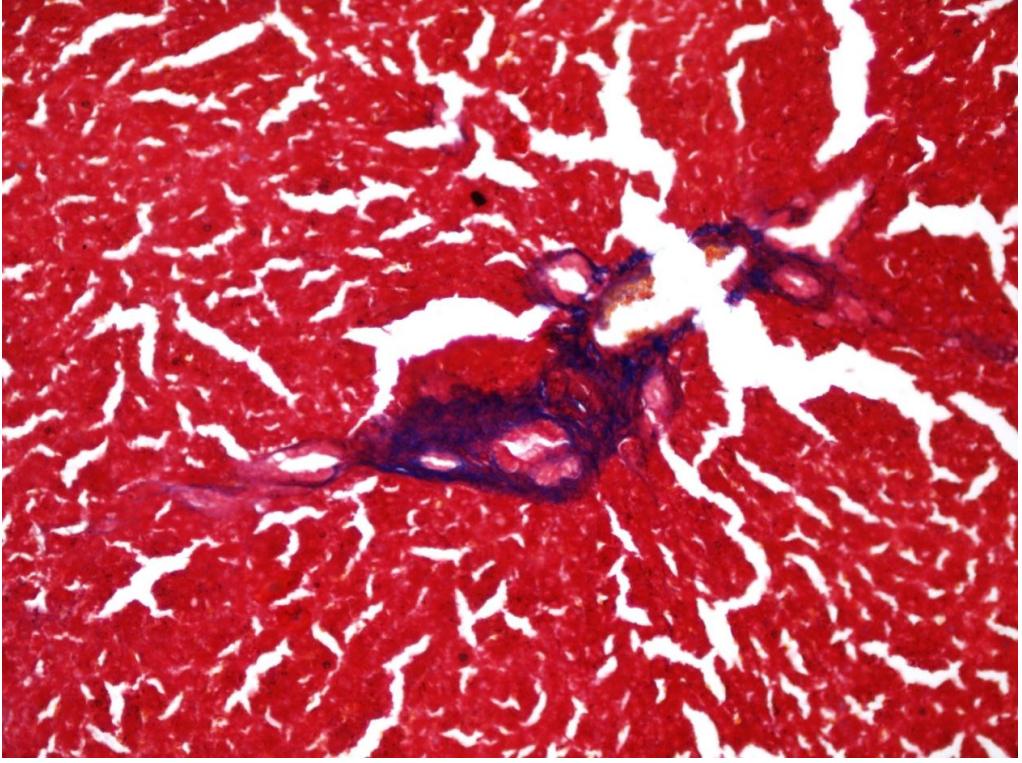
Resim 6. T grubunda hepatosit nekrozu, safra duktus proliferasyonu. (HEx200)



Resim 7. T grubunda belirgin portal fibrozis. (MTx200)



Resim 8. ÇY grubunda hafif düzeyde safra duktus proliferasyonu. (HEx200)



Resim 9. ÇY grubunda portal alanda hafif düzeyde fibrozis. (MTx200)

5. TARTIŞMA

TS modelinde ÇY'nin karaciğer hasarını önlemedeki etkinliğini araştırdığımız bu çalışmamızda TS'ye bağlı olarak karaciğer hasarı oluştuğunu ve ÇY'nin antioksidan etkinliğiyle TS'de oluşan karaciğer hasarını histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ışığında önlediğini bulduk.

Skleralarda, ciltte ve dokularda ortaya çıkan ve bilirubin seviyesinin kandaki fazlalığına bağlı olan renk değişimine sarılık denir. TS ise; intra ve ekstrahepatik safra yollarının herhangi bir seviyesindeki tıkanıklık sonucu safra akımının yavaşlaması veya durmasına bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablodur (1).

TS'deki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek birçok sitokinlerin üretimini artırır. Böylece kontrol edilemeyen inflamatuvar sürece, multiorgan disfonksiyonuna, respiratuvar distress sendromuna ve ölüme neden olur. Endotokseminin de TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki bu sitokinler, ROS'un aşırı üretilmesine duyarlıdır (2, 4).

Sıçanlarda ana safra kanalı ligasyonu ile indüklenen karaciğer fibrozisi, insandaki primer veya sekonder olarak gelişen karaciğer fibrozuna uygunluğu ve hızlı gelişmesi sebebiyle son zamanlardaki bilimsel çalışmalarda ilgi duyulan bir fibrosis modeli olmaktadır. Ana safra kanalı ligasyonu sıçanlara uygulandığında karaciğerde başta kollajen olmak üzere hücre dışı matriks proteinlerinin oluştuğu ve bu modelin sıçanlarda sekonder olarak karaciğer fibrozu gelişimi için uygun bir model olduğu bilinmektedir (10). Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından, bu karaciğer hasarı mekanizmalarını ortaya koymaya ve bu mekanizmaları önlemeye yönelik klinik ve deneysel çalışmalar yapılmaktadır (13). Oluşan hepatatoksitenin oksidatif stres ve LP'ye bağlı olduğu düşünüldüğünden bu ROS oluşumunu engelleyecek bir madde üzerine tedavi yaklaşımları ortaya çıkmıştır.

Bu amaçla kullanılabilen maddelerden biri de ÇY'dir. Çörekotu tohumu ve kimyasal bileşimi üzerine yapılan çok sayıda bilimsel araştırma neticesinde, çörekotunun birçok farmakolojik özelliğinin (antioksidan, anti-kanser, anti-ülser, anti-bakteriyel, anti-mikrobiyal, anti-tümör, anti-parazitik, v.b.) olduğu belirlenmiştir (14).

Yaptığımız bu çalışmada ratlarda oluşturulan TS'ye bağlı karaciğer hasarında ÇY'nin etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Gadzhiev ve arkadaşları ile Jiang ve arkadaşlarının TS'li hastalarla yaptıkları klinik çalışmada dolaşımdaki nötrofillerin oksidatif cevaplarını ölçmüşler ve oksidatif cevabın kontrol grubuna göre sarılıklı hastalarda arttığını bulmuşlardır. Kanda IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ gibi uyarıcı sitokinler yüksek bulunmuş ve bu sitokinler aracılığıyla nötrofillerin oksidatif cevabının arttığı düşünülmüştür (5, 32).

Yapılan araştırmalar TNF- α , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin dolaşımında artışına endotokseminin neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızda TNF- α , IL-6, IL-8 gibi inflamasyon şiddetini gösteren sitokinlerin düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Biz çalışmamızda TNF- α ölçümlerinde; K grubu ile T grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. K grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. Bu bize inflamasyon ve uzak organ hasarının göstergesi olan TNF- α değerinin ÇY grubunda daha düşük bir düzeyde arttığını göstermiştir.

IL-6 ölçümlerinde; K grubu ile T grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. K grubu ile ÇY grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk. Bu bize inflamasyon ve uzak organ hasarının göstergesi olan IL-6 değerinin ÇY grubunda daha düşük bir düzeyde arttığını göstermiştir.

IL-8 Ölçümlerinde; her 3 grup arasında IL-8 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

CRP akut faz proteinlerinin öncüsüdür. Serumdaki CRP seviyesi inflamatuvar durumu gösteren iyi bir parametredir ve serumdaki konsantrasyonu IL-6 ve TNF- α seviyeleri ile ilişkilidir (40).

Bizim çalışmamızdaki CRP ölçümlerinde; K grubu ile T grubu arasında ve T grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. K grubu ile ÇY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. . Bu bize inflamasyon durumunu gösteren CRP değerinin ÇY grubunda daha düşük bir düzeyde arttığını göstermiştir.

Terzi ve arkadaşları ratlarda ÇY'nin intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak ileum dokusunda MPO düzeyinin arttığını, ÇY uygulamasının ise ileum dokusunda MPO düzeyinde anlamlı derecede düşüşe neden olduğunu göstermişler (41). Bizim çalışmamızda her 3 grup arasında MPO düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

TS oluşturulan ratlarda ROS'u ortamdan uzaklaştıran GSH-Px, CAT ve SOD gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece ROS'un oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar (8).

Abdel-Daim ve arkadaşları tavşanlarda oksitetrasiklin ile indüklenen karaciğer hasarı üzerine ÇY'nin etkinliğini araştırmak için yaptıkları çalışmada oksitetrasiklinin karaciğer dokusunda SOD, CAT ve GSH düzeylerini azalttığını, MDA düzeyini artırdığını bulmuşlar. ÇY verilen TS'li grupta SOD, CAT ve GSH düzeyinin ÇY verilmeyen TS'li gruba göre daha yüksek olduğunu; ÇY verilen TS'li grupta MDA düzeyinin ise ÇY verilmeyen TS'li gruba göre daha düşük olduğunu bulmuşlar (42). Biz de yaptığımız çalışmada, ÇY grubunda T grubuna göre karaciğer dokusunda CAT düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını ancak SOD ve GSH-Px düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olmadığını bulduk. Bu sonuçlara göre ÇY CAT yolağı üzerinden antioksidan etkinliği ile TS'de karaciğer hasarını önlemektedir.

Develi ve arkadaşları ratlarda etanol ile indüklenen Karaciğer hasarını araştırdıkları çalışmada etanolün plazma transaminaz ve Karaciğer dokusunda MDA seviyesini artırdığını, antioksidan olarak ÇY verildikten sonra ise plazma transaminaz ve karaciğer dokusunda MDA seviyesinin azaldığını bulmuşlardır (43).

Küçük ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada ratlarda TS' de eritrosit ve karaciğer MDA seviyeleri ölçülmüş, antioksidan olarak LP inhibitörü olan dimetilsülfoksit kullanılmış. Sonuçta karaciğer ve eritrosit MDA seviyelerinin ilaç verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü görülmüş. Dimetilsülfoksit'in karaciğer dokusunun histopatolojik olarak korunmasında etkin olduğu bildirilmiş (44). Bu çalışmalardan hareketle biz de TS oluşturulan ratlarda antioksidan bir madde olan ÇY' nin karaciğer hasarını önlemedeki etkinliğini görmek için karaciğer dokusunda MDA seviyesine ve karaciğer doku histopatolojisine baktık. Çalışma sonunda ÇY tarafından LP inhibe edilerek karaciğer dokusunda artan MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü görüldü. Dolayısıyla ÇY LP'yi önleyerek karaciğer hasarını azaltır.

Histopatolojik sonuçlara baktığımızda TS'de karaciğer hasarı oluştuğunu ve ÇY'nin bu hasarı azalttığını saptadık. Ratlarda oluşan karaciğer hasarının istatistiksel olarak; nekroz, portal fibrozis, ve PMNL infiltrasyonu açısından ÇY grubunda, T grubuna göre daha az olduğunu bulduk.

TS modelinde ÇY'nin karaciğer hasarını önlemedeki etkinliğini araştırdığımız bu çalışmamızda varılan sonuçlar şöyle özetlenebilir, TS'ye bağlı olarak karaciğer hasarı oluşmaktadır. ÇY antioksidan etkinliğiyle TS'de oluşan karaciğer hasarını histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ışığında önler.

Bu konuda daha önce yapılan çalışmalar olmasına rağmen, kolay ulaşılabilirliği ve düşük maliyeti olan ÇY'nin TS'deki karaciğer hasarı üzerine etkinliğini araştıran yeterli sayıda çalışma olmadığı için örneklem büyüklüğü daha geniş ve daha uzun süreli çalışmaların yapılmasının, çalışmamızdaki sonuçlarımızın desteklenmesi ve ÇY'nin klinik kullanıma girmesi açısından gerekli olduğu düşüncesindeyiz.

ÖZET

Deneyisel Tıkanma Sarılığı Modelinde Çörekotu Yağının Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri

Bu çalışmada TS modeli kullanarak, sarılık sonrası oluşacak karaciğer hasarını önlemede ÇY'nin etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla K grubu (n: 10), T grubu (n: 10) ve ÇY grubu (n: 9) olarak grupladığımız ratlarda TS oluşturup sarılık sonrası ÇY vererek ÇY'nin karaciğer hasarına olan etkisini araştırdık. Çalışmada gruplar arasında serum örneklerinde TNF- α , IL-6, IL-8 ve CRP düzeylerine; Karaciğer dokusunda MDA, MPO, GSH-Px, CAT ve SOD enzim düzeylerine ve karaciğer doku histopatolojisine baktık.

Çalışmada TS oluşturulan ratlara verdiğimiz ÇY'nin karaciğer hasarını önlemede histopatolojik ve biyokimyasal parametreler açısından anlamlı bir istatistiksel iyileşme sağladığını saptadık

TS'nin hepatositler üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle oluşabilecek karaciğer hasarı eğer tedavi edilmezse giderek fulminan bir tabloya dönebileceği için tedaviye erken dönemde başlanması gerektiğini düşünüyoruz. Tedavide kolay ulaşılabilirlik ve düşük maliyet avantajı bulunan ve güçlü bir antioksidan madde olan ÇY'nin kullanılabilmesi ancak etkinliğinin ve etki mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için örneklem büyüklüğü daha geniş ve daha uzun süreli çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: Tıkanma sarılığı, karaciğer hasarı, çörekotu yağı

ABSTRACT

The Effects of Nigella Sativa Oil on Hepatic Injury in an Experimental Obstructive Jaundice Model

To investigate the efficacy of Nigella Sativa oil (NSO) in preventing liver damage which occurs following jaundice, using a model of obstructive jaundice (OJ).

Rats were separated into 3 groups of the control group (Group C, n=10), the T group (n=10) and the NSO group (n=9). OJ was created in all the rats then NSO was administered and the effect on hepatic damage was examined. Levels of TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP were examined in the serum samples, MDA, MPO, GSH-Px, CAT and SOD enzyme levels in the liver tissue and a histopathological examination was made of the liver tissue.

A statistically significant improvement was determined in the histopathological and biochemical parameters in the prevention of hepatic damage in the rats administered with NSO after the creation of OJ.

If damage which develops in the liver because of the negative effects of OJ on hepatocytes is left untreated, it can become a fulminant table and therefore, it is necessary to start treatment in the early stages. NSO, which is readily available and has the advantage of low cost, is a strong antioxidant agent which can be used in treatment, although there is a need for further more extensive and longer-term studies to be able to clarify the efficacy and effect mechanisms.

Key Words: Obstructive jaundice, liver damage, Nigella sativa oil

KAYNAKLAR

1. Kabakci B. Deneysel tıkanma sarılığı modelinde karaciğer hasarı üzerine andız (juniperus drupacea) pekmezi ve goji berry (lycium barbarum)'nin etkileri: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi 2013.
2. Kaya O, Koca YS, Barut I, Baspınar S, Sabuncuoglu MZ. L-carnitine reduces acute lung injury in experimental biliary obstruction. Saudi medical journal. 2015 Sep;36(9):1046-52. PubMed PMID: 26318460. Pubmed Central PMCID: 4613627.
3. Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Huibregtse K, Gouma DJ. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. Gut. 2000 May;46(5):725-31. PubMed PMID: 10764720. Pubmed Central PMCID: 1727939.
4. Sakrak O, Akpınar M, Bedirli A, Akyurek N, Aritas Y. Short and long-term effects of bacterial translocation due to obstructive jaundice on liver damage. Hepato-gastroenterology. 2003 Sep-Oct;50(53):1542-6. PubMed PMID: 14571782.
5. Gadzhiev JN, Tagiev EG, Gadzhiev NJ. [The state of cytokine status in patients with mechanical jaundice of benign origin]. Khirurgiia. 2015 (5):56-8. PubMed PMID: 26271325.
6. Akca T, Canbaz H, Tataroglu C, Caglikulekci M, Tamer L, Colak T, et al. The effect of N-acetylcysteine on pulmonary lipid peroxidation and tissue damage. The Journal of surgical research. 2005 Nov;129(1):38-45. PubMed PMID: 16243047.
7. Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tsai LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. Annals of clinical and laboratory science. 2001 Oct;31(4):383-90. PubMed PMID: 11688850.
8. Ogetman Z, Dirlik M, Caglikulekci M, Canbaz H, Karabacak T, Yaylak F, et al. The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 2006 Jan-Feb;19(1):19-30. PubMed PMID: 16546926.
9. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. Free radical biology & medicine. 1996;20(3):351-9. PubMed PMID: 8720905.
10. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Gascon F, Munoz MC, et al. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-

- hepatic bile duct ligation in rats. *Journal of pineal research*. 2001 Sep;31(2):138-44. PubMed PMID: 11555169.
11. Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, et al. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):149-60. PubMed PMID: 9862861.
 12. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):361-7. PubMed PMID: 9021948.
 13. Barber AE, Jones WG, 2nd, Minei JP, Fahey TJ, 3rd, Lowry SF, Shires GT. Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. *American journal of surgery*. 1991 Feb;161(2):300-4. PubMed PMID: 1990885.
 14. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research : PTR*. 2003 Apr;17(4):299-305. PubMed PMID: 12722128.
 15. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research : PTR*. 2000 Aug;14(5):323-8. PubMed PMID: 10925395.
 16. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta medica*. 1995 Feb;61(1):33-6. PubMed PMID: 7700988.
 17. Isik F, Tunali Akbay T, Yarat A, Genc Z, Pisiriciler R, Caliskan-Ak E, et al. Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*. 2011 Mar;56(3):721-30. PubMed PMID: 20658190.
 18. al-Shabanah OA, Badary OA, Nagi MN, al-Gharably NM, al-Rikabi AC, al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 1998 Jun;17(2):193-8. PubMed PMID: 9700580.
 19. Tontuş O, Coşkun S, Erengül C, Pişkinpafla M. Obstrüktif sarılıklı hastalarda cerrahi morbidite ve mortaliteyi etkileyen risk faktörleri. *Klin Den Cerrahi Derg*. 1993;1:228-31.
 20. Yüzen Y, Öncel T, Engin S, Aldemir S, Akyıldız A. Tıkanma sarılıklarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen faktörler. *Ulusal Cerrahi Derg*. 1993;9:238-43.
 21. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 9th ed 1996. p. 827-29.
 22. Güngör S, Kurultay N, Şener G, Er H, Çökmez A, Türker M. Deneysel olarak tıkanma ikteri geliştirilen ratlarda bakteriyel translokasyonun Gösterilmesi. *Klimik Derg*. 2003;16(3):121-5.

23. M.B K. Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Modelde Ursodeoksikolik Asit ve Glutamin'in Bakteriyel Translokasyon, Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Karaciğer Histopatolojisine Olan Etkileri. [Tıpta Uzmanlık Tezi]. İstanbul 2005.
24. Erbil Y, Berber E, Ozarmagan S, Seven R, Eminoglu L, Calis A, et al. The effects of sodium deoxycholate, lactulose and glutamine on bacterial translocation in common bile duct ligated rats. *Hepato-gastroenterology*. 1999 Sep-Oct;46(29):2791-5. PubMed PMID: 10576346.
25. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2003 Mar;37(3):551-7. PubMed PMID: 12601352.
26. Parks RW, Clements WD, Pope C, Halliday MI, Rowlands BJ, Diamond T. Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *Journal of anatomy*. 1996 Dec;189 (Pt 3):561-5. PubMed PMID: 8982831. Pubmed Central PMCID: 1167698.
27. Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *The Journal of surgical research*. 2003 Nov;115(1):18-23. PubMed PMID: 14572768.
28. Ding JW, Andersson R, Stenram U, Lunderquist A, Bengmark S. Effect of biliary decompression on reticuloendothelial function in jaundiced rats. *The British journal of surgery*. 1992 Jul;79(7):648-52. PubMed PMID: 1643476.
29. Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Gouma DJ. Inflammatory and immunologic effects of obstructive jaundice: pathogenesis and treatment. *Journal of the American College of Surgeons*. 1995 Dec;181(6):567-81. PubMed PMID: 7582236.
30. Parks RW, Stuart Cameron CH, Gannon CD, Pope C, Diamond T, Rowlands BJ. Changes in gastrointestinal morphology associated with obstructive jaundice. *The Journal of pathology*. 2000 Dec;192(4):526-32. PubMed PMID: 11113871.
31. Tozlu Bindal G. Tıkanma ikteri modelinde kefirin karaciğer hasarı üzerine etkisi [Uzmanlık]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2015.
32. Jiang WG, Puntis MC, Hallett MB. Neutrophil priming by cytokines in patients with obstructive jaundice. *HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery*. 1994;7(4):281-9. PubMed PMID: 8204547. Pubmed Central PMCID: 2423714.
33. Beckstrom-Sternberg SM DJ. Potential for synergistic action of phytochemicals in spices. In *Spices Herbs and Edible Fungi*. Elsevier Science: Oxford. 1994:201–23.
34. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2002 Jan;79(1):1-11. PubMed PMID: 11744288.

35. Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochemistry and molecular biology international*. 1999 Jan;47(1):153-9. PubMed PMID: 10092955.
36. Turkdogan MK, Agaoglu Z, Yener Z, Sekeroglu R, Akkan HA, Avci ME. The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: new hopes. *DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 2001 Feb;108(2):71-3. PubMed PMID: 11367885.
37. Khanna T ZF, Dandiya PC. CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia*. 1993.;5:407-10.
38. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*. 2000 Jul 14;400(1):89-97. PubMed PMID: 10913589.
39. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology letters*. 1998 Mar 16;95(1):23-9. PubMed PMID: 9650643.
40. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E. *Klinik Romatoloji Kitabı* 1999. 148 p.
41. Terzi A, Coban S, Yildiz F, Ates M, Bitiren M, Taskin A, et al. Protective effects of *Nigella sativa* on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2010 Feb;23(1):21-7. PubMed PMID: 20233001.
42. Abdel-Daim MM, Ghazy EW. Effects of *Nigella sativa* oil and ascorbic acid against oxytetracycline-induced hepato-renal toxicity in rabbits. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015 Mar;18(3):221-7. PubMed PMID: 25945233. Pubmed Central PMCID: 4414986.
43. Develi S, Evran B, Betül Kalaz E, Kocak-Toker N, Erata GO. Protective effect of *Nigella sativa* oil against binge ethanol-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Chinese journal of natural medicines*. 2014 Jul;12(7):495-9. PubMed PMID: 25053547.
44. Kucuk C, Ok E, Yilmaz Z, Sozuer E, Muhtaroglu S, Arar M. The effects of dimethylsulfoxide in experimental obstructive jaundice. *Acta chirurgica Belgica*. 2003 Aug;103(4):392-5. PubMed PMID: 14524158.