



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA YAPILAN KARACİĞER İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINDA ST. JOHN'S WORT'UN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ECZ. BELKİS SOYLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. AHMET ÖZER ŞEHİRLİ

2014-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmakoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Belkıs SOYLU
Tez Başlığı : Şıçanlarda yapılan karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında St. John's wort'un etkilerinin incelenmesi
Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 18.08.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Ayliz VELİOĞLU ÖĞÜNÇ

Marmara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Can ERZİK

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Göksel ŞENER

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 18.08.2014 tarih ve 71 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

- Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
- Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasında elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Ecz. Belkıs SOYLU

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini büyük bir özveri ile aktaran, yol gösteren ve çok büyük emek harcayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ'ye ve emeği geçen başta Anabilim Dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU'na, Prof. Dr. Göksel ŞENER'e, Prof. Dr. Levent KABASAKAL'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Grupların oluşturulması sırasında yardımcı olan H.N.H. Genel Cerrahi Kliniği Uzmanlık Öğrencisi Dr. Süleyman ATALAY'a, dokuların analizi sırasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Şule ÇETİNEL'e, Doç. Dr. Ayliz VELİOĞLU ÖĞÜNÇ'e, Yrd. Doç. Dr. Aslı AYKAÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, her konuda desteğini esirgemeyen Generica İlaç San. ve Tic. A.Ş.'ye ve ruhsatlandırma departmanındaki çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana destek olan ve güvenen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ecz. Belkıs SOYLU

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii-v
KISALTMALAR.....	vi-vii
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Karaciğer anatomisi ve fonksiyonları.....	5
4.1.1. Karaciğerin fizyolojik fonksiyonları.....	6
4.1.2. Hepatik kan akımı.....	7
4.1.3. Karaciğer enzimleri.....	8
4.2. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı.....	9
4.2.1. Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarının tipleri ve aşamaları...10	
4.2.2. İskemi/reperfüzyon hasarının patofizyolojisi.....10	
4.2.3. Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında rol oynayan başlıca faktörler.....12	
4.2.3.1. Kupffer hücreleri.....13	
4.2.3.2. Lökositler ve lenfositler.....13	
4.2.3.3. Trombositler.....13	
4.2.3.4. Endotel hücreler.....14	
4.2.3.5. Sitokinler.....14	
4.2.3.6. Reaktif oksijen türevleri ve reaktif nitrojen türevleri.16	
4.2.3.7. Kompleman.....16	
4.2.3.8. ATP depleasyonu ve kalsiyum homeostazında bozukluk.....16	
4.2.3.9. pH paradoksu.....17	
4.2.4. Apoptoz ve nekroz.....17	
4.2.4.1. Apoptozun mekanizması.....17	

4.2.5. Multidrug resistance-associated protein-2.....	20
4.3. St. John's Wort.....	21
4.3.1. Bioaktif bileşenleri.....	22
4.3.2. St. John's Wort'de bulunan bileşiklerin enzim indüklemeye etkileri.....	23
4.3.3. Serotonin sendromu.....	24
4.3.4. St. John's Wort'un sitokrom P450 enzimleri ve P-glikoprotein üzerine etkileri.....	25
4.3.5. Yan etkiler.....	26
4.3.6. St. John's Wort'un geleneksel ve güncel kullanım alanları.....	28
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
5.1. Anestezi.....	29
5.2. Operasyon.....	29
5.3. Gruplar.....	30
5.4. Biyokimya.....	31
5.4.1. Karaciğer fonksiyon testleri.....	31
5.4.2. Tümör nekroz faktör- α tayini.....	31
5.4.3. İnterlökin-1 β tayini.....	32
5.4.4. Malondialdehit tayini.....	34
5.4.5. Glutasyon tayini.....	35
5.4.6. Myeloperoksidaz aktivitesi tayini.....	36
5.4.7. Dokuda Na ⁺ K ⁺ -ATPaz aktivitesi tayini.....	37
5.4.8. Dokuda kemilüminesans yöntemi.....	40
5.4.9. Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinin tayini.....	41
5.5. Histopatolojik değerlendirme yöntemi.....	42
5.5.1. İmmünohistokimya.....	42
5.5.2. İstatistik yöntemi.....	43
6. BULGULAR.....	44
6.1. Seruma ait sonuçlar.....	44
6.2. Glutasyon ve malondialdehit sonuçları.....	46
6.3. Myeloperoksidaz ve Na ⁺ K ⁺ -ATPaz aktivitesi sonuçları.....	48

6.4. Luminol ve lusigenin aracılı kemüliminesans ile ROT ölçüm sonuçları.....	50
6.5. Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi sonuçları.....	52
6.6. Histoloji sonuçları.....	54
6.7. İmmünohistokimyasal inceleme sonuçları.....	55
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
8. KAYNAKLAR.....	63

KISALTMALAR

ANOVA:	Analysis of Variance (Varyans analizi)
ALT:	Alanin aminotransferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz
ATP:	Adenozin Tri Fosfat
AUC:	Eğri altında kalan alan
BUN:	Kan üre nitrojeni
CK:	Kreatinin kinaz
Cre:	Kreatinin
CRP:	C-reaktif protein
COX:	Siklooksijenaz
CYP:	Sitokrom P450
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DTNB:	Ditiyonitro benzen
EC:	Endotel hücresi
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ET:	Endotelin
GM-CSF:	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
GSH:	Glutatyon
HETAB:	Hekzadesiltrimetil Amonyum Bromid
HI:	Hepatik iskemi/reperfüzyon
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
ICAM:	İntraselüler Hücre Adezyon Molekülü
IL:	İnterlökin
IL-1:	İnterlökin-1
IL-1β:	İnterlökin-1-beta
INF-γ:	İnterferon gama
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK-STAT-1:	Januskinaz-sinyal transducer ve transkripsiyon-1
KC:	Kupffer hücreleri
LDH:	Laktat Dehidrojenaz

LTB4: Lökotrien B4
MDA: Malondialdehit
MPO: Myeloperoksidaz
MRP: Multidrug Resistance-Associated Protein-2
NF- κ B: Nüklear faktör kappa B
NO: Nitrik Oksit
PAF: Platelet aktive edici faktör
P-gp: P-glikoprotein
RNT: Reaktif Nitrojen Türevleri
ROT: Reaktif Oksijen Türevleri
SF: Serum Fizyolojik
SJW: St. John's Wort
TBA: Tiyobarbitürik asit
TCA: Triklotoasetik asit
TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa
TNF- β : Tümör nekroz faktör-beta
VCAM: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
w/v: Ağırlık/Hacim

ŞEKİLLER

Şekil 1: Çok yönlü hepatik iskemi/reperfüzyon hasarı

Şekil 2: Apoptozun ölüm reseptörü aracılı (ekstrinsik) yolu

Şekil 3: *Hypericum perforatum*'un farklı ürünlerinin üretim şeması

Şekil 4: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait serum AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β değerleri

Şekil 5: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku GSH ve MDA değerleri

Şekil 6: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku MPO ve Na⁺-K⁺ATPaz, değerleri

Şekil 7: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku luminol ve lusigenin aracılı kemiluminesans ile ROT ölçüm değerleri

Şekil 8: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait Western Blot analizi ile Bcl-2/Bax oranı ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri

Şekil 9: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait histoloji sonuçları

Şekil 10: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait immunohistokimyasal P-gp sonuçları

Şekil 11: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait immunohistokimyasal MRP-2 sonuçları

TABLÖLAR

- Tablo 1:** Aminotransferaz değerlerinde belirlenen artışın nedenlerinin biyokimyasal özellikleri
- Tablo 2:** *Hypericum perforatum*'da bulunan ve biyolojik olarak saptanabilen bileşikler
- Tablo 3:** St. John's Wort ile olası farmakokinetik ve farmakodinamik etkileşimler
- Tablo 4:** Serotonin sendromu belirtileri
- Tablo 5:** St. John's Wort'un yan etkileri
- Tablo 6:** Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait serum AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β değerleri
- Tablo 7:** Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku GSH ve MDA değerleri
- Tablo 8:** Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku MPO ve Na⁺-K⁺ATPaz, değerleri
- Tablo 9:** Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku luminol ve lusigenin aracılı kemiluminesans ile ROT ölçüm değerleri
- Tablo 10:** Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait Western Blot analizi ile Bcl-2/Bax oranı ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri

1. ÖZET

Belkıs SOYLU

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Sıçanlarda Yapılan Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında St. John's Wort'un Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Serbest oksijen radikalleri iskemi/reperfüzyon (HI) hasarının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, HI hasarında St. John's Wort'un (SJW) olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, Wistar albino sıçanlarda anestezi altında hepatik arter, portal ven ve safra kanalı 45 dakika süreyle klempe edilerek iskemi periyodu oluşturuldu ve bu sürenin sonunda reperfüzyona bırakılan hayvanlar 1 saat sonra dekapite edildi. St. John's Wort (300 mg kg⁻¹, i.p.) ya da SF iskemi öncesi 3 gün günde tek doz ve iskemiden 30 dakika önce peroral olarak uygulandı. Kontrol grubu sıçanlara sham operasyonu yapıldı ve serum fizyolojik uygulaması yapıldı. Serum örneklerinde AST ve ALT aktivitesi, TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ölçüldü. Karaciğer dokusunda Na⁺K⁺-ATPaz, MDA, GSH, MPO tayinleri yapıldı ve Western Blot analizi ile Bcl-2/Bax oranı ile kaspaz-3 ve 9 aktiviteleri ölçüldü. İmmunohistokimyasal analizlerle P-gp ve MRP-2'in varlığı değerlendirildi. **Bulgular:** İskemi/reperfüzyon serum AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β düzeylerini yükseltirken, SJW uygulaması ile bu değerler kontrol seviyelerine yaklaşmıştır. İskemi reperfüzyon, karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde, MPO, kaspaz-3 ve 9 aktivitelerinde artışa, GSH, P-gp ve MRP-2 düzeylerinde, Bcl-2/Bax oranında ve Na⁺K⁺-ATPaz aktivitelerinde azalmaya neden olurken, SJW uygulaması bu parametreleri anlamlı olarak düzelmiştir.

Sonuçlar: Çalışmamızın sonucunda SJW'nin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı değişik mekanizmalarla koruyucu etkilerinin gösterilmesi, toksisitesi olmayan bu ajanın klinik açıdan yeni bir tedavi prensibi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: İskemi/reperfüzyon, St. John's Wort, inflamasyon, apoptoz.

2. SUMMARY

Belkıs SOYLU

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ

Department of Pharmacology

Investigation of effects of St. John's Wort in hepatic ischemia/reperfusion injury conducted in rats

Objective: Reactive oxygen species play an important role in pathophysiology of ischemia/reperfusion injury. In this study, the aim is investigation of the possible protective effects of St. John's Wort (SJW) in hepatic ischemia/reperfusion injury.

Methods: In our study, hepatic artery, portal vein and bile duct was clamped for 45 minutes for the purpose of ischemia period was formed in Wistar albino rats under anesthesia and at the end of this time animals left to reperfusion for 1 hour were decapitated. St. John's Wort (300 mg.kg⁻¹, i.p.) or normal saline were administrated for 3 days as one a day before ischemia and 30 minutes before ischemia per orally. The rats in control group were sham-operated and normal saline was applied. AST and ALT activity, TNF- α and IL-1 β levels were measured in serum samples. Na⁺K⁺-ATPaz, MDA, GSH, MPO were determined in liver tissue and caspase 3 and caspase 9 activity with Bcl-2/Bax ratio were measured by Western Blot analyze. Presence of P-gp and MRP-2 was evaluated by immunohistochemical analyze.

Results: This levels approached to control levels with administration of SJW, while ischemia/reperfusion enhance serum AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β levels. SJW administration repaired these parameters meaningfully, while ischemia/reperfusion cause increase in MDA levels, DNA fragmentation, Bcl-2/Bax ratio, MPO, caspase-3 and 9 activities and led to decrease in GSH, P-gp and MRP-2 levels and Na⁺K⁺-ATPaz activity.

Conclusion: Our results indicate that shown of protective effects of SJW through various mechanisms against to ischemia/reperfusion injury suggested that this non-toxic drug clinically can create a new therapeutic principle.

KEYWORDS: Ischemia/reperfusion, St. John's Wort, inflammatory, apoptosis.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanmakta ve hücrel enerji depolarının boşalmasıyla toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır (Şener ve Yeğen, 2009). Reperfüzyon bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır (Zimmerman ve Granger, 1992). Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda, sadece iskemi ile oluşan hasara göre daha ciddi bir hasara yol açar (Zimmerman ve Granger, 1992; Datta ve ark., 2013).

Hepatik iskemi/reperfüzyon hasarı hepatik travma, hemorajik şok, büyük intrahepatik tümörlerin rezeksiyonu ve karaciğer nakli gibi çeşitli klinik durumlarda meydana gelebilir (Şehirli ve ark., 2008; Zhai ve ark., 2012).

Hepatik iskemi reperfüzyon patofizyolojisi, karaciğer hasarına yol açan birçok mekanizmanın devreye girmesiyle meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, sitokin ve kemokin salgılanması, nötrofillerin toplanması, nitrik oksit (NO) ve endotelin (ET) dengesindeki bozulma, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, vazokonstriksiyon, kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücrel ve moleküler etkileşimler söz konusudur (Baykara ve ark., 2010).

İskemi sırasında hepatositlerde oksijen yokluğu, mitokondriyal enerji üretiminin durmasına, ATP depleksiyonuna ve hidrolitik enzimleri aktive eden ve hücre hacim regülasyonunu bozan H^+ , Na^+ , Ca^{2+} homeostazının değişikliğine neden olur. Bu duruma sinüsoidal lümenin daralması ve küçük kan dolaşımı disfonksiyonuna neden olan NO ve ET üretimi arasında dengenin bozulması eşlik eder. Kapiller daralma ayrıca hepatik nötrofil birikimine neden olur. Bununla beraber Kupffer hücrelerinin aktive olarak, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) ve TNF- α , IL-1 gibi proinflatuvar sitokinleri salar. IL-1 β ve TNF- α , granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), interferon gama (INF- γ) ve TNF- β sitokinler adezyon molekülleri

(intraselüler hücre adezyon molekülü [ICAM] ve vasküler hücre adezyon molekülü [VCAM]) ve kemokinlerin indüksiyonu boyunca salınır. Kemokinler ise nötrofil aktivasyonu ve birikimini destekler, böylece ROT ve proteazlar salıvererek parankimal hasarın ilerlemesine katkıda bulunur (Elias-Miro ve ark., 2011).

Bitkisel ürünlerin kullanımının popülaritesi tüm dünyada genelinde artmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bitkilerden biri olan *Hypericum perforatum*, hafif ve orta dereceli depresyonun tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu endikasyonu Alman Komsiyon E tarafından da onaylanmıştır ve düşük yan etki ile hastalar tarafından iyi tolere edilmektedir. Depresyon dışında SJW geleneksel olarak yara iyileştirmede (akut ve ilerlemiş yaralanmalarda), birinci derece yanıklar ve miyalji için haricen kullanılmaktadır (Gödtel-Armbrust ve ark., 2007; Choudhuri ve Valerio, 2005). Yapılan araştırmalarda *Hypericum perforatum*'un insan bağışıklık yetmezlik virüsüne (HIV, Human Immunodeficiency Virus) karşı antiviral etkinlik gösterdiği bulunmuş fakat viral büyüme ve üreme üzerindeki etki mekanizması net olarak açıklanamamıştır. *Hypericum perforatum*'un veya biyoaktif bileşeni hiperisinin kanserin çeşitli türlerinde ve ilerlemesinde tedavi için yararlı olabileceği görüşü de mevcuttur (Hawken, 1997). *Hypericum perforatum*'dan elde edilen ekstraktların P-gp ve CYP enzimlerini indüklediği güncel çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve ark., 2004; Wang ve ark., 2002).

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda orta ve sol hepatik arterler, portal ven ve safra yolları düzeyinde uygulanan iskemi/reperfüzyon sonucu oluşan karaciğer hasarına; St. John's Wort'un koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Karaciğerin Anatomisi ve Fonksiyonları

Karaciğer, yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %2.5'ini oluşturan vücuttaki en büyük iç organ olup (<http://irs.ub.rug.nl/dbi>, Erişim tarihi: 20.06.2014; <http://faculty.ksu.edu.sa>, Erişim tarihi: 20.06.2014), hepatositler, Kupffer hücreleri, sinüzoidal endotelyal hücreler, safra kanalı epitel hücreleri ve Ito hücreleri olmak üzere 5 çeşit hücre tipine sahiptir.

Hepatositler karaciğer toplam hücre kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturmakta (Allen, 2002) ve protein, kolesterol, safra asitleri ve fosfolipitlerin sentezinde, protein depolanmasında, karbonhidratların transformasyonunda, eksojen ve endojen maddelerin detoksifikasyonunda görev almaktadırlar. Ayrıca insülin benzeri büyüme faktörü IGF-1, trombopoietin ve eritropoietin gibi hormonları ve interlekin-8 ve interlekin-6 gibi sitokinleri ve C-reaktif protein (CRP) veya serum amiloid A gibi proteinleri sentezleyebilirler (Ramadori ve ark., 2008).

Kupffer hücreleri sinüzoidlerde kalan makrofajlardır. Bu hücreler yaşlı kırmızı kan hücreleri ve bakterilerin atılmasına yardımcı olur. Ayrıca safranın ana pigmenti haline gelen bilirubin içindeki hem grubunu (hemoglobinde pigment içeren demir) yıkar (Allen, 2002). Kupffer hücreleri hepatik kütleinin yaklaşık olarak %10'unu oluşturur. Bu hücreler genel dolaşıma ulaşmadan önce splankinik venöz kanı filtre eder, gastrointestinal kanaldan absorbe edilen antijenleri ve diğer maddeleri fagosit eder. Sepsiste, Kupffer hücreleri bakterileri süpürme, bakteriyel ürünleri inaktive etme ve inflamatuvar mediyatörleri temizlemeden görevlidir. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu (inflamatuvar uyarı ile), karaciğere nötrofilleri toplayan ve inflamatuvar cevabı artıran sitokinler ve kemokinleri içeren proinflamatuvar maddeleri üretir veya salımını tetikler. Kupffer hücreleri yabancı bileşenlere karşı vücudu korumak için esansiyeldir (<http://www.noranaes.org>, Erişim tarihi: 20.06.2014).

Sinüzoidal endotelyal hücreler, Disse aralığına sinüzoidal endotelyum boyunca birçok proteinin serbestçe geçmesine izin veren büyük porlardır.

Safra kanalı epitel hücreleri, portalda interlobüler safra kanalında bulunmaktadır.

Ito hücreleri, Disse aralığında bulunmaktadır. Karaciğer hasarı oluştuğunda Ito hücreleri, karaciğer fibrozuna neden olan kollojeni üreten hücrelere dönüştüğünden dolayı önemlidirler. Eğer bu durum büyük bir alanda olursa, karaciğerde siroz meydana gelir (Allen, 2002).

4.1.1. Karaciğerin fizyolojik fonksiyonları

- **Protein metabolizması:** Karaciğer protein metabolizması için ana merkezdir. Karaciğer, proteinlerin ve peptitlerin birçok çeşidini sentezler ve yıkar. Ayrıca amino asitlerin üretiminde ve yıkılmasında esansiyel bir role sahiptir. Hepatositler amino asitleri transaminasyon ve oksidatif deaminasyon reaksiyonları ile keto asitlere, glutamine ve amonyaka çevirir. Karaciğer tarafından üretilen proteinler vücutta her bir organı etkilemektedir, bu proteinler; koagülasyon faktörleri, akut faz reaktifleri, hormonların prekürsörleri ve taşıyıcı proteinlerdir.
- **Karbonhidrat metabolizması:** Karaciğer, özellikle karbonhidrat içeren öğün sonrasında, günlük açlık veya uzun süreli egzersizden sonra kan glukozunun homeostazında önemli bir role sahiptir. Karaciğer glukozu, sinüzoidal kandaki glukoz konsantrasyonu ve hormonal etkileri ile insülin, katekolaminler ve glukagon düzeylerine bağlı olarak yıkar veya üretir. Glukoz ve glikojenin hepatik sentezi arasında karşıt bir ilişki vardır. Tokluk koşulunda, karaciğer glukozu glikojene çevirir. Aksine, karbonhidrat yoksunluğunda karaciğer glukoz üretimini artırır.
- **Lipid metabolizması:** Karaciğerde yağ asitlerinin majör kaynakları tekrarlayan lipojenez, karaciğer tarafından alınan lipoproteinler, ekzojen (plazma) serbest yağ asitleri ve sitoplazmik trigliseritlerin hidrolizidir. Glikojen depoları dolduğunda, karaciğer glukozu efektif olarak yağ asitlerine ve trigliseritlere çevirir. Karaciğer yağ asitlerinin metabolizması için iki majör yolu kullanır, bunlar; esterifikasyon ve beta-oksidasyondur.

- **Safra metabolizması:** Karaciğer safra asitlerini sentezler ve vücuttan sterollerin atılması için sorumlu şeftir.
- **Koagülasyon:** Karaciğer, faktör III (doku tromboplastin), IV ve VIII (von Willebrand faktör) dışındaki tüm koagülasyon faktörlerini sentezler.
- **Eritropoez (Hem grubu ve bilirubin metabolizması):** Karaciğer, hamileliğin 9. ve 24. haftaları arasında fetüsün birinci eritropoetik organıdır. Bu görevine infant (yeni doğan) yaklaşık 2 aylık olana kadar devam eder. Yetişkinlerde karaciğer hem üretiminin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Hemoglobinin metabolizması sonucu bilirubin oluşur.
- **Endokrin fonksiyonu:** Karaciğer, hormonlar ve hormon bağı proteinlerin metabolizmasında ana rol oynar. Karaciğer hormonların birçoğunu sentezler (anjiotensinojen, trombopoietin, insülin benzeri büyüme faktörü) ve inaktive eder (aldosteron, estrojenler, androjenler, antidiüretik hormon).
- **İmmün fonksiyonu:** Karaciğer retiküloendotelyal organların en büyüğüdür ve vücut savunmasında belirgin bir role sahiptir.
- **İlaçların (Ksenobiyotiklerin) metabolizması:** Karaciğer ksenobiyotikleri metabolize eden ana organdır. İlaçların hepatik klerensini kontrol eden enzimatik yollar 3 kategoriye veya faza ayrılabilir. Faz 1 reaksiyonları, sitokrom P450 tarafından yürütölür ve ilaçların polaritesini artırır. Faz 2 reaksiyonları, ilaç veya metabolit ve endojen hidrofilik bir madde arasında konjugasyondur. Faz 3 reaksiyonları, enerji bağımlı taşıyıcı sistemler yoluyla ilaç eliminasyonunu içerir. Hepatik klerens bu fazların biri veya daha fazlasından oluşabilir (<http://www.noranaes.org>, Erişim tarihi: 20.06.2014).

4.1.2. Hepatik kan akımı

Kalp debisinin yaklaşık olarak %25'i karaciğerden geçmektedir (1 g karaciğer için 1 ml kan). Kan karaciğere hepatik arter ve portal venden girmektedir. Portal ven

karaciğere toplam kan akışının %70 ila %75'ini ve hepatik oksijen tüketiminin %50 ila %55'ini iletmektedir.

Hepatik arter ve portal ven, karaciğere porta hepatis bölümünden girer ve karaciğere paralel bir yol izlemektedir.

4.1.3. Karaciğer enzimleri

Aminotransferazlar

Aminotransferazlar en sık değerlendirilen ve hepatoselüler nekrozun spesifik indikatörleridir. Bu enzimler, aspartat aminotransferaz (AST veya serum glutamat oksaloasetik transaminaz-SGOT) ve alanin aminotransferaz (ALT veya serum glutamik piruvat transaminaz-SGPT), aspartat ve alaninin amino asitlerini ketoglutarik asidin keto grubuna transferini katalizlerler. ALT, öncelikli olarak karaciğerde bulunur. Fakat AST kalp, iskelet kası, böbrek, beyin ve karaciğer gibi dokuların birçoğunda bulunur.

AST: aspartat + α ketoglutarat = oksaloasetat + glutamat

ALT: alanin + α ketoglutarat = piruvat + glutamat

AST, hepatositlerin mitokondri ve sitozollerinin her ikisinde de bulunurken, ALT sitozolde bulunmaktadır.

Yaygın doku nekrozundan sonra serumda mitokondriyal AST'de büyük artış meydana gelir (Tablo 1).

Aminotransferaz değerlerinin hafif, orta ve ciddi yükselmesi:

1. Ciddi (>20 kat, 1000 U/L): Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz seviyeleri tüm karaciğer hastalıklarında bir dereceye kadar artar. En yüksek değer ciddi viral hepatit, ilaç veya toksinlerin neden olduğu nekroz ve dolaşım şokunda meydana gelebilir.

2. Orta (3-20 kat): Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz, akut hepatit, neonatal hepatit, kronik hepatit, otoimmün hepatit, ilacın indüklediği hepatit, alkolik hepatit ve akut safra yolu tıkanmalarında orta seviyede yükselir. Alanin amino transferaz, kronik karaciğer hastalıklarında AST ile karşılaştırıldığında genellikle daha fazla artmaktadır.
3. Hafif (1-3 kat): Bu yükselmeler genellikle sepsisin indüklediği neonatal hepatit, ekstrahepatik biliyer atrezi, karaciğer yağlanması, siroz, nonalkolik steato hepatit ve ilaç toksisitesinde görülür (Thapa ve Walia, 2007).

Tablo 1: Aminotransferaz değerlerinde belirlenen artışın nedenlerinin biyokimyasal özellikleri (Giannini ve ark., 2005).

Neden	Aminotransferaz değerlerinde artış (değerxURL)	Bilirubin değerinde artış (değerxURL)	Yorumlar
İskemik hasar	>10 ila >50	<5	AST>ALT; başlangıç piklerinden sonra aminotransferaz değerinin hızlı artışı ALT/LDH oranı <1 Komorbid koşullarının varlığı
Toksik hasar	>10	<5	Enzim değişikliğinin modeli iskemik hepatitinki ile benzerdir. Toksik hasarın hikayesi
Akut viral hepatit	5-10 ila >10	5-10	Aminotransferaz değerlerinin yavaş artışı Risk faktörlerinin varlığı
Akut biliyer tıkanma	5-10	5-10 ila >10	Aminotransferaz artışı kolestazdan önde gider. Tipik semptomların varlığı
Alkolik hepatit	5-10	5-10 ila >10	AST/ALT oranı > 2

Not: URL: En üst referans limit; AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; LDH: Laktat dehidrojenaz

4.2. Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı

Hepatik iskemi/reperfüzyon (HI) hasarı, kompleks karaciğer ameliyatı sırasında portal vasküler bağlama nedeniyle vasküler girişin tıkanmasının bir sonucudur. Bu

hasar direkt olarak karaciğer iskemisinin süresi ile ilişkilidir ve karaciğer transplantasyonu ve rezeksiyonunda morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Klinik pratiklerden edinilen bilgiyle, HI hasarı sırasında meydana gelen biyokimyasal ve hücresel değişiklikler çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları, HI hasarının patofizyolojisinin anlaşılmasında ve yeni terapötik metotların geliştirilmesinde avantaj sağlamaktadır (Lentsch, 2012).

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak hücre fonksiyon bozukluğundan hücre ölümüne kadar giden bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik dokunun tekrar kanlanması reperfüzyondur. Enerji gereksiniminin giderilmesi ve toksik metabolitlerin ve çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin sistemik dolaşıma verilmesi ile ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir ve bu durum daha ileri doku hasarına yol açabilir. İskemi-reperfüzyon hasarı, hipoksi döneminden sonra oksijen taşınmasının sürdürülmesinde yer alan çok komplike hücresel olayların bir dizisidir (Baykara ve ark., 2010; Baykara ve Tekmen, 2005).

4.2.1. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının tipleri ve aşamaları

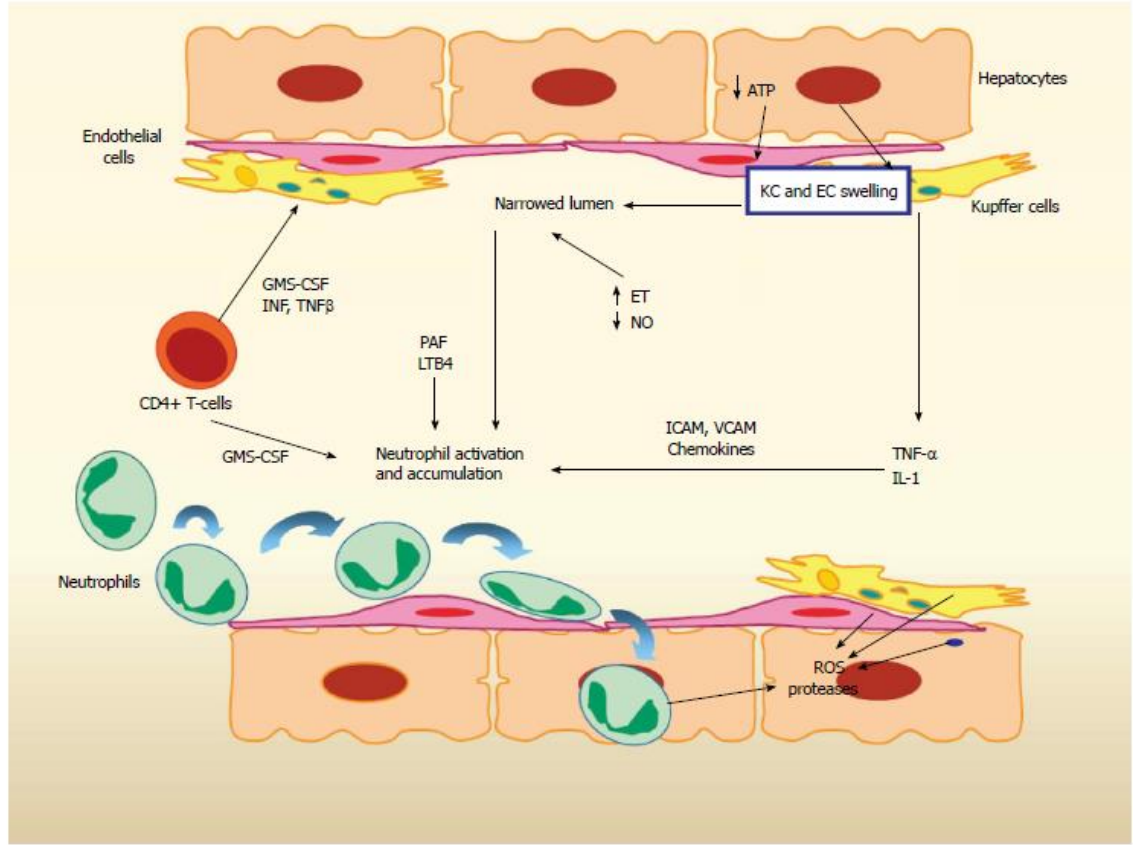
Hepatik iskemi/reperfüzyon olarak nitelendirilebilen karaciğer hasarının iki önemli tipi ayırt edilmektedir. Hepatoselüler hasarı başlatan hızlı (warm) HI hasarı, karaciğer transplantasyon cerrahisi sırasında veya şok veya travma sırasında *in situ* gelişir. Bu olay karaciğer veya çoklu organ yetmezliğine neden olabilir. Hepatik sinüzoidal endotel hücrelere zarar vererek veya mikrosirkülasyonu bozarak başlayaningin (cold) HI hasarı, *ex vivo* koruması sırasında meydana gelir ve genellikle karaciğer transplantasyon cerrahisi sırasında hızlı HI hasarı ile birliktedir. İki HI hasarı tipinin başlangıç selüler hedefleri farklı olmasına rağmen ilerleyen dönemlerde immün sistemi aktive ederek inflamasyona neden olurlar (Zhai ve ark., 2013).

4.2.2. İskemi/reperfüzyon hasarının patofizyolojisi

İskemi fazı sırasında, anaerobik metabolizma meydana gelir ve birçok hücresel fonksiyon için temel olan yüksek enerjili fosfatlar yeterli miktarda üretilmez. Yüksek enerjili fosfatların düşük değerleri, homeostaz, sinyal etkileşimleri, hücresel

proliferasyon ve apoptotik ölüm döngüsünün prosesi gibi hücresel fonksiyonların birçoğunu etkilemektedir.

Adenozin tri fosfat (ATP) deplesyonu, sodyum/potasyum ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) fonksiyonunu bozmaktadır. Ek olarak, iskemi sırasında ortaya çıkan toksik metabolitler, hücresel ödeme yol açmaktadır. Eğer iskemi 24 saatten daha fazla devam ederse, hücresel nekroza, apoptozise veya nöroapoptozise yol açan perfüzyondan sonra ATPsentaz aktivitesi irreversibl (geri dönüşümsüz) olarak inhibe edilir. İskemi ayrıca endotelial hücrelere adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonuna bağlı olarak nötrofil adezyonuna neden olur. Buna ek olarak, kan dolaşımının yeniden oluşmuş olmasına rağmen, NO ve ET arasındaki denge bozulur ve böylece vazokonstriksiyon ve ardından mikrosirkülatur yetmezlik görülür. Kan akışının yeniden oluşması üretilen mediyatörlerin miktarı (ör. ROT), endotelial ve nötrofil adezif cevapların derecesi ve Kupffer hücre aktivasyonunu artırarak hasarı geri dönüşümsüz hale getirmektedir (Şekil 1) (Siriussawakul ve ark., 2010).



Şekil 1: Çok yönlü hepatik/iskemi reperfüzyon hasarı. Kupffer ve endotel hücreleri sitokinleri ve kemokinleri üretir.

EC: Endotel hücre; KC: Kupffer hücre; ATP: Adenozintrifosfat; TNF: Tümör nekroz faktör; IL: İnterlökin; ICAM: Hücreler arası adezyon molekülü; VCAM: Vasküler adezyon molekülü; PAF: Platelet aktive edici faktör; LTB4: Lökotrien B4; GMS-CSF: Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör; INF: İnterferon; ROS: Reaktif oksijen türevleri (Siriussawakul ve ark., 2010)

4.2.3. Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında rol oynayan başlıca faktörler

- A. Hücreler:** Kupffer hücreleri, lökositler, trombositler ve endotel hücreleri
- B. Mediyatörler:** Sitokinler, reaktif oksijen metababolitleri, kompleman sistemi, ATP depleasyonu ve kalsiyum homeostazında bozukluk, pH paradoksu

A. Hücreler

4.2.3.1. Kupffer hücreleri:

Kupffer hücreleri, insan vücudunda bir arada bulunan en büyük makrofaj topluluğudur. Kupffer hücreleri karaciğer hasarında önemli bir yere sahiptir (Papadopoulos ve ark., 2013; Abu-Amara ve ark., 2010; Ilmakunnas, 2008). Hücreler iskemi fazında aktive olur ve reperfüzyon sırasında aktivasyonu artar (Abu-Amara ve ark., 2010). Ek olarak, reperfüzyon başlangıcında, Kupffer hücreleri, Toll benzeri reseptör 4 sinyali ile ve/veya tamamlanması ile daha ileriki aktivasyona maruz kalır. Aktive olmuş Kupffer hücreleri, lökosit aktivasyonu vasıtasıyla inflamatuvar hasarı devam ettirebilen TNF- α , IL1, IL6 ve prostoglandinler gibi proinflamatuvar sitokinleri, antiinflamatuvar mediyatörleri (IL10, IL13) ve ROT salıverir (Siriussawakul ve ark., 2010; Abu-Amara ve ark., 2010).

4.2.3.2. Lökositler ve lenfositler:

Lenfositler, genelde portal kanallar boyunca bulunmaktır. Bu lenfositler sınırlı çeşitlilik ile antijen reseptörlerini oluşturur, hücre membran glikoproteinlerini ve lipid bileşenlerini tanır ve hızlı sitokin üretimi ve sitotoksik aktivite sergiler.

Lenfositler, özellikle CD4+ T-hücreleri, reperfüzyon sonrası karaciğerde hızlıca toplanmaktadır. CD4+ T-hücreleri, ROT, Kupffer hücreleri tarafından salıverilen sitokinler ve kompleman faktörleri ile antijen sunumundan bağımsız olarak aktive edilebilmektedir. Bu T-hücreleri ayrıca iskemi sırasında aktive olan antijen üretim yeteneği olan sinüzoidal endotelial hücreler ve hepatik dendritik hücrelerin her ikisinden dolayı antijen bağımlı aktivasyona maruz kalabilir. Adaptasyon immün cevaplarının başlangıcına ek olarak, T-hücreleri hepatik nötrofil toplanmasını artırır, dolayısıyla doku hasarını güçlendirir (Ilmakunnas, 2008).

4.2.3.3. Trombositler:

Reperfüzyon esnasında trombositler hepatik sinüzoidlere çöker ve programlı endotelial hücre ölümünü indükler. Trombosit sentez ve salınımı ile ilgili birçok faktör HI hasarı ve rejenerasyonunda önemli rol oynar. Bunlar sitokinler, trasforming

büyüme faktörü- β gibi büyüme faktörleri, serotonin ve kalpaindir. Yapılan bir çalışmada, platelet kaynaklı serotoninin karaciğer iskemi sonrası doku onarımına yardımcı olduğu gösterilmiştir. İnsan trombositlerinin deagregasyon sonrası fibrinojenin integrine bağlanması ile kalpain aktivasyonu gerçekleşir. Kalpainin agregasyon sonrası cevapta önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir.

Ayrıca trombositler NO üretirler. Trombosit kaynaklı NO, endotel hücrelerin programlı ölümünün indüklenmesinde önemli bir rol oynayan peroksinitrit üretimine neden olur (Souza ve ark., 2000).

4.2.3.4. Endotel hücreler:

Bu hücrelerin hasarı Ca^{2+} -ATPaz vasıtasıylaingin (cold) iskemi sırasında başlar, intraselüler kalsiyumun birikimi ile sonuçlanır. Bu olayı takiben, bir seri olay endoteliumun platelet adhezyonuna daha fazla duyarlı olmasına ve azalmış sinüzoidal akışa neden olur.

B. Mediyatörler

4.2.3.5. Sitokinler:

Sitokinler, inflamatuvar cevabı indükleyerek ve HI hasarı ciddiyetini modüle ederek, HI hasarında hayati bir rol oynamaktadır. Tümör nekroz faktör- α ve interlökin-1 (IL-1) HI hasarında yaygın olarak bulunan iki sitokindir.

- **TNF- α :** İnsan TNF 1985’de klonlanmıştır (Bradley, 2008). Tümör nekroz faktör- α , nötrofiller, makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilirler (Bradley, 2008; Borish ve Steinke, 2003). Aktive makrofajlardan ve T hücrelerinden transmembran prekürsör proteini olarak sentezlenir. Tümör nekroz faktör- α , akut faz reaksiyonunu uyaran proinflamatuvar bir sitokindir (Kalfa ve Aksu, 2011). Akut travmaya cevap olarak TNF- α salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Yarı ömrü 15-18 dakika olmasına rağmen, TNF- α ’nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur (İlmakunnas, 2008).

Tümör nekroz faktör- α , reperfüzyonun 30. dakikasında serumda yükselir ve 8 saate kadar serumda bulunur (Datta ve ark., 2013).

Birçok hastalıkta inflamasyonun patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu indükler, tümör gelişimini ve viral replikasyonu engeller.

Tümör nekroz faktör- α , inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8) salınımını uyarır, bir seri kritik kemokinin artışına yol açar (MCP-1, MIP-2, RANTES, MIP-1 α) ve ayrıca endotel adezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin) güçlü bir aktivatörüdür. Tümör nekroz faktör- α , lökosit kemotaksisini ve aktivasyonunu modüle eder ve Kupffer hücrelerinde ROT üretimini indükler (Siriussawakul, 2010). Tümör nekroz faktör- α 'nın bu fonksiyonları, inflamatuvar reaksiyonlarla ilgili olayların başlamasını ve sürdürülmesini düzenler (Kalfa ve Aksu, 2011).

- **IL-1:** İnterlökin-1, öncelikle Kupffer hücrelerinde ayrıca endotel hücreleri, nötrofiller, epitelyal hücreler tarafından da sentezlenir. İnterlökin-1 üretimi, endotoksin, diğer sitokinler, mikroorganizmalar ve antijenler gibi birçok ajan tarafından stimüle ederek (Borish ve Steinke, 2003), TNF- α 'ya yanıt olarak salgılanır (Baykara, 2005). İnterlökin-1'in ROT üretimine katkıda bulunduğu ve nötrofil birikimine neden olduğu bilinmektedir (Siriussawakul, 2010).
- **IL-6:** İnterlökin-6, Kupffer hücreleri, monosit, lenfosit, fibroblastlar ve sinüzoidal endotel hücreleri tarafından sentezlenir (Baykara ve ark., 2005; Borish ve Steinke, 2003). İnterlökin-6, T-hücre aktivasyonu, büyümesi ve farklılaşmasını düzenler. Lenfosit aktivasyonuna ek olarak, IL-6 akut faz proteinlerinin üretiminin hepatosit sentezinin en önemli indükleyicisi olarak bilinir. Bu proinflamatuvar etkilerin aksine, IL-6 çeşitli antiinflamatuvar etkileri yönetir. İnterlökin-1 ve TNF- α birbirlerinin ve IL-6'nın sentezini indüklerken, IL-6 IL-1 ve TNF- α sentezini inhibe eder (Borish ve Steinke, 2003).

4.2.3.6. Reaktif oksijen türevleri ve reaktif nitrojen türevleri:

Reaktif oksijen türevleri, normal hücre fonksiyonları sonucunda endojen olarak ortaya çıkan moleküllerdir. Normal koşullar altında, moleküler oksijenin büyük bir kısmı hücre içi sitokrom oksidaz sistemi ile dört değerlikli indirgenmeye uğrayarak suya dönüşür. Ancak HI durumunda sadece bir elektron (é) transferi ile tek değerlikli indirgenme olur ve intraselüler hasarı destekleyebilen ROT ve reaktif nitrojen türevleri (RNT) oluşur (Siriussawakul ve ark, 2010; Baykara ve Tekmen, 2005). Oluşan bu ROT, proinflamatuar sitokinleri üreten Kupffer hücrelerini içeren diğer hücre dizilerini uyarmaktadır. Majör ROT, hidroksil radikali (OH.) ve hidrojen peroksittir (H₂O₂). Süperoksit (O₂) ile NO gibi ROT'nin reaksiyonları, peroksinitrit (ONOO⁻) gibi aşırı oksidatif olabilen bir RNT üretir (Siriussawakul ve ark, 2010).

4.2.3.7. Kompleman:

Kompleman sistemi de HI hasarına önemli ölçüde katkıda bulunur ve yaklaşık 30 çözünebilir ve membran bağlı proteinlerden oluşmaktadır. Bu sistem 3 yol ile uyarılmaktadır:

1. Antikor bağımlı klasik yol
2. Alternatif yol
3. Mannoz bağlı lektin yolu.

Aktive olduğunda kompleman proinflamatuar sitokinlerin ve kemotaktik ajanların üretimini uyarır ve buna ek olarak bağışıklığı düzenleyebilir (Siriussawakul ve ark., 2010).

Karaciğer Kupffer hücrelerinin ve nötrofillerin aktivasyonu, sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi, ROT'nin üretimi, adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonu HI hasarının her iki tipinde de bulunan immünolojik kaskadlardır (Zhai ve ark., 2013).

4.2.3.8. ATP depleasyonu ve kalsiyum homeostazında bozukluk

Kalsiyum, HI hasarında ilk etkilenen faktörlerden biridir. İskemi, intraselüler oksijen yokluğuna neden olan yetersiz kan akımı ve bunu takiben oksidatif

fosforilasyonda ve ATP oluşumunda azalma ile karakterizedir (Ilmakunnas, 2008). Adenozin tri fosfat seviyelerinde düşme, oksidatif fosforilasyonun sonlanmasında anahtar rol oynar (Nauta, 1990) ve intraselüler genişleme ve selüler kalsiyum homeostazında düzensizliği takiben hücre membran bütünlüğünde kayba neden olur. Kalsiyum düzeylerindeki artış, hücre membran yapısının bozulmasına ve apoptotik ve nekrotik yolların aktivasyonuna izin vererek intraselüler fosfolipaz ve proteazları aktive eder (Ilmakunnas, 2008).

Sıçanlarda oluşturulan HI modelinde, spesifik mitokondriyal kalsiyum geri alım inhibitörü kullanıldığında HI hasarının azaldığı gösterilmiştir (Anderson ve ark., 2005).

4.2.3.9. pH paradoksu

İskemi sırasında, karaciğer hücreleri ATP üretiminin yokluğundan dolayı yaşama kabiliyetini kaybedecektir. Ancak hipoksinin doğal olarak meydana getirdiği asidoz nekrotik hücre ölümünün başlangıcını geciktirmektedir. Reperfüzyon sonrası, doku pH'sı normalle döner ve asidozun koruması kaybolur. Bu nedenle reperfüzyon pH değerini normal seviyeye geri döndürdüğü için paradoksal olarak nekrotik hücre ölümünü hızlandırır. Hızlı (warm) ve yavaş (cold) iskemide sonrasında sırasıyla hepatositler ve endotel hücreler pH-bağımlı nekrotik hücre ölümüne duyarlıdır (Malhi ve ark., 2006).

4.2.4. Apoptoz ve nekroz

Apoptoz yüksek oranda programlanmış ve genetik olarak kontrol edilen hücre ölümüdür, uygun organogenezisden emin olmak için embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin sağlığı için gereklidir.

4.2.4.1. Apoptozun mekanizması

Apoptoz birçok farklı uyarıcı tarafından tetiklenebilmesine rağmen, hücrede apoptotik sinyal ana olarak belirlenen ölüm reseptör yolu (ekstrinsik yol olarak da adlandırılır) ve mitokondriyal yol (intrinsik yol olarak da adlandırılır) olmak üzere iki moleküler yol aracılığı ile uyarılır. İntrinsik ve ekstrinsik yolların her ikisinin

sonlanım noktası intraselüler proteazların (özellikle kaspazlar olarak adlandırılan proteolitik bir enzim grubu) ve sonuç olarak selüler bileşenleri degrade eden endonükleazların geniş çeşitliliği ile aktivasyonudur.

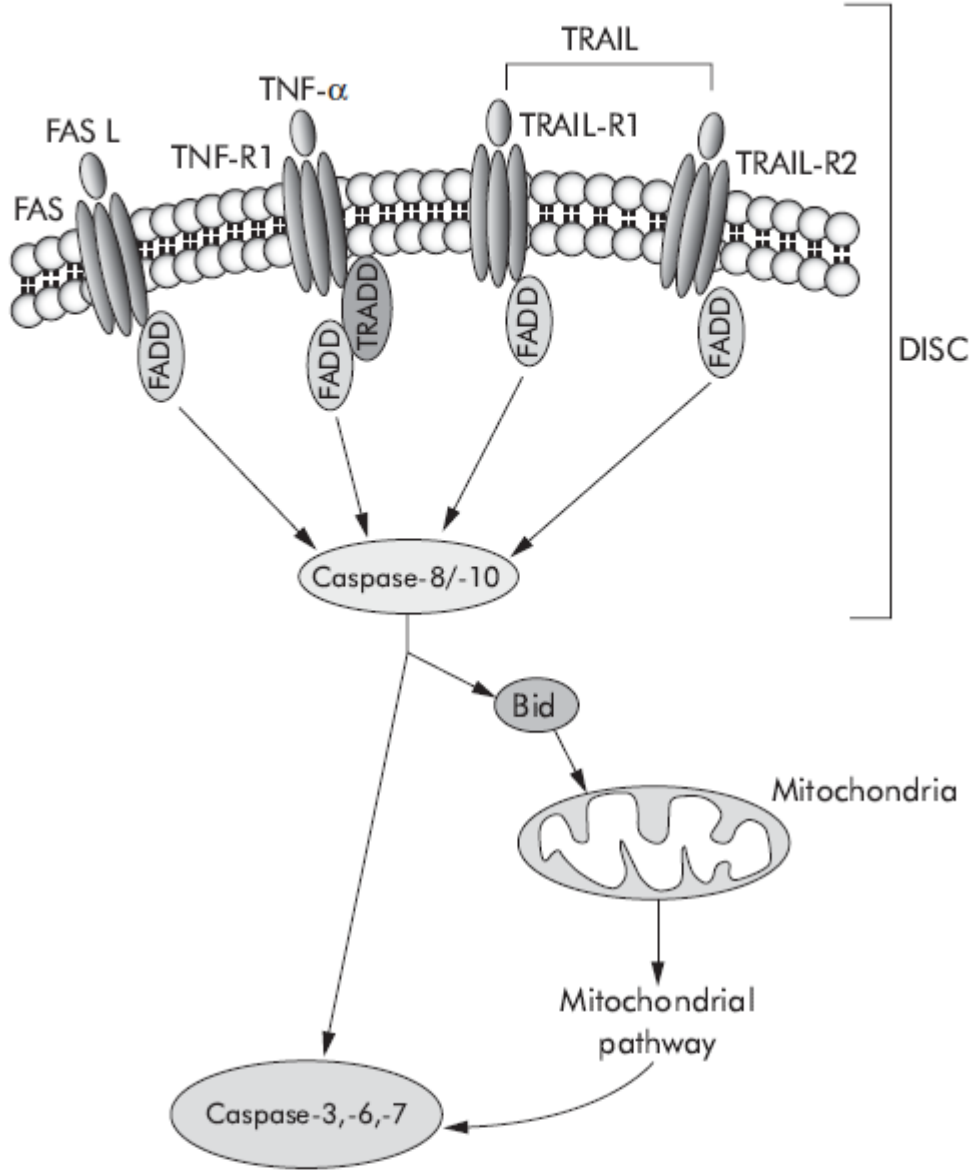
Ekstrinsik yol, aynı kökenli ligandları ile (TNF- α , Fas ligand (FasL)/CD95L, TRAIL) ölü reseptörler (tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNF-R1), Fas/CD95 ve ligand reseptör 1 ve 2 (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2)'yi de içeren apoptoz ilişkili tümör nekroz faktör gibi) olarak isimlendirilen sitokin reseptörlerinin bir ailesinin bağlantısını takiben plazma membranında başlamaktadır (Guicciardi ve Gores, 2005). Fas (CD95) reseptörü tümör nekroz faktörü/sinir büyüme faktörü (TNF/NGF) süperfamilyasının bir üyesidir. Fas reseptörü, ligandı FasL (CD95L) ile veya antikoru ile birlikte kaskad reaksiyonu boyunca kaspaz-3'ü aktive edebilir ve bu Fas'ı indükler ve hücrelerde apoptoz gerçekleşir (Li ve ark., 2003).

İntrinsik yol, γ -ışınlama, oksidatif stres, toksinler, ksenobiyotik metabolizmasının reaktif ara ürünleri, büyüme faktör yoksunluğu ve mitokondriyal disfonksiyonu indükleyen bazı kemoterapötik ilaçlar gibi farklı ekstra veya intraselüler sinyaller ile tetiklenmektedir.

Ölüm reseptörleri, özellikle Fas, hepatotropik virüsleri elimine etmek için evrimsel baskıya cevap olarak tüm karaciğer hücre tiplerinde yaygın olarak ekspres edilirler. Fas/FasL sistemi viral olarak enfekte olan hücreleri öldürmek için yaygın olarak kullanan bir yoldur. Hepatositlerde ölüm reseptörlerinin yüksek değerlerinden dolayı, karaciğerde apoptoz ana olarak ekstrinsik yol ile meydana gelir (Guicciardi ve Gores, 2005).

Reperfüzyon sırasında, TNF- α ve diğer mediyatörler sitoplazmaya salınan mitokondri sitokrom-C'nin yanı sıra proteaz kaspaz-3 ve kaspaz-8 gibi apoptozda yer alan proteinlerin birçoğunu aktive eder. Bu maddeler ile başlayan ardışık olaylar DNA harabiyetine ve hücre ölümüne neden olur (Şekil 2) (Montalvo-Jave ve ark., 2008).

Sirozlu sıçanlarda hepatik iskemi reperfüzyon hasarının indüklediği hepatosit apoptozunun çalışıldığı bir araştırmada, Fas-mRNA ekspresyonunun ve kaspaz-3 aktivitesinin uzayan karaciğer iskemisi zamanına bağlı olarak arttığı ve apoptotik hepatositlerin arttığı gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2003).



Şekil 2: Apoptozun ölüm reseptörü aracılı (ekstrinsik) yolu (Guicciardi ve Gores, 2005)

Ana ölüm reseptörleri (Tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNF-R1), Fas/CD95 ve ligand reseptör 1 ve 2 (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2)'yi de içeren apoptoz ilişkili tümör nekroz faktör) aracılığı ile sinyalin sistematik temsili.

Ölüm reseptörlerinin aynı kökenli ligandları ile birleşmesi, reseptörün oligomerizasyonu ve inaktif öncü kaspaz-8 ve/veya 10'a bağlanan adaptör proteinlerin (Ölüm domaini ile Fas bağlantılı protein (FADD), ölüm domain proteini ile bağlantılı TNF-R1 (TRADD)) toplanması ile sonuçlanır. Oluşan kompleks ölüm indüklenme sinyal kompleksi olarak isimlendirilir (DISC; Şekil 2). Çeşitli prokaspaz moleküllerinin yakınlığı, kendini işleme ile kaspazın aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Aktif öncü kaspazlar direkt olarak kaspaz-3, 6 ve 7 gibi grup içindeki kaspazları aktive eder veya sadece protein Bid'in ayrılması ve aktivasyonu ile mitokondriyal yolu kullanmaktadır.

4.2.5. Multidrug Resistance-Associated Protein-2

Çoklu ilaca direnç (multidrug resistance) genleri, P-gp gibi diğer ilaç effluks (dışa atım) pompalarını da kapsayan ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılar süper familyasında bulunmaktadır (Courtois ve ark., 1999). Multidrug Resistance-Associated Proteinler organik anyon taşıyıcılardır ve etki mekanizması açısından P-gp ilaç taşıma sistemine önemli derecede benzemektedir (Borst ve ark., 2000). P-glikoprotein gibi, MRP hidrofobik ilaçların bir kısmında dirence neden olabilir. Multidrug Resistance-Associated Protein, öncelikli olarak plazma membranında bulunmaktadır ve hücrelerde ilaç birikimini azaltabilir ve bu etki plazma membranının permeabilizasyonu ile ilişkilidir (Zaman ve ark., 1994; Borst ve ark., 2000). Multidrug Resistance-Associated Protein-2, amfipatik kimyasallar, ilaç konjugatları, lökotrien C4, prostaglandin ve bilirubin glukuronidleri gibi endojen maddeleri ve farklı bir substrat grubu taşır ve doku dağılımı ile birlikte eliminasyonun önemli bir belirleyicisidir (Kim ve ark., 2013).

Multidrug Resistance-Associated Protein-2, 190 kDa plazma membran fosfolipoprotein olup (Courtois ve ark., 1999), insanlar, köpekler, fareler, sıçanlar ve tavşanlar dahil bir çok türden klonlanmıştır. Multidrug Resistance-Associated Protein-2'nin yüksek ekspresyonu karaciğerde, bağırsakta ve böbrekte bulunurken, diğer dokularda ya çok az ya da hiç ekspresyon olmamaktadır. Köpekler, fareler ve sıçanlarda MRP2'nin doku dağılımı insanlarınki ile çok benzerdir, tek fark

köpeklerde böbrek ile karşılaştırıldığında karaciğerde MRP2 değerinin daha düşük olmasıdır (Dallas ve ark., 2006).

Multidrug Resistance-Associated Protein-2, safraya bilirubin glukuronidlerinin sekresyonu için sorumlu majör bir taşıyıcıdır (Cruz ve ark., 2010; Borst ve ark., 2000) ve aktivitesi plazma membranında insersiyon tarafından düzenlenmektedir. Fakat kontrol eden faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Kalsiyum sinyali birçok hücre tipinde veziküllerin ekzositozunu düzenlemektedir ve tip II inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü hepatositlerin kanaliküler bölgesinde Ca^{2+} salınımını düzenler. Yapılan bir çalışmada tip II inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü aracılı Ca^{2+} sinyalleri kanaliküler membrana MRP2'yi hedefleyerek safraya organik anyon sekresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir (Cruz ve ark., 2010). Multidrug Resistance-Associated Protein-2 eksikliği Dubin-Johnson sendromunda gözlemlenir (Kudo ve ark., 2012).

Yapılan son çalışma raporları, karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının sıçanların karaciğerinde MRP2 ve P-gp gen ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Çünkü her iki taşıyıcı da ilaçların birçoğunun safraya atılımında önemli bir rol oynamaktadır ve bu ilaçların farmakokinetikleri HI hasarından sonra önemli derecede değişebilir. Yapılan bir çalışma sonucu, HI hasarını takiben P-gp ve MRP2'nin fonksiyonel aktivitesinde azalmaya işaret etmektedir (Parasrampur ve ark., 2012).

4.3. St. John's Wort

M.Ö. 5. yüzyılda Yunan doktor Hippocrates, St. John's Wort'un terapötik kullanımını belirtmiş, Yunanlar ve Romalılar sinir sistemi ile ilişkili hastalıkların tedavisinde tıbbi amaçlı kullanımını doküman etmiştir (<http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/SJW.pdf?docID=168>; Lawvere ve ark., 2005).

St. John's Wort, Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'da doğal olarak yetişmekte ve Kuzey ve Güney Amerika ve Avustralya'da yetiştirilmekte olup, sarı renkli çiçekli pereniyal bir bitkidir (Linde, 2009; Csurhes ve Zhou, 2008). St. John's

Wort'te ki büyüme bölgeleri mevsime göre değişiklik göstermektedir. Sonbahar ve kışın, bitki yassı olup gövdeleri çok zayıf ve uzun, yaprakların rengi ise mattır. İlkbahar ve yazın ise bitki diktir, gövdesi 30-120 cm uzunluğunda ve odunsudur (Csurhes ve Zhou, 2008).

Türkiye'de yöresel olarak Binbirdelik otu, Kan otu, Kılıç otu, Mayasıl otu, Yara otu ve Kuzu kıran olarak bilinmektedir (Hışıl ve ark., 2005). Yaygın ismi olan SJW, St. John's gününde (24 Haziran) geleneksel çiçeklenmesi ve mahsul toplanmasından gelmektedir. *Hypericum* cinsi *Clusiaceaceae* ailesinde bulunmaktadır ve yaklaşık 370 tür içermektedir. '*Hyper-icum*' kelimesi Yunanca hyper (yukarı) ve eikon (resim)'den gelmektedir, kötülük gücüne sahip olan tanrıların resimleri üzerinde bulunan bir bitki olarak kullanımı gösterilmektedir. '*Perforatum*' kelimesi ise perforasyon benzeri yapraklarda küçük yağ bezlerinin bulunmasına işaret etmek için kullanılmıştır. Eğer sarı petaller kırılırsa, bu yağ bezlerinden koyu kırmızı yağ meydana gelmektedir. St. John's Wort, Avrupa'daki en eski tıbbi bitkidir (Linde, 2009).

4.3.1. Bioaktif bileşenleri:

St. John's Wort, biyolojik olarak en az 10 sınıf bileşik içermektedir. Bu bileşikler, bitkiden bitkiye değişen konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu değişiklik için çeşitli nedenler vardır, bunlar; türler içinde ve/veya adulterasyondaki genetik varyasyon, ekolojik büyüme koşulları, harman zamanı, materyalin hazırlanması ve işlenmesi ve ışığa maruziyettir. Bu varyasyonlara rağmen, belirli bitki ekstresinin yaklaşık %20'si standart biyoanalitik teknikler ile doğrulanmış olan biyoaktif bileşiklerden oluşmaktadır. Çok sayıda flavonoid bileşikleri (hiperisid, kuersitrin, izokuersitrin, rutin, kuersetin, kamferol, luteolin ve mirisetin) ve ayrıca biflavonoidler (I3, II8-biapigenin ve I3',II-biapigenin (amentoflavon)) yapraklar, sap, çiçekler ve tomurcuklar gibi bitkinin toprak üstü kısımlarında bulunmaktadır. Floroglusinol bileşikleri (hiperforin ve ahiperforin) çiçeklerde ve tomurcuklarda prosiyanidinler, tanenler, koumadinler, amino asitler, fenilpropanlar ve diğer bileşenler ise bitkinin tüm kısımlarında bulunmaktadır (Tablo 2) (Greeson ve ark., 2001).

Tablo 2. *Hypericum perforatum*'da bulunan biyolojik olarak saptanabilen bileşikler (Greenson ve ark., 2000)

Biyokimyasal sınıf	%Taze bitki ^a	Aktif bileşik	% Taze bitki ^a
Naftodiantronlar	0.03-3.0 (Çiçekler/tomurcuklar)	Hiperisin	0.09
		Psödohiperisin	0.23
Floroglusinoller	2-5 (Çiçekler/tomurcuklar)	Hiperforin	2.0-4.5
		Adhiperforin	0.2-1.8
Flavonoidler	12 (Yapraklar) 7 (Sap) 2-4 (Tomurcuklar)	Kuersetin	2.0
		Hiperosit	0.7
		Kuersitrin	0.5
		İzokuersitrin	0.3
		Rutin	0.3
		Kamferol	TE
		Mirisetin	TE
		Amentoflavon	0.01-0.05
		I3, II8-Biapigenin	0.10-0.50
Prosiyanidinler	12 (Hava alan bölümler) 8 (Çiçekler/tomurcuklar)	Prosiyanidin	TE
		Kateşin	TE
		Epikateşin polimerleri	TE
Tanenler	6-15	Tannik asit	TE
Esansiyel yağ	0.06-1.0 (Çiçekler/yapraklar)	Terpenler, alkoller	TE
Aminoasitler	0.01	GABA	0.0007
		Sistein	TE
		Glutaim	TE
		Lösin	TE
		Lisin	TE
		Ornitin	TE
		Prolin	TE
		Treonin	TE
Fenilpropanlar	0.1	Kafeik asit	0.1
		Klorogenik asit	<0.1
Ksantonlar	0.01 (Köklerde) 0.0004 (Yapraklar/gövde)	Kielkorin, noratriol	TE
Diğer suda çözünebilen bileşikler	0.5	Organik asitler, peptitler, polisakkaritler	TE

TE: Tespit Edilemedi; GABA: Gama Amino Butirik Asit

4.3.2. St. John's Wort'da bulunan bileşiklerin enzim indüklenme etkileri:

İlaç metabolizmasındaki enzim indüksiyonundan sorumlu bileşikler sistematik olarak çalışılmamıştır. Bu durum, hangi spesifik ekstrenin enzim indüksiyonundan

sorumlu olduğunu değerlendirmenin zor olmasından kaynaklanmaktadır. Klinik olarak, SJW ile ilgili önemli farmakokinetik ve farmakodinamik etkileşimlerin birçoğu tanımlanmıştır. Tanımlanan etkileşimlerin ve olası metabolizmalarının detayları Tablo 3’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3: St. John’s Wort ile olası farmakokinetik ve farmakodinamik etkileşimler (Henderson ve ark., 2002)

İlaç	Etkileşimin olası mekanizması
<i>Farmakokinetik etkileşimler</i>	
Varfarin ve fenpropakumon	CYP2C9’un indüksiyonu
Siklosporin	CYP3A4’ün ve transport protein P-gp’in indüksiyonu
Oral kontraseptifler	CYP1A2 ve CYP3A4’ün indüksiyonu
Teofilin	CYP1A2’nin indüksiyonu
Digoksin	Transport protein P-gp’in indüksiyonu
HIV proteaz inhibitörleri	CYP3A4’ün indüksiyonu
HIV non-nükleozid reverstranskriptaz inhibitörleri	CYP3A4’ün indüksiyonu
Antikonvülsanlar (karbamazepin, fenobarbiton ve fenitoin)	CYP3A4’ün indüksiyonu
<i>Farmakodinamik etkileşimler</i>	
Selektifserotonin re-uptake inhibitörleri	Serotonin konsantrasyonunun potansiyalizasyonu
Triptanlar	Serotonin konsantrasyonunun potansiyalizasyonu

4.3.3. Serotonin sendromu

St. John’s Wort, serotonin düzeylerini Santral Sinir Sistemi’nde (SSS) yükselten diğer ilaçlar ile birlikte kullanıldığında “Serotonin Sendromu”na neden olabilir. Serotonin sendromunun belirtileri Tablo 4’te gösterilmiştir (Ables ve Nagubilli, 2010; Isbister ve ark., 2007; Hall ve ark., 2003).

Tablo 4: Serotonin sendromunun belirtileri

Nöromusküler semptomlar	Otonomik semptomlar	Mental durum semptomları
• Hiperrefleksi • Klonüs • Miyoklonüs • Titreme • Hipertoni/kas sertliği	• Hipertermi: ◦ Orta derece $<38.5^{\circ}\text{C}$ ◦ Ciddi $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ • Taşikardi • Diaforez • Flushing • Midriyazis	• Ajitasyon • Hipomani • Anksiyete • Konfüzyon

4.3.4. St. John's Wort'un Sitokrom P450 enzimleri ve P-glikoprotein üzerine etkileri

Sitokrom P450 (CYP) enzimleri, insanlarda ilaç etkileşimlerinin yaygın bölgeleridir. İlaçlar, ikinci bir ilacın değişmiş klerensine yol açarak, CYP enzimlerinin inhibitörleri veya indükleyicileri olarak etki edebilir. Preklinik ve klinik çalışmaların yanı sıra hayvan çalışmalarından elde edilen güçlü kanıtlar SJW'nin CYP aktivitesini modüle edebileceğini göstermektedir. İyi bilinen araştırma ilaçları (ör: CYP3A4 için alprazolam ve midazolam, CYP1A2 için kafein, CYP2E1 için klorzoksazon, CYP2D6 için dekstrometorfan ve debrisoquin, CYP2C9 için tolbutamid ve CYP2C19 için omeprazol) kullanılarak yürütülen klinik çalışmalar SJW'nin CYP3A4, CYP2E1 ve CYP2C19'u indüklediği ve CYP1A2, CYP2D6 veya CYP2C9 üzerinde etki etmediğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar ayrıca SJW'nin sadece kadınlarda CYP1A2'yi indüklediğini ileri sürse de yapılan *in vitro* çalışmalar, hiperisinin CYP1A2'nin aktivitesini indükleyebileceğini ve hiperforinin ise CYP3A4'ün aktivitesini indükleyebileceğini göstermektedir.

İnsanlarda klinik olarak en önemli transmembran taşıyıcılarından biri olan P-gp ABCB1/MDR1 geni tarafından kodlanmaktadır. P-glikoprotein, intestinal epitel hücreler, safra kanalcıkları, renal tübüler hücreler ve plasentanın apikal yüzeylerinde ve beyin ve testislerde kapiller endotel hücrelerin luminal yüzeylerinde bulunmaktadır. P-glikoproteinin spesifik lokalizasyon ilaç eliminasyonu ve absorpsiyonunda aktif bir role sahip olduğunu göstermektedir. St. John's Wort'un sağlıklı gönüllülerde insan bağırsağının yanı sıra intestinal izole edilmiş hücrelerde

de P-gp ekspresyonunu indüklediğini gösterilmiştir. Dolayısı ile SJW'nin digoksin, feksofenadin ve talinololün bulunduğu iyi bilinen P-gp substratlarının daha düşük plazma konsantrasyonları neden olduğu gösterilmiştir.

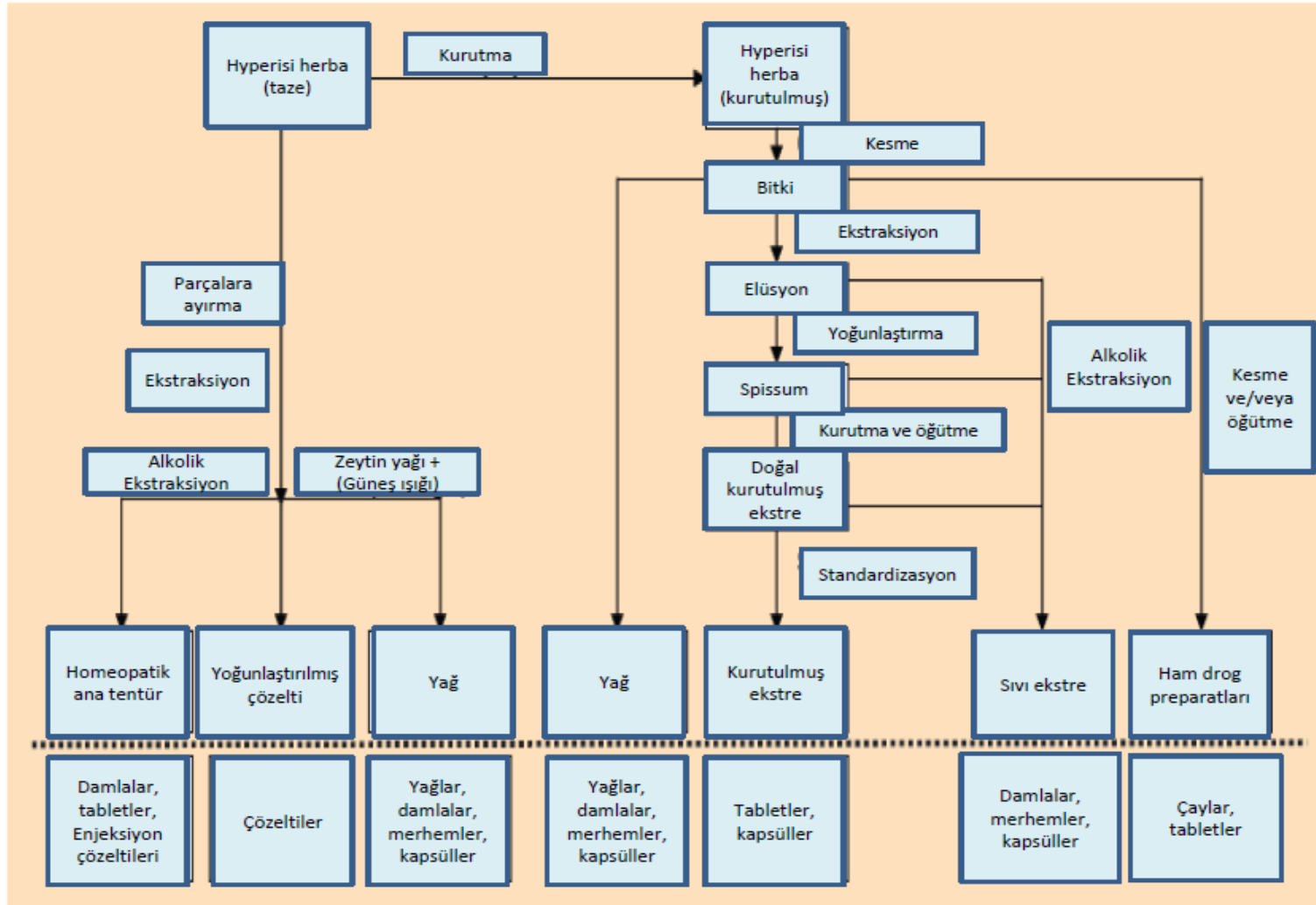
St. John's Wort'un P-gp veya CYP enzimleri üzerine etkisi genellikle uzun tedavi (10 gün veya daha fazla) sonrası gözlemlenmektedir; tek doz SJW uygulanmasını takiben çalışmalarda hiçbir etki raporlanmamıştır. Ek olarak, CYP3A4 ve P-gp indüksiyonu kapsamının, beyaz ırk, Afrikalı, Amerikalı, İspanyol, Çinli, Hindistanlı ve Malezyalıları içeren etnik gruplar arasında karşılaştırılabilir olduğu bulunmuştur (Borrelli ve Izzo, 2009).

4.3.5. Yan etkiler

Tüm ilaçlar gibi SJW ürünleri içeriğinde bulunan maddelere duyarlı olan kişilerde yan etkiler olabilir. Yan etkiler yaygın değildir (<http://www.medicines.org.uk/emcmobile/medicine/23809/pil>).

Tablo 5: St. John's Wort'un yan etkileri

Yaygın olmayan yan etkiler ($\geq 1/1.000$ ila $< 1/100$)
Sindirim sistemi bozuklukları Hazımsızlık, iştahsızlık, mide bulantısı, diyare, konstipasyon
Yorgunluk
Alerjik deri reaksiyonları Döküntü, ürtiker veya kaşıntı
Diğer seyrek yan etkiler Baş ağrısı, sinir ağrısı veya karıncalanma (nöropati), anksiyete, sersemlik, mani Ayrıca, kuvvetli ultraviyole (UV) radyasyona (ör. güneş, solaryum) maruz kalma ile deride güneş yanığı benzeri reaksiyonlar raporlanmıştır (özellikle sarışınlarda).



Şekil 3. *Hypericum perforatum*'un farklı ürünlerinin üretim şeması (Linde, 2009)

4.3.6. St. John's Wort'un geleneksel ve güncel kullanım alanları

Geleneksel olarak SJW, dünyada sinir ağrısı, malarya, viral ve antibakteriyel enfeksiyonları gibi pek çok sağlık koşulunun tedavisi için; yaralar, yanıklar ve böcek ısırıkları için topikal olarak; ve sedatif, anksiyolitik ve antidepresan olarak dahilen kullanılmaktadır. Ayrıca SJW astrejan ve antiinflamatuvar ajan olarak ve stres azaltımı, bağışıklık sistemi destekleyicisi ve menopoza semptomları için kullanılmaktadır (Choudhuri ve Valerio, 2005).

St. John's Wort ekstreleri, depresif rahatsızlıkların tedavisi için 2000 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır, plasebodan daha etkilidir ve hafif ve orta düzeydeki depresyonların tedavisinde standart antidepresanlara benzer etkili olabilmektedir. 2003'de reçete edilen 100 milyondan fazla günlük dozu kullanan popülasyon sonuçlarına göre, yan etkileri standart antidepresanlara göre genellikle minör ve azdır. St. John's Wort'un antidepresif etkilerinin, serotonin, noradrenalin ve dopaminin uptake'ni inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Armbrust ve ark., 2007).

Avrupa'da, SJW depresyonun tedavisi için güncel olarak reçetelenmektedir ve Alman Komisyon E tarafından 1984'den bu yana depresif ruh hali için onaylıdır (Şekil 3) (Choudhuri ve Valerio, 2005).

St. John's Wort'un geleneksel olarak depresyonun tedavisinde kullanılmasına rağmen, depresyona karşı etki mekanizması net olarak açıklanamamıştır. St. John's Wort'un etkisinin moleküler mekanizması, karaciğerde net ve ölçülebilir bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Etik Kurulundan alınan 18.11.2013 tarihli ve 95.2013.mar protokol kodlu izin ile gerçekleştirildi. Sıçanlar aynı laboratuvarından temin edildi ve deney aynı laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen toplam 32 adet Rattus türü Norvecicus cinsi Wistar albino suşu on haftalık dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 8 adet olmak üzere rastlantısal olarak 4 gruba ayrıldı ve her kafeste 4 sıçan olacak şekilde standart laboratuvar şartlarında (20-24°C sıcaklık, %50-60 nem oranı; 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık siklusu) tel kafesler içinde muhafaza edildi ve tüm deney periyodu boyunca musluk suyu ve standart sıçan yemi serbest bırakıldı. Çalışma boyunca enteral ve parenteral antibiyotik kullanılmadı.

5.1. Anestezi

Her sıçan indüksiyon amaçlı eter içeren kavanoz içinde 40-60 saniye süreli tutuldu. İndüksiyon anestezi sonrasında idame anestezi amaçlı ketamin (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı-İstanbul) 100 mg/kg dozundan intraperitoneal (ip), klorpromazin (Largactil, Eczacıbaşı-İstanbul) 1 mg/kg dozundan intraperitoneal (ip) olarak uygulandı.

5.2. Operasyon

Çalışmamızda Wistar albino sıçanlarda anestezi altında sırtları üzerine yatırıldı. Abdominal ön duvar bistüri ile tıraş edildi. Tıraş edilmiş olan alan povidon iyot solüsyonu (Betadine, Kurtsan Co.) ile sterilize edildi. Sonrasında orta hat insizyonu ile batına girildi. Hepatik arter, portal ven ve safra kanalı eksplore edildi ve 45 dakika süreyle klempe edilerek iskemi periyodu oluşturuldu. Bu sürenin sonunda reperfüzyona bırakılan sıçanlar 60 dakika sonra dekapite edildi. St. John's Wort (300 mg/kg, p.o.) ya da SF uygulamaları iskemiden önce 3 gün günde tek doz ve iskemiden 30 dakika önce peroral olarak uygulandı. Kontrol grubu sıçanlara sham operasyonu ve serum fizyolojik uygulaması yapıldı.

5.3. Gruplar

1- Kontrol (Sham opere-K) Grubu: Standart operasyon yapıldıktan sonra hepatik arter, portal ven, safra yolları klempe edilmeden ve başka bir işlem yapılmadan 60 dakika sonra 2 cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.

2- St. John's wort (SJW) Grubu: Sıçanlara sham operasyon işlemi yapılacak günden önce 3 gün günde tek doz ve sham operasyon anından 30 dakika önce 300 mg/kg dozunda olacak şekilde SJW (SOLGAR) peroral olarak verildi.

3- Hepatik İskemi Reperfüzyon (HI) Grubu: Sıçanlara hepatik iskemi işlemi yapılacak günden önce 3 gün günde tek doz ve iskemiden 30 dakika önce serum fizyolojik peroral olarak verildi. Standart operasyon yapıldıktan sonra hepatik arter, portal ven ve safra yolları vasküler klempe edilerek iskemi oluşturuldu. Sıçanlar sadece 45 dakika iskemi ve sonrasında 60 dakika reperfüzyona tabi tutuldu. Reperfüzyon süresi sonunda kalpten 2 cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.

4- St. John's wort verilen Hepatik İskemi Reperfüzyon (HI-SJW) Grubu: Sıçanlara hepatik iskemi işlemi yapılacak günden önce 3 gün günde tek doz ve iskemi anından 30 dakika önce olacak şekilde SJW 300 mg/kg dozunda peroral olarak verildi. Sıçanlar sadece 45 dakika iskemi ve sonrasında 60 dakika reperfüzyona tabi tutuldu. Reperfüzyon süresi sonunda dekapite edilen sıçanlardan 2 cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı. Rezekte edilen karaciğer dokuları soğuk %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra biyokimyasal araştırmalar için alüminyum folyo içine sarılarak -80 °C'de muhafaza edildi. Histolojik incelemeler için de örnekler formol içine alındı. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra MDA, MPO ve GSH düzeyleri ile, Bcl-2/Bax oranı, Na⁺K⁺-ATPaz, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri incelendi. Formol içine alınan örneklerde yapısal hasar değerlendirilip, immünohistokimyasal boyalarla P-gp ve MRP-2 varlığı saptandı. Alınan kan örneği 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma -80°C'de muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β seviyeleri ölçüldü.

5.4. Biyokimya

Serumda Yapılan İncelemeler

5.4.1. Karaciğer fonksiyon testleri

Serumda aspartat amino transferaz, (Biolabo Europe S.A. Catalog No: REF 92025, 02160 Maizy, France), alanin aminotransferaz (Biolabo Europe S.A. Catalog No: REF 80027, 02160 Maizy, France) tayini kinetik spektrofotometrik bir yöntem olup, Opera Technican Bayer Autoanalyzer cihazında ölçümü yapıldı.

Deneyin Yapılışı

1 ml reaktif, termostatl küvete konuldu ve sıcaklık 37°C'e getirildi. 100 µl örnek eklendi. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbans okundu, 3 dakika boyunca her dakikada okunan absorbans kaydedildi ve her dakika değişen absorbans değerleri hesaplandı.

5.4.2. Tümör nekroz faktör-  tayini

Serumda TNF-  tayini, ELISA yöntemi ile (BioSource Europe S.A. Catalog No.KRC 3014, Nivelles, Belgium) rat kiti kullanılarak ölçüldü.

Deneyin Yapılışı

1. Boř ELISA kuyularına 50 µl inkübasyon tamponu konu.
2. Standart ve kontrollerin hepsi sulandırıldı.
3. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standardı dilüe etmek için;

1. tüpe 400 µl standart seyreltici tampon + 100 µl hazırlanan standarttan konu.
- 2.tüpe: 1. tüpten 250 µl + 250 µl standart seyreltici tampon
3. tüpe: 2. tüpten 250 µl + 250 µl standart seyreltici tampon
4. tüpe: 3. tüpten 250 µl + 250 µl standart seyreltici tampon
5. tüpe: 4. tüpten 250 µl + 250 µl standart seyreltici tampon
6. tüpe: 5. tüpten 250 µl + 250 µl standart seyreltici tampon
7. t p: Sadece 250 µl standart seyreltici tampon
8. t p: 100 µl yüksek kontrol

9. tüp: 100 µl düşük kontrol
10. tüpten itibaren örnekler hazırlandı. Bunun için 100 µl serum +100 µl standart seyreltici tampon kondu.
4. ELISA kuyularındaki 50 µl'lik inkübasyon tamponun üzerine yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er µl ilave edildi. Toplam ELISA kuyularındaki çözelti miktarı 150 µl idi.
5. Üzerine 50 µl Biotin konjugatı eklendi.
6. 1,5 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
7. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü (Yıkama solüsyonunun hazırlanması: 4 ml yıkama tamponundan alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı).
8. Üzerine 100 µl Streptavidin HRP solüsyonu eklendi (Streptavidin HRP solüsyonunun hazırlanması: Her 8'lik strip için 10 µl streptavidin HRP'den alındı ve üzerine 1 ml streptavidin HRP seyreltici eklendi).
9. 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
10. Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü.
11. 100 µl stabilize kromojen eklendi.
12. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
13. 100 µl son çözelti eklendi.
14. 450 nm'de ELISA'da okundu.

5.4.3. İnterlökin- 1β tayini

Serumda IL-1β (ELISA, BioSource Catalog No.KRC0011, Nivelles, Belgium) tayini için uygun kitler kullanılarak talimatlara uygun olarak ölçümler yapıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Standart ve kontrollerin hepsi sulandırıldı.
2. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standartı dilüe etmek için;

1. tüpe 480 µl standart seyreltici tampon + 120 µl hazırlanan standarttan kondu.
- 2.tüpe: 1. tüpten 300 µl + 300 µl standart seyreltici tampon

3. tüpe: 2. tüpten 300 µl + 300 µl standart seyreltici tampon
4. tüpe: 3. tüpten 300 µl + 300 µl standart seyreltici tampon
5. tüpe: 4. tüpten 300 µl + 300 µl standart seyreltici tampon
6. tüpe: 5. tüpten 300 µl + 300 µl standart seyreltici tampon
7. tüp: Sadece 300 µl standart seyreltici tampon
8. tüp: 100 µl yüksek kontrol
9. tüp: 100 µl düşük kontrol
10. tüpten itibaren örnekler hazırlandı. Bunun için 100 µl serum +100 µl standart seyreltici tampon kondu.
3. ELISA kuyularına yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er µl ilave edildi. Toplam ELISA kuyularındaki çözelti miktarı 100 µl idi.
4. 3 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
5. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü (Yıkama solüsyonunun hazırlanması: 4 ml yıkama tamponundan alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı).
6. Üzerine 100 µl Biotin konjugatı eklendi.
7. 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
8. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü.
9. Üzerine 100 µl Streptavidin HRP solüsyonu eklendi (Streptavidin HRP solüsyonunun hazırlanması: Her 8'lik strip için 10 µl streptavidin HRP'den alındı ve üzerine 1 ml streptavidin HRP seyreltici eklendi).
10. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
11. Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü.
12. 100 µl stabilize kromojen eklendi.
13. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
14. 100 µl son çözelti eklendi.
15. 450 nm'de ELISA'da okundu.

Dokuda Yapılan İncelemeler:

5.4.4. Malondialdehit tayini

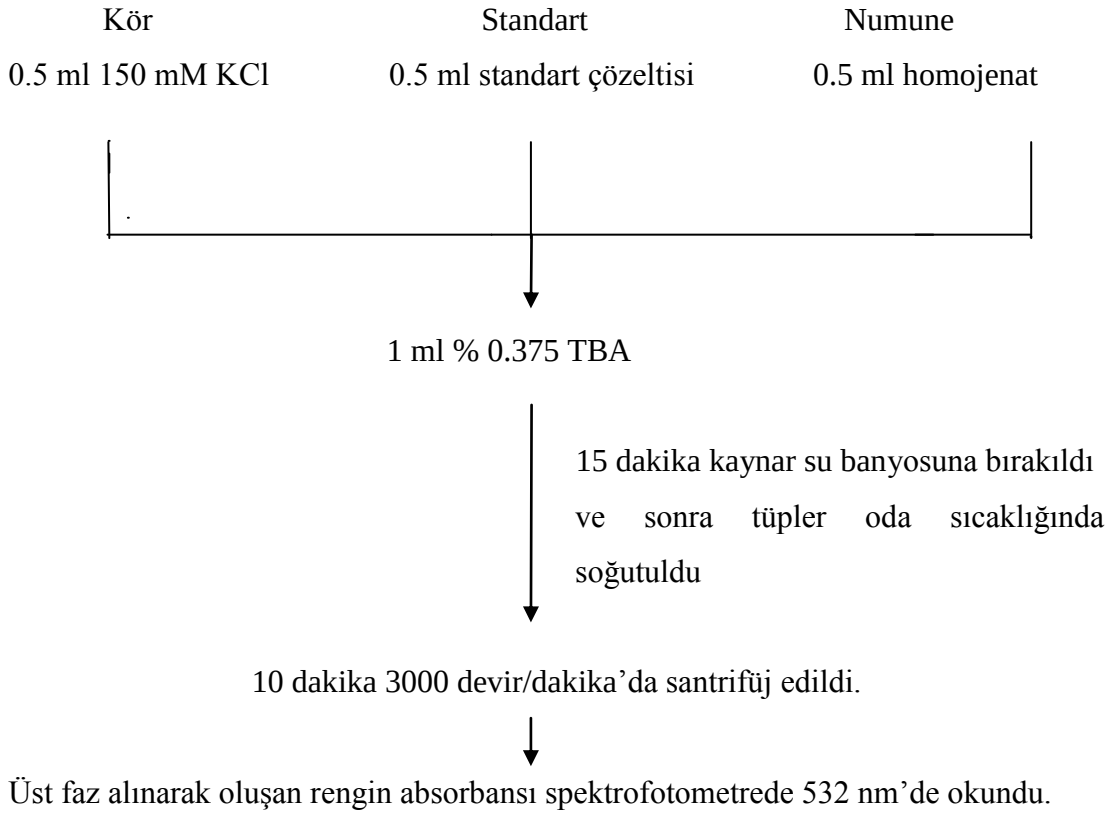
Dokuda MDA tayini, Beuge yöntemine göre yapıldı. Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu ve tartıldı. Ika Werk homojenizatöründe buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle %10'luk homojenatı hazırlandı.

Gerekli Çözeltiler

Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: % 0.375 g TBA ve % 15'lik trikloroasetik asit (TCA) içeren çözelti, 0.25 N HCl ile hazırlandı.

Standart Çözeltisi: 1,1,3,3 tetraetoksipropan'ın 10 mM'lık stok çözeltisinden farklı seyreltmeler yapılarak çalışıldı.

Deneyin Yapılışı:



5.4.5. Glutasyon tayini:

Dokuda GSH tayini, Beutler yöntemine göre yapıldı. Glutasyon tayininde MDA tayini için hazırlanan % 10'luk homojenatlar kullanıldı.

Gerekli Çözeltiler:

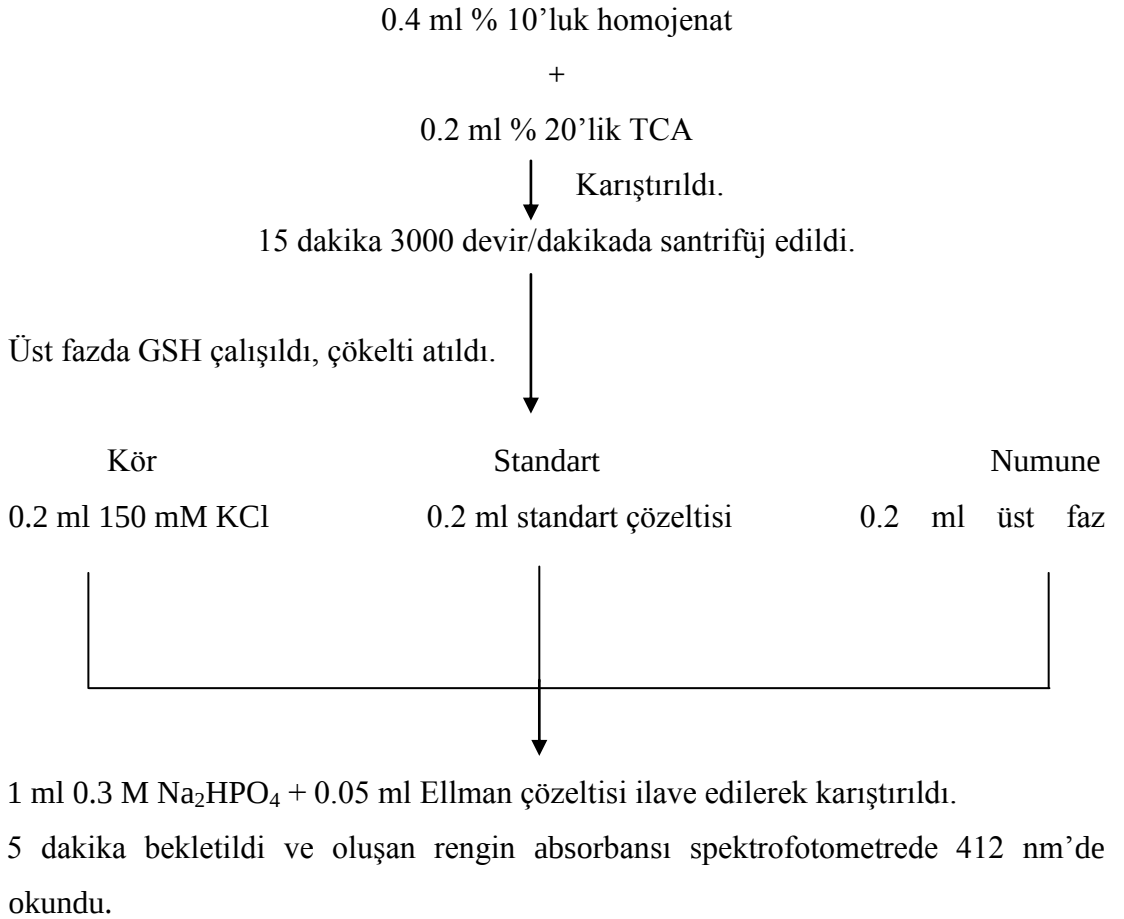
0,3 M Na₂HPO₄

10 mM Ditiyo nitro benzen (DTNB), Ellman: 39.63 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat ile 10 ml'ye tamamlandı.

% 20'lik TCA

Standart GSH Çözeltisi: 50 mg GSH distile suda çözüldü, 5 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:



5.4.6. Myeloperoksidaz aktivitesi tayini:

Dokuda MPO tayini, Hillegeas yöntemi ile yapıldı. Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan dokular, kan ve çevre artıklarından temizlenmesi için serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu ve ağırlıkları alındı. Karaciğer dokusu 50 mM K₂HPO₄ (pH 6) ile homojenize edildi. %10'luk homojenat hazırlandı.

Gerekli çözeltiler

50 mM K₂HPO₄ (pH 6)

% 0.5'lik Hekzadesiltrimetil-amonyum bromid (HETAB): 0.5 g HETAB, 50 mM K₂HPO₄ ile çözüldü. pH 6'ya ayarlandı ve hacmi 50 mM K₂HPO₄ ile 1 litreye tamamlandı.

o-Dianizidin-2 HCl: 100 mg o-Dianizidin-2HCl distile suda çözülerek hacmi 5 ml'ye distile su ile tamamlandı.

%2'lik sodyum azid

20 mM H₂O₂ (Hidrojen peroksit)

Deneyin Yapılışı:

3 ml %10 luk karaciğer homojenatı

↓ 41400 g de 4 °C lik sıcaklıkta 10 dakika santrifüj edildi.

Üst faz atıldı, çökelti + 3 ml % 0.5'lik HETAB

↓ Homojenizasyon

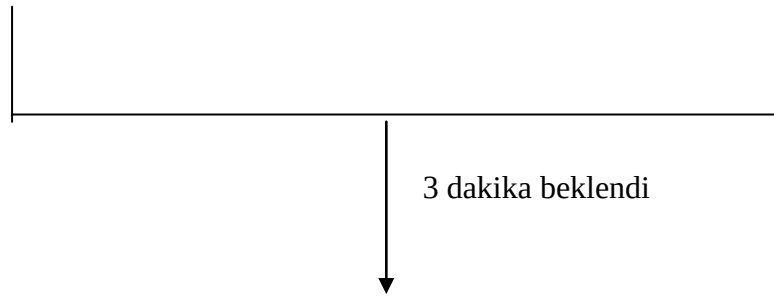
3 kez donduruldu – çözündürüldü – sonike edildi.

↓ 41400 g de 4 °C lik sıcaklıkta 10 dakika santrifüj edildi.

0.3 ml üst faz ile çalışıldı

Bu aşamadan sonraki işlemler 37 °C lik su banyosunda yapıldı.

Kör	Numune
2.9 ml 50 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6)	2.9 ml 50 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6)
0.2 ml 20 mM H ₂ O ₂	0.2 ml 20 mM H ₂ O ₂
0.2 ml o-Dianizidin-2 HCl	0.2 ml o-Dianizidin-2 HCl
0.3 ml 50 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6)	0.3 ml üst faz



0.2 ml %2'lik sodyum azid ile renk reaksiyonu durduruldu.

37°C'lik su banyosundan alındı, karıştırıldı.

Oda sıcaklığında bekletildi.

3000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi.



Üst faz alınarak oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 460 nm de okundu.

5.4.7. Dokuda Na⁺ K⁺-ATPaz aktivitesi tayini

Dokuda Na⁺ K⁺-ATPaz aktivitesi tayini, Soltoff ve Mandel yöntemi ile yapıldı. Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan karaciğerler, kan ve çevre artıklarından temizlenmesi için serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu ve ağırlıkları alındı. Karaciğer dokusu 0.32 M sukroz çözeltisi ile homojenize edildi. %10'luk homojenat hazırlandı. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

Deneyin Yapılışı:

	<u>KÖR</u>	<u>TOTAL ATPaz</u>	<u>Mg⁺²-ATPaz</u>
A çözeltisi	0.75 ml	0.75 ml	-
B çözeltisi	-	-	0.75 ml
Ouabain	-	-	0.5 ml
Distile su	0.5 ml	0.5 ml	-
Üst faz	0.1 ml	0.1 ml Distile su	0.1 ml

37 °C’de 5 dk inkübasyon

ATP	0.1 ml	0.1 ml	0.1ml
-----	--------	--------	-------

37 °C’de 10 dk inkübasyon

TCA	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
-----	--------	--------	--------

Fosfor Tayini

<u>Std Körü</u>	<u>Std</u>	<u>Num, körü</u>	<u>Total ATPaz</u>	<u>Mg-ATPaz</u>
0.5 ml TCA	0.5 ml std.	0.5 ml üst faz	0.5 ml üst faz	0.5 ml üstfaz
çalışma çözeltisi				

1 ml amonyum molibdat çözeltisi
0.4 ml Fiske-subbarow çözeltisi
3.1 ml distile su

5 dakika bekletildi.

Spektrofotometrede 690 nm’de okundu.

Protein Tayini

Deneyin Yapılışı:

<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>Numune</u>
0.5 ml serum fizyolojik	0.5 ml standart protein çöz.	0.01 ml karaciğer homojenatı + 0.49 ml SF

+ 3 ml C çözeltisi

Karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında
bekletildi.

+ 0.1 ml folin çözeltisi

Karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi.

Oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 500 nm de okundu.

5.4.8. Dokuda kemilüminesans yöntemi

Dokuda reaktif oksijen türevlerinin kemilüminesans yöntemi ile belirlenmesi

Prensip: Kemilüminesans yöntemi ROT'nin ölçümü için kullanılan direkt ve noninvazif bir yöntemdir. Kemilüminesans ekzotermik oksidatif reaksiyon gösteren organik bileşiklerin genel bir özelliğidir ve ışık yayılmasını ifade eder. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4 phthalazinedione) ve lusigenin (bis-N-methylacridiniumnitrate) ROT gibi oksidanlarla tepkimeye girerek sırasıyla 3-aminophthalate ve N-methylacridone oluşturur.

Örnek saklama ve hazırlama: Taze dokular 2 ml PBS-Hepes tamponu içinde kemilüminesans ölçümüne hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Dokular 2 ml PBS-Hepes tamponu içine konuldu ve içinde aynı dokunun örnekleri olan iki ayrı tüpe 4'er µl (0.2 mM) luminol ve (0.2 mM) lusigenin eklendi. Reaktif oksijen türleri ile luminol ve lusigenin maddelerinin reaksiyonu sonucu ortaya çıkan fotonik aktivite luminometre aracılığı ile 10 dakika süreyle kaydedildi.

Hesap: Kemilüminesans ölçümü hesaplanırken, 10 dakika süresince kaydedilen sayımların oluşturduğu "eğri altı alan" (Area under curve, AUC) hesaplandı. Kemilüminesansda elde edilen sayımların zamana karşı çizilen grafik eğrisinin altındaki alan, sayım noktalarının integrali alınarak AUC değeri olarak hesaplandı.

AUC hesaplama formülü:

$$\text{Alan} = \Delta t [(y_1/2) + y_2 + y_3 + y_{n-1} + (y_n/2)]$$

Δt : Ölçümlerde kullanılan zaman aralığı

n: Ölçüm noktalarının toplam sayısı

$y_1, y_2, \dots, y_n$: Ölçümleri ifade eder.

Birim; rölatif ışık birimi/mg doku (relative light unit- rlu/mg doku) şeklinde ifade edilir.

5.4.9. Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz 9 aktivitesinin tayinleri

Dokuların homojenizasyonu

-80°C’ de muhafaza edilen dokuların moleküler analizleri için homojenatların hazırlanmasında proteaz inhibitörü (0.2 mM PMSF, 1 µM pepsitatin, 1 µg/ml löpeptin ve 10 µg/ml soybean tripsin), %10 gliserol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EGTA ve 1 mM EDTA içeren pH 7.4’lük 20 mM Tris tamponu kullanıldı. Dokular 50 ml’lik flakonlara alınarak gramajlarına (1:2 w/v) göre eklenen homojenizasyon tamponu içinde 90 saniye ultraturrax homojenizatörle buz üstünde homojenize edilmiştir.

Homojenatlar 2000 g’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım 12.000×g’de 60 dakika tekrar santrifüj edildi. İkinci santrifüj sonrası oluşan mitokondrial pellet 500 µl’lik homojenizasyon tamponuyla yıkandıktan sonra 120.000×g’de 1 s santrifüj edildi. Peletler 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), %5 gliserol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, proteaz inhibitörleri ve %0.05 Triton X-100 tamponuyla 1.5 s vorteks yapılarak inkübasyonu sağlanan fraksiyonlar mitokondrial ekstrakt olarak kullanıldı. Tüm bu işlemler +4 °C’de yapıldı.

Mitokondrial ekstraktlardaki protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

SDS-PAGE ve Western Blot

Lowry Yöntemi ile protein miktarı analiz edilen dokular 100 µg protein içerecek şekilde 4X örnek tamponu ile karıştırılıp 6 dakika denature edildi.

Örnekler, %12’lik poliakrilamid içeren jel ile elektroforez düzeneğine yüklenerek 120 dakika yürütüldü. Jelden nitrocelüloz membrana aktarım 125 mA’de 90 dakika süre ile gerçekleştirildi. Membranlar TBS-T (TBS %0.05’lik Tween 20) ve %3’lük BSA içeren tamponla 14 s boyunca +4°C’de inkübe edildi. Bloklamının ertesi günü membranlar farklı konsantrasyonlarda apoptoz [Bcl-2 (1: 200), Bax (1: 200), kaspaz 3 (1:100), veya kaspaz 9 (1:100)] proteinlerinin poliklonal antikorları ile gece boyu inkübe edildi.

Bütün membranlar muamele edildikleri antikor dışında normalizasyon analizlerinin yapılabilmesi için bir sonraki gün β aktin antikor (1: 200) ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Her inkübasyondan sonra membranlar 3x15 dakika TBS-T (%0.05 Tween- 20 içeren TBS) tamponla yıkandıktan sonra alkalen fosfotaz eşlenik tavşan monoklonal anti keçi IgG içeren ikincil antikor ile 1 saat inkübe edildi. İkincil antikor inkübasyonundan sonra membranlar yine 3X15 dakika TBS-T yıkandıktan sonra NBT/ BCIP renk geliştirici solüsyonu kullanılarak membran üzerinde oluşan özgün bantlar gözlemlendi.

5.5. Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi:

Işık mikroskobu: Dokular %10'luk formole alındıktan sonra en az 3 saat veya 1 gece çeşme suyunda yıkandı ve artan alkol konsantrasyonları ile dehidratasyon (%70'lik alkol ile 15 dakika, % 90'lık alkol ile 15 dakika, % 96'lık alkol ile 30 dakika, %100'lük alkol ile iki kere 30 dakika, % 100'lük tolüen ile 2 kere 30 dakika) yapıldı, ardından 1 gece parafinde 60°C'de bekletildi, ertesi gün doku parafin bloklara gömüldü. Bloklama işleminden sonra dokulardan 5-6 mm kalınlığında kesitler alınarak lama yerleştirildi ve parafinden kurtarma işlemi için 2 saat tolüende bırakıldı, ardından alkolün azalan konsantrasyonları ile suya indirgenme (%100'lük alkol ile 2 dakika, %90'lık alkol ile 2 dakika, %70'lik alkol ile 2 dakika muamele edildi.) yapıldı ve distile suya bırakıldı. 15 dakika hematoksilin ile muamele edildikten sonra çeşme suyunda 10 dakika morartma işlemi için bırakıldı. Eosin ile 5 dakika ilave olarak distile su uygulandıktan sonra tekrar alkolün artan konsantrasyonları ile dehidratasyon (%70'lik alkol ile 2 dakika, %90'lık alkol ile 2 dakika, %96'lık alkol ile 2 dakika, %100'lük alkol ile 10 dakika) yapıldı. Ardından Tolüen ile 2 kere yıkandı (1.banyo 5 dakika, 2.banyo 10 dakika) ve Entellan ile dokunun üzeri kapatıldı, doku ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

5.5.1. İmmünohistokimya

Multidrug Resistance-Associated Protein-2 ve P-gp immünoekspresyonunu formalin fiske gömülü dokularda göstermek amacıyla streptavidin biotin peroksidaz immünohistokimya boyama yöntemi uygulandı.

Parafine gömülü dokulardan 3 µm kalınlığında kesitler, pozitif şarjlı lamlara alındı ve 37°C'de 1 gece deparafinize edildi, bunu takiben üç ayrı ksilenle beşer dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. 10'ar dakikalık süreler ile kesitler %96'lık etanolden geçirildi ve 20 dakika %3'lük hidrojen peroksit (metanolde) ile dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi baskılandı. Kesitler distile su ile yıkandı, kesitlerdeki maskelenen antijenleri açığa çıkarmak için mikrodalga fırında 200 W güçte pH 6 sitrat tampon çözeltisi ile antijen geri kazanım işlemi uygulandı. Lamalar oda ısısında soğutuldu, iki ayrı fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 5'er dakika yıkandı ve non spesifik boyanmayı engellemek için dokulara 10 dakikalık protein blokajı (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Dedection System, UK) yapıldı. Blokajın tamamlanmasını takiben, 1:100 dilüsyon oranında MRP2 (M2 III-6, Abcam UK) ve 1:40 dilüsyon oranında P-gp (JSB-1, Abcam, UK) damlatıldı ve 1'er saat oda ısısında inkübe edildi. 1 saat sonunda, kesitler iki ayrı PBS ile yıkandı ve 10 dakika biotinlenmiş sekonder antikorda (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Dedection System, UK) bekletildi. PBS ile yıkanma tekrar edildi, bunu takiben streptavidin peroksidaz (Histostain Bulk Kit, Invitrogen LAB-SA Dedection System, UK) damlatıldı ve 10 dakika inkübe edildi. Kesitler 5'er dakikalık iki ayrı PBS ile yıkandı ve yıkanan kesitlere 3-3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeni damlatıldı ve 5 dakikalık inkübasyon sonrasında boyanma kontrol edildi. Kesitler distile su ile yıkandı, yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen ile sıt boyama yapıldı ve dehidratasyon için etanolden geçirildi.

Dokular ksilene alındı, uygun kapama maddesi ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (BX51 Olympus, Japan) semikantitatif olarak değerlendirildi.

5.5.2. İstatistik yöntemi

Çalışmamızda serumda AST, ALT, TNF- α , İL-1 β düzeyleri ve karaciğer dokusunda ölçülen GSH, MDA, luminol, lusigenin düzeyleri ve Bcl-2/Bax oranı ile MPO, Na⁺K⁺-ATPaz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin gruplararası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelendi ve ikili karşılaştırmalarda Tukey's testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak p<0.05 kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmamızda serumda AST, ALT, TNF- α , İL-1 β düzeyleri ve karaciğer dokusunda ölçülen GSH, MDA, luminol, lusigenin düzeyleri ve Bcl-2/Bax oranı ile MPO, Na⁺K⁺-ATPaz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin gruplararası karşılaştırılması ANOVA ile incelenmiş ve ikili karşılaştırmalarda Tukey's testi kullanılmıştır.

6.1. Seruma Ait Sonuçlar

Hepatik iskemi reperfüzyon yapılan grupta serum AST, ALT, TNF- α ve İL-1 β düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık SJW uygulanan grupta HI grubundaki artış anlamlı olarak düşmüş, kontrol değerlerine yaklaşmıştır (Tablo 6, Şekil 4).

Tablo 6: Sıçanlarda yapılan hepatic iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait serum AST, ALT, TNF- α ve İL-1 β değerleri

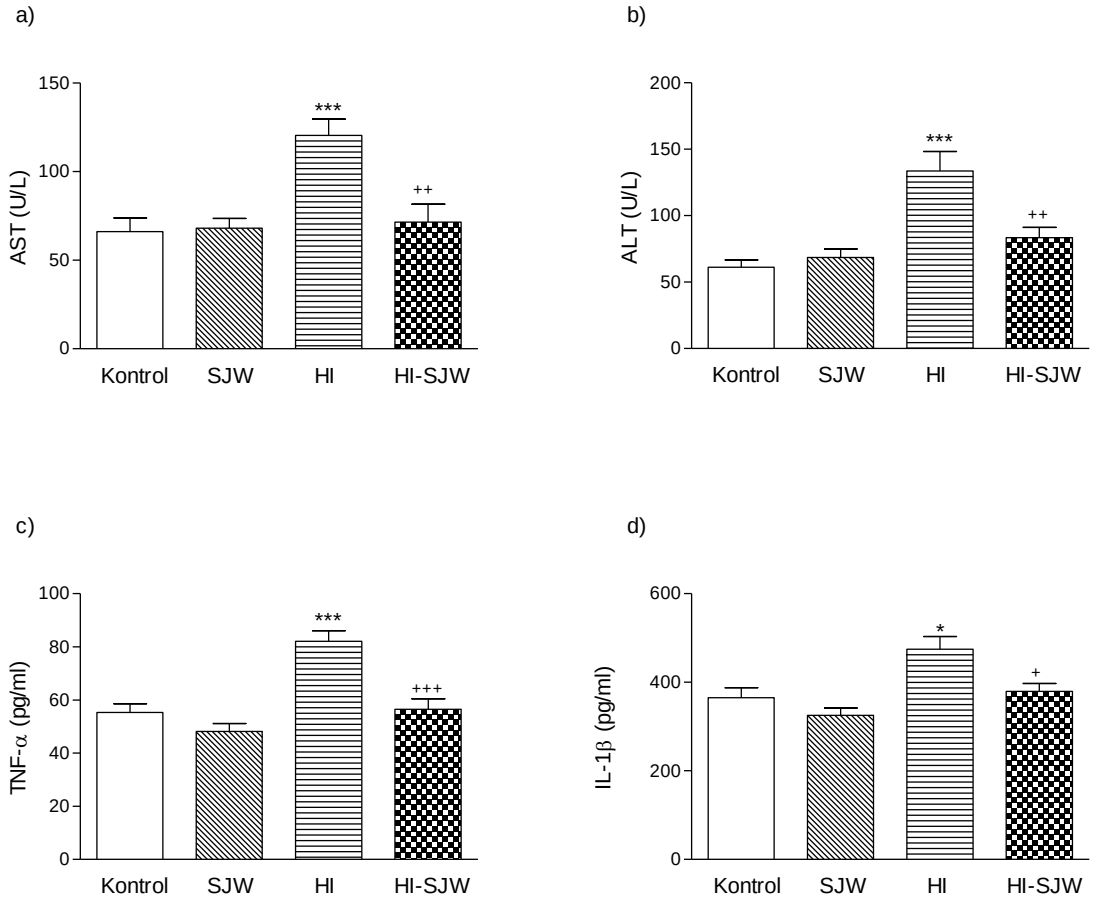
	Kontrol	SJW	HI	HI-SJW
AST (U/L)	66.2 $\pm$ 7.5	68.2 $\pm$ 5.4	120.5 $\pm$ 9.3 ***	71.5 $\pm$ 10.1 ⁺⁺
ALT (U/L)	61.3 $\pm$ 5.6	68.7 $\pm$ 6.2	133.8 $\pm$ 14.6 ***	83.5 $\pm$ 7.8 ⁺⁺
TNF- α (pg/ml)	55.4 $\pm$ 3.2	48.2 $\pm$ 3.1	82.2 $\pm$ 3.9 ***	56.6 $\pm$ 3.9 ⁺⁺⁺
İL-1 β (pg/ml)	365 $\pm$ 22	326 $\pm$ 16	475 $\pm$ 29 *	380 $\pm$ 18 ⁺

Ortalama değer $\pm$ standart hata

* p<0.01, ***p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺ p<0.05, ⁺⁺ p<0.01, ⁺⁺⁺ p<0.001 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa; İL-1 β : İnterlökin 1-beta; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon



Şekil 4: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait serum a) AST, b) ALT, c) TNF- α ve d) IL-1 β değerleri

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$ HI grubuna göre karşılaştırmalar.

AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa; IL-1 β : İnterlökin 1-beta; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon

6.2. Glutasyon ve Malondialdehit Sonuçları

Karaciğer dokusunda glutasyon düzeyleri kontrol grubuna göre HI yapılan grupta düşük bulunmuştur. Bu düşüşün SJW ile tedavi uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlendiği görülmüştür.

Malondialdehit düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre karaciğer dokusunda HI yapılan grupta anlamlı bir artış bulunmuştur. St. John's Wort uygulaması ise MDA düzeylerindeki bu yükselmeyi anlamlı olarak azaltmıştır (Tablo 7, Şekil 5).

Tablo 7: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku GSH ve MDA değerleri

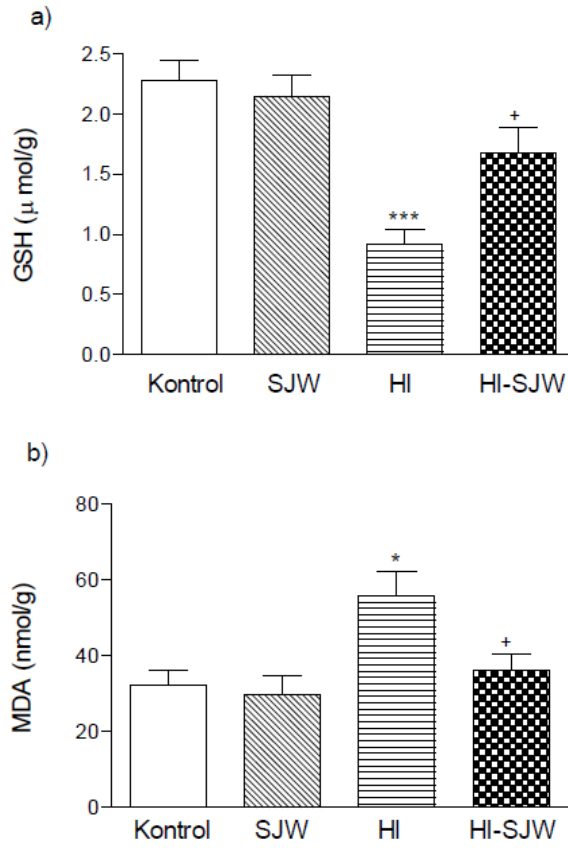
	Kontrol	SJW	HI	HI-SJW
GSH (mmol/g)	2.28 ± 0.17	2.15 ± 0.17	0.91 ± 0.13 ***	1.68 ± 0.20 ⁺
MDA (nmol/g)	32.20 ± 4.19	29.78 ± 4.88	55.97 ± 6.21 *	36.12 ± 4.35 ⁺

Ortalama değer ± standart hata

* p<0.05, ***p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺ p<0.05 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon



Şekil 5: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku a) GSH, b) MDA değerleri.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre

⁺ $p < 0.05$ HI grubuna göre karşılaştırmalar

GSH: Glutatyon; MDA: Malondialdehit; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon

6.3. Myeloperoksidaz ve Na⁺K⁺-ATPaz Aktivitesi Sonuçları

Hepatik iskemi/reperfüzyon yapılması, karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu ve buna bağlı olarak MPO değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırırken, MPO aktivitesi SJW uygulanan grupta anlamlı olarak azaltılmış ve kontrol grubu MPO değerlerine yakın sonuç alınmıştır.

Karaciğer dokusunda Na⁺K⁺-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre HI yapılan grupta düşük bulunmuştur. Bu düşüşün SJW ile tedavi uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlendiği görülmüştür (Tablo 8, Şekil 6).

Tablo 8: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku MPO ve Na⁺-K⁺ATPaz değerleri

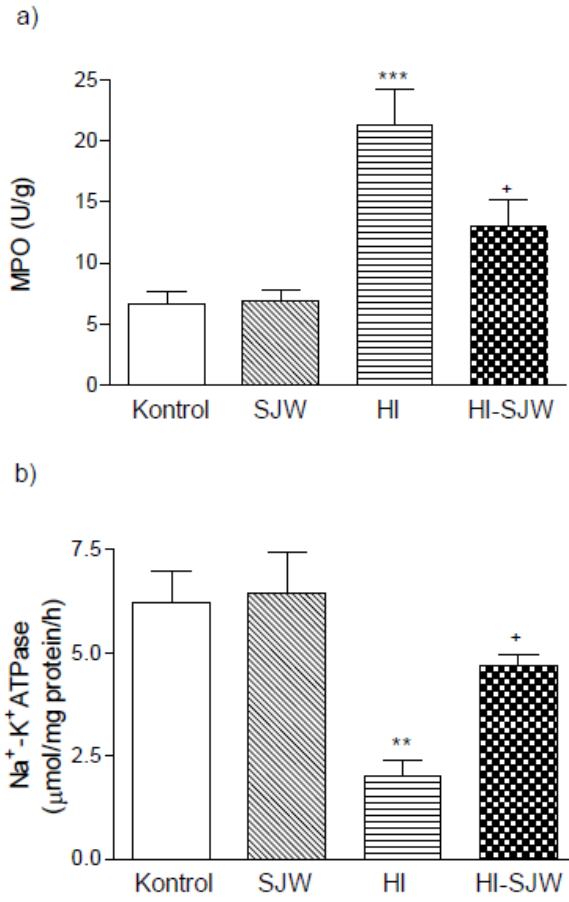
	Kontrol	SJW	HI	HI-SJW
MPO (U/g)	6.71 ± 0.95	6.84 ± 1.02	21.32 ± 2.96 ***	13.08 ± 2.13 ⁺
Na ⁺ K ⁺ ATPaz (mmol/mg protein/h)	6.21 ± 0.78	6.45 ± 0.99	2.01 ± 0.39 **	4.68 ± 0.29 ⁺

Ortalama değer ± standart hata

** p<0.01, ***p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺ p<0.05 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

MPO: Myeloperoksidaz; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon



Şekil 6: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku a) MPO, b) Na⁺-K⁺ATPaz değerleri

** p<0.01, ***p<0.001 SF uygulanan kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺ p<0.05 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

MPO: Myeloperoksidaz; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon

6.4. Luminol ve Lusigenin Aracılı Kemilüminesans ile ROT Ölçüm Sonuçları

Karaciğer dokusunda luminol düzeyleri kontrol grubuna göre HI yapılan grupta yüksek bulunmuştur. Bu artışın SJW ile tedavi uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlendiği görülmüştür.

Lusigenin düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre karaciğer dokusunda HI yapılan grupta anlamlı bir artış bulunmuştur. St. John's Wort uygulaması ise lusigenin düzeylerindeki bu yükselmeyi anlamlı olarak azaltmıştır (Tablo 9, Şekil 7).

Tablo 9: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku luminol ve lusigenin aracılı kemilüminesans ile ROT ölçüm değerleri

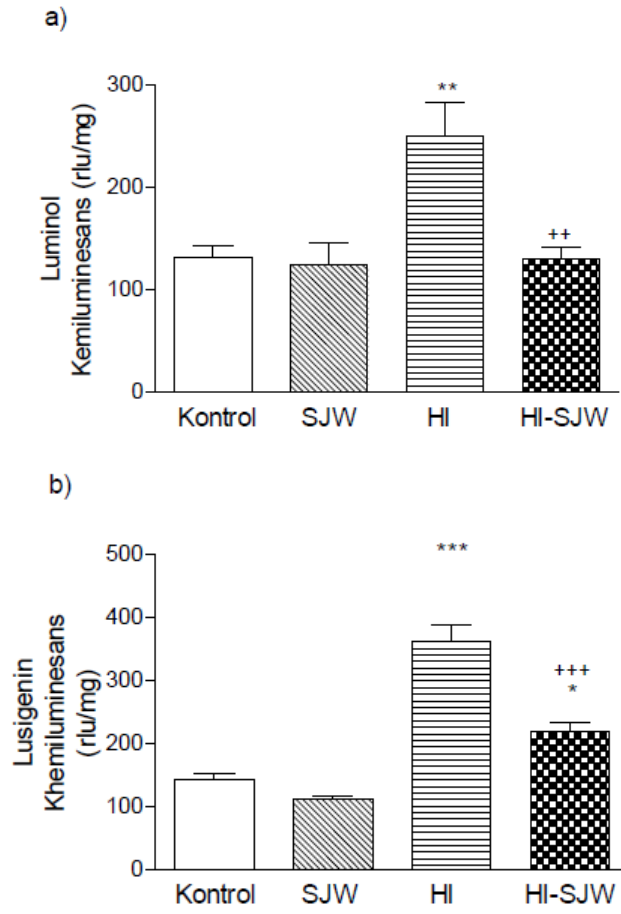
	Kontrol	SJW	HI	HI-SJW
Luminol aracılı Kemilüminesans (rlu/mg)	131 ± 12	125 ± 21	250 ± 34 **	130 ± 12 ⁺⁺
Lusigenin aracılı Kemilüminesans (rlu/mg)	143 ± 7	111 ± 6	360 ± 26***	217 ± 15 *, ⁺⁺⁺

Ortalama değer ± standart hata

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

⁺⁺ p<0.01, ⁺⁺⁺ p<0.001 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon; ROT: Reaktif oksijen türevleri



Şekil 7: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait doku a) luminol ve b) lusigenin aracılı kemiluminesans ile ROT ölçüm değerleri

* $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ HI grubuna göre karşılaştırmalar

SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon; ROT: Reaktif oksijen türevleri

6.5. Bcl-2/Bax Oranı, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktivitesi Sonuçları

Bcl-2/Bax oranı değerlendirildiğinde SF uygulanan kontrol grubuna göre, SJW grubu ile HI-SJW grubu yüksek, SF uygulanan HI grubu ise düşük bulunmuştur. Bu düşüş SJW uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlenmiştir.

Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi kontrol grubuna göre SJW grubunda düşük, SF uygulanan HI grubunda yüksek bulunmuştur. Bu artış SJW uygulanan HI grubunda anlamlı olarak düzelmiştir (Tablo 10, Şekil 8).

Tablo 10: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait Western Blot analizi ile Bcl-2/Bax oranı ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri.

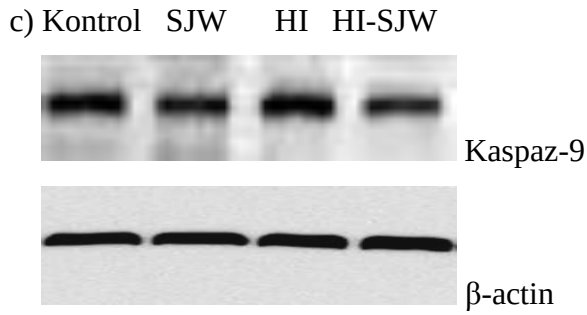
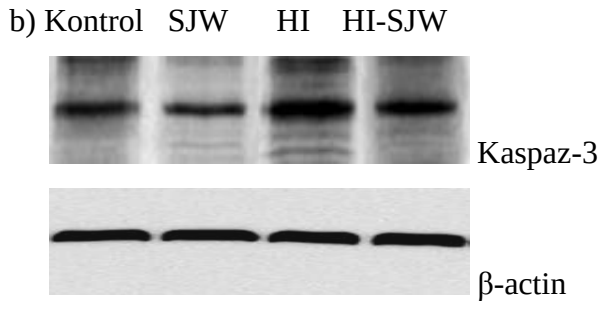
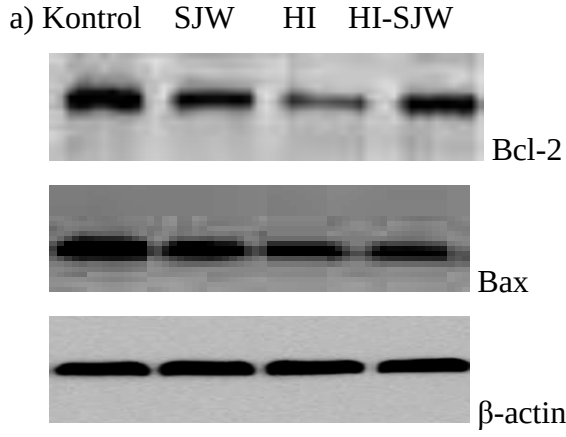
	Kontrol	SJW	HI	HI-SJW
Bcl-2/Bax oranı	1	1.35 ± 0.01 ***	0.76 ± 0.02 ***	1.18 ± 0.02 ***, ⁺⁺⁺
Kaspaz-3/β-aktin	1	0.75 ± 0.02***	1.16 ± 0.03 ***	0.87 ± 0.02 ⁺⁺⁺
Kaspaz-9/β-aktin	1	0.86 ± 0.02 **	1.19 ± 0.03 ***	0.87 ± 0.03 **, ⁺⁺⁺

Ortalama değer ± standart hata

** p<0.01, *** p<0.001 Kontrol grubuna göre,

⁺⁺⁺ p<0.001 HI grubuna göre karşılaştırmalar.

SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon



Şekil 8: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait Western Blot analizi ile a) Bcl-2/Bax oranı ile b) kaspaz-3 ve c) kaspaz-9 aktiviteleri. SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon

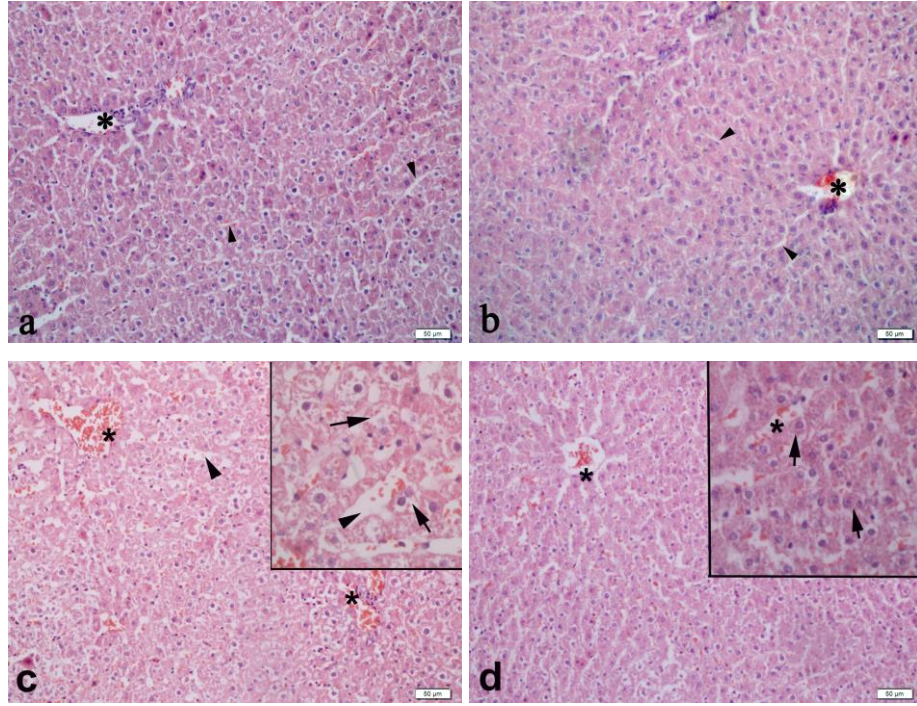
6.6. Histoloji Sonuçları

Kontrol grubunun yapılan histopatolojik incelemesinde sinüzoidler ile hepatositlerin intakt olduğu ve karaciğer parenkiminin normal morfolojisini koruduğu görüldü.

St. John's Wort uygulanan grubun yapılan histopatolojik incelemesinde sinüzoidler ile hepatositlerin intakt olduğu ve karaciğer parenkiminin normal morfolojisini koruduğu görüldü.

HI grubunun yapılan histopatolojik incelemesinde hepatik iskeminin neden olduğu yaygın konjesyon ve hepatosit dejenerasyonu görülmektedir.

St. John's Wort tedavisi alan HI grubunun yapılan histopatolojik düşük sinüzoidal ve hepatoselüler dejenerasyon görülmektedir (Şekil 9).



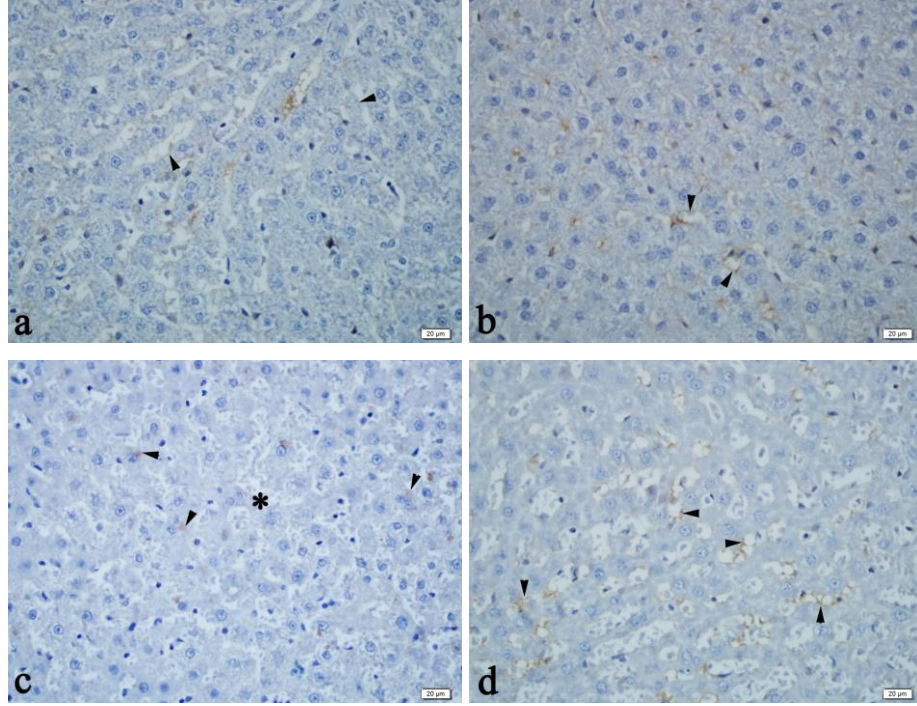
Şekil 9. Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait histoloji sonuçları

- a)** Kontrol grubu, düzgün kontürlü santral ven (*) ve sinüzoidler (►).
- b)** SJW grubu, düzgün kontürlü santral ven (*) ve sinüzoidler (►).
- c)** HI grubu, sinüzoidlerde dilatasyon, hepatoselüler dejenerasyon (oklar) ve santral vende (*) yaygın konjesyon
- d)** HI-SJW grubu, sinüzoidlerde azalmış dilatasyon (oklar) ve santral vende (*) azalmış konjesyon

6.7. İmmunohistokimyasal İnceleme Sonuçları

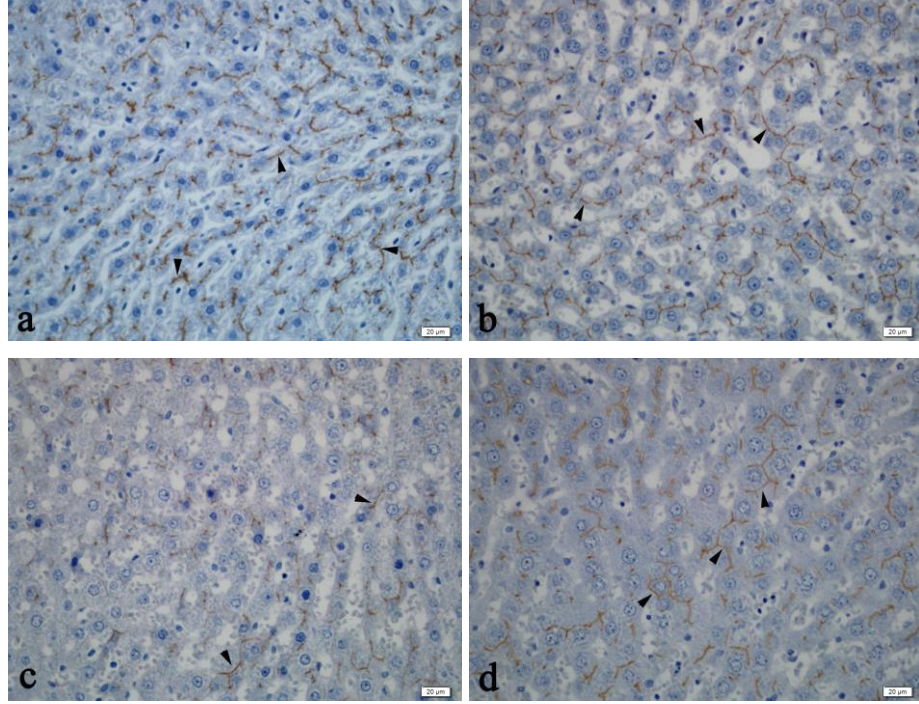
P-glikoprotein sonuçları incelendiğinde kontrol (Şekil 10a) ve SJW (Şekil 10b) gruplarının her ikisinde de hepatosit membranları boyunca kuvvetli ve devamlılık gösteren boyanma mevcuttu. Hepatik iskemi/reperfüzyon grubunda (Şekil 10c) yoğunluğu azalmış ve membran bütünlüğü göstermeyen boyanma gözlenirken hepatik iskemi ve SJW grubunda (Şekil 10d) boyanmanın yine kuvvetlendiği izlendi.

Multidrug Resistance-Associated Protein-2 sonuçlarında ise kontrol (Şekil 11a) ve SJW (Şekil 11b) gruplarının her ikisinde de hepatosit membranları boyunca kuvvetli ve devamlılık gösteren boyanma mevcuttu. Hepatik iskemi/reperfüzyon grubunda (Şekil 11c) yoğunluğu azalmış ve membran bütünlüğü göstermeyen boyanma gözlenirken hepatik iskemi ve SJW grubunda (Şekil 11d) boyanmanın yine kuvvetlendiği izlendi (Şekil 10, 11).



Şekil 10: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait immunohistokimyasal P-gp sonuçları

- a)** Kontrol grubu, düzenli ve kuvvetli hepatosit membran boyanması (okbaşları),
 - b)** SJW grubu, membranlar boyunca düzenli ve yoğun boyanma (okbaşları),
 - c)** HI grubu, yoğunluğu azalmış az-orta derece boyanma (okbaşları),
 - d)** Hepatik iskemi ve SJW grubu, membranların yoğun boyanması (okbaşları),
- P-gp: P-glikoprotein; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon



Şekil 11: Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, tüm gruplara ait immunohistokimyasal MRP-2 sonuçları

- a)** Kontrol grubu, düzenli ve kuvvetli hepatosit membran boyanması (okbaşları),
- b)** SJW grubu, membranlar boyunca düzenli ve yoğun boyanma (okbaşları),
- c)** HI grubu, yoğunluğu azalmış az-orta derece boyanma (okbaşları),
- d)** Hepatik iskemi ve SJW grubu, membranların yoğun boyanması (okbaşları),

MRP-2: Multidrug resistance associated protein-2; SJW: St. John's Wort; HI: Hepatik iskemi/reperfüzyon

7. TARTIŞMA

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı, organ nakli, karaciğer rezeksiyonu, travma ve vasküler hastalıklar dahil klinik uygulamaların birçoğunda meydana gelebilir (Papadopoulos ve ark., 2013; Güreş ve ark., 2012). Hepatik iskemi/reperfüzyon hasarına çeşitli faktörler katkıda bulunmaktadır, bunlar; Kupffer hücre aktivasyonu, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokin sinyal sisteminin upregülasyonudur.

İskemi periyodu sırasında, hücresel düzeyde çeşitli fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Özellikle spesifik olan, oksidatif fosforilasyonda azalmadır; bu durum ATP depleksyonu ve kalsiyum homeostazında düzensizlik ile sonuçlanır. Ayrıca iskemi sırasında hepatositlerde oksijenin yokluğu mitokondriyal enerji üretiminin azalmasına, H^+ ve Na^+ homeostazının değişimlerine ve son olarak sinüzoidal endotelial hücrelerin ve Kupffer hücrelerinin büyümesine sebep olur. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ROT üretiminde, indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) aktivasyonunda ve nötrofil aracılı hasar ile sonuçlanan proinflamatuar sitokinler, kemokinler ve adezyon moleküllerinin düzeylerinde artışa yol açarak inflamasyona neden olur (Papadopoulos ve ark., 2013).

İskemi ve reperfüzyon hasarının engellenmesine yönelik olarak pek çok ajan araştırılmıştır. Güreş ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında papaverinin etkisi incelenmiş olup, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, parankimdeki fokal nekroz ve hidropik şişme hariç diğer tüm ölçütlerde çalışma grubunda yer alan sıçanların kontrol grubundakilere nazaran iskemi reperfüzyon hasarını anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır (Güreş ve ark., 2012). Şehirli ve ark.'nın yürüttükleri çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresi tedavisinin sıçanlarda hepatik iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı saptanmıştır. Üzüm çekirdeği ekstresinin HI ile indüklenen organ hasarını, oksidan-antioksidan dengesindeki etkisi ile nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımını düzenleyerek azalttığı saptanmıştır (Şehirli ve ark., 2008). Ancak SJW'nin HI hasarında tek başına denendiği ve histopatolojik bulguların skorlandığı bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Sıçanlarda yürütülen iskemi periyodunun etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, sıçanlar 1, 2 veya 3 saat için bilateral iskemi ve bunu takiben 4 saat için reperfüzyona tabi tutulmuştur. Sıçanlarda kreatinin kinaz (CK), AST, ALT, kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin (Cre) ve potasyum iyonunun değerleri ölçülmüştür. İskeminin uzun periyotları kas ödeminin uzamasının yanı sıra CK, AST, ALT, BUN ve potasyum iyonunun artmış değerleri ile ilişkili olarak bulunmuştur. AST, BUN ve üriner protein değerleri bir saat veya daha uzun iskemi sonrası, CK, ALT değerleri 2 saatlik veya daha uzun iskemi sonrası ve kas ödemi 3 saatlik iskemi sonrası önemli derecede artmıştır (Sagara ve ark., 2009). Sıçan karaciğerinden izole edilmiş Kupffer hücrelerinde HI sonrası TNF- α düzeylerindeki artış kontrol grubuna göre 5 kat fazla bulunmuştur. Ayrıca sıçanlarda yapılan çalışmalarda, HI'da anti-TNF- α antikorlarının kullanılmasının karaciğer hasarını azalttığı ve akciğer ödem gelişimini önlediği gösterilmiştir. Benzer biçimde, mürin modellerinde pentoksifilin Kupffer hücrelerinin TNF- α üretimini engellediği, bunun sonucunda HI hasarını azalttığı saptanmıştır (Baykara, 2005). Karragenan ile indüklenen akciğer zarı iltihabı oluşturan bir hayvan modelinde, oral olarak uygulanan *Hypericum perforatum*'un etkileri değerlendirilmiştir. Hayvanlarda plevral boşlukta sıvı birikimi ile karakterize akut inflamatuvar cevapta TNF- α ve IL-1 β üretiminde de artış saptanmıştır. İnflamasyonun tüm parametreleri *Hypericum perforatum* ekstresi uygulaması ile azalmıştır (Menegazzi ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar yapılan çalışmalara paralellik göstermektedir. Karaciğerde iskemi/reperfüzyon oluşturulan grupta, AST, ALT, TNF- α ve IL-1 β düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık SJW uygulanan grupta hepatik iskemi/reperfüzyon grubundaki artış anlamlı olarak düşmüş ve kontrol değerlerine yaklaşmıştır.

Hypericum perforatum, asırlar boyunca bitkisel tedavi olarak kullanılmaktadır. Galen (A.D. 150-200) SJW'yi menstrüel bozukluklar için reçetelediği bilinmektedir ve ayrıca Orta Çağ'da depresyon tedavisi için kullanılmıştır. St. John's Wort'un konvansiyonel antidepresan tedavisi kadar etkili olduğunu kanıtlayan randomize kontrollü klinik çalışmalar ile "Doğal Prozac" olarak ün salmıştır (Hennessy ve ark., 2002). Depresyonda kullanımının yanı sıra oral ve topikal uygulama ile

antiinflamatuvar, sedatif, diüretik, antimalaryal ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Miller AL, 1998).

Bitkisel ilaçlar birçok farmasötik olarak aktif bileşenler içermektedir ve bunların bazıları bitki-ilâç etkileşimlerine neden olabilmektedir. Bitki-ilâç etkileşimleri için öngörülen mekanizma karaciğerde ve intestinal mukozada yoğun olarak bulunan CYP 450 enzim sisteminin indüksiyonu ve substratlarını hücrelerin dışına atan ATP-bağımlı bir pompa olan P-gp'in indüksiyonudur (Cass, 2004). P-glikoprotein gibi diğer ilâç effluks (dışa atım) pompalarını da kapsayan ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılar süperfamilyasında bulunan MRP2'dir (Courtois ve ark., 1999; Borst ve ark., 2000). Multidrug Associated Resistance Protein-2 eksikliği, hepatositlerin daha hassas olmasına neden olur (Kudo ve ark., 2012). Parasrampur ve ark. (2012) yürüttüğü bir çalışmada hızlı (warm) HI hasarı, 60 dakika kısmi iskemiye maruz kalan karaciğerin reperfüzyonun 24 saat sonrası sıçan karaciğerinde P-gp ve MRP2'nin her ikisinin de aktivitesi azalmıştır (Parasrampur ve ark., 2012). Çalışmamızda P-gp sonuçları incelendiğinde, kontrol ve SJW gruplarının her ikisinde de hepatosit membranları boyunca kuvvetli ve devamlılık gösteren boyanma mevcuttu. Hepatik iskemi/reperfüzyon grubunda yoğunluğu azalmış ve membran bütünlüğü göstermeyen boyanma gözlemlenmiş olup, SJW uygulanan HI grubunda boyanma kuvvetlendiği saptanmıştır. Multidrug Associated Resistance Protein-2 sonuçları incelendiğinde ise, kontrol ve SJW gruplarının her ikisinde de hepatosit membranları boyunca kuvvetli ve devamlılık gösteren boyanma mevcuttur. Hepatik iskemi/reperfüzyon grubunda yoğunluğu azalmış ve membran bütünlüğü göstermeyen boyanma gözlemlenmiş olup, SJW uygulanan HI grubunda boyanmanın arttığı saptanmıştır.

Sodyum-potasyum adenosin trifosfataz ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPaz}$), tüm hücre membranlarında bulunan sodyum ve potasyum gradyanını sağlayarak hepatosit yapısı ve fizyolojisinde anahtar rol oynayan önemli bir membran enzimidir (Kulkarni ve ark., 2002; Van Dyke ve Scharschmidt, 1983). Karaciğer nakli sırasında doku canlılığının ve hepatik fonksiyonun indikatörüdür. Yapılan bir çalışmada, karaciğer iskemi reperfüzyonunu takiben $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPaz}$ seviyesinde düşme olduğu sonucu

raporlanmıştır (Benkoel ve ark., 2004). Çalışmamızda çıkan sonuçlar literatüre paralellik göstermiş ve HI yapılan grupta Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu düşüşün SJW ile tedavi uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlendiği görülmüştür.

Myeloperoksidaz, nötrofillerin aktivasyonu sonucu salıverilen bir enzim olup, ROT üretiminde bulunmaktadır (Bekheet ve ark., 2009; Rensen ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak MPO aktivitesinde ki artışın endotelial disfonksiyona ve inflamasyona neden olduğu belirtilmiştir (Demiryılmaz ve ark., 2014; Elias-Miró ve ark., 2014). Nitekim çalışmamızda da HI yapılması karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu ve buna bağlı olarak MPO değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır. Çalışmamızda kullandığımız SJW'nin kan parametreleri üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında bu ajanların dokuda MPO enzimini anlamlı olarak baskılamış olması HI'da bu enzimin önemli rolünü desteklemektedir. Dolayısıyla HI tedavisinde kullanılan ajanların MPO aktivitesi üzerinde inhibitör özelliklerinin olması, dokunun oksidasyona karşı korunmasını sağlayacak ve tedavinin başarısını artıracaktır. St. John's Wort'un serbest radikal süpürücü etkisi ile inflamatuvar olaylarda artan MPO aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Dost ve ark., 2009). Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında bizim bulgularımızın literatüre uygunluk sağladığı anlaşılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda, karaciğer hasarına bağlı olarak dokuda (siroz ve kanserli) GSH değerinin düştüğü ve MDA değerinin arttığı gösterilmiştir (Czeczot ve ark., 2006; Sehirli ve ark., 2008). Glutasyon, vücudun en önemli antioksidan savunma sistemlerinden bir tanesidir. Dokularda GSH düzeylerinin azalması pek çok patolojiye yol açmaktadır. En fazla çalışılan modeller arasında sepsis, yanık ve ilaç toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Antioksidanlar ile yapılan tedavi son zamanlarda birçok hastalıkta denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalar ve HI'da N-asetil sistein, α -lipoik asit gibi ajanlar ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında çalışmamızda tedavi amaçlı SJW uygulanmıştır. Bu ajan ile yaptığımız çalışma neticesinde karaciğer dokusunda glutasyon tüketimini ve böylece HI hasarını önlediği

saptanmıştır. Malondialdehit ise membran yapısını bozarak hücrelerde hasara yol açan lipid peroksidasyonunun 4-hidroksinenonal ile birlikte son ürünüdür (Bekheet ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda, antioksidan olarak kullanılan ajanların GSH düzeylerini artırmak suretiyle MDA düzeylerindeki artışı önlediği gösterilmiştir (Erkanlı ve ark., 2005; Meister ve Anderson, 1983). Bu çalışmada koruyucu ajan olarak kullandığımız SJW de karaciğer dokusunda artmış MDA düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır.

Hepatik iskemi/reperfüzyonu gibi inflamatuvar olaylarda artan serbest oksijen radikallerinin dokularda hasara yol açtıkları bilinmektedir. Serbest O₂ radikallerinin saptanmasında luminol aracılı KL ve lusigenin aracılı KL iki önemli belirteç olarak kullanılmaktadır. Luminol tayini ile OH[•], H₂O₂, hipoklorit ve hidroperoksil radikallerinin, lusigenin tayini ile O₂^{•-} radikalinin düzeyi saptanmaktadır (Okudo ve ark., 1992). Çalışmamızda HI oluşturulan sıçanların karaciğer dokusunda luminol ve lusigenin değerleri anlamlı olarak artmış SJW uygulanan gruplarda ise bu artış anlamlı olarak azalmıştır. St. John's Wort'un bu etkisini muhtemelen nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

“Kontrollü hücre ölümü” olarak tanımlanan apoptozun en önemli özellikleri kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, DNA fragmentasyonu, apoptotik cisimlerin oluşması ve fagositozudur. Apoptozda serbest oksijen radikalleri ve sitokinler önemli rol oynamaktadır (Öniz, 2004). Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hepatik iskemi reperfüzyon hasarında Fas-mRNA ekspresyonunun ve kaspaz-3 aktivitesinin ve apoptotik hepatositlerin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2003). Cheng ve arkadaşları da HI sonucunda artan serbest radikallerin Bcl-2/Bax oranını azalttığını göstermişlerdir (Cheng ve ark., 2014). Serbest oksijen radikallerinin apoptoz sürecindeki rolü göz önüne alındığında, antioksidanlarla yapılan tedavinin antiapoptotik etki göstermeleri beklenen bir sonuçtur. Nitekim SJW'nin sitokin aktivasyonunu engelleyerek pro ve antiapoptotik genlerin modülasyonunu sağlayarak apoptozu önlediği gösterilmiştir (Novelli ve ark., 2014).

Çalışmada Bcl-2/Bax oranı değerlendirildiğinde, SF uygulanan kontrol grubuna göre, SJW grubu ile HI-SJW grubu yüksek, SF uygulanan HI grubu ise düşük bulunmuştur. Bu düşüş SJW uygulanan HI grubunda anlamlı olarak önlenmiştir. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi kontrol grubuna göre SJW grubunda düşük, SF uygulanan HI grubunda yüksek bulunmuştur. Bu artış SJW uygulanan HI grubunda anlamlı olarak düzelmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmada, iskemi reperfüzyon ile karaciğerde meydana gelen hasar, St. John's Wort verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır. Ancak St. John's Wort'un bu amaçla klinikte kullanılması için daha geniş karşılaştırmalı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle karaciğer nakli gibi ameliyat öncesi, hastalara hazırlık aşamasında St. John's Wort tek başına veya nutrisyonel destek amaçlı olarak kullanılmasının karaciğer üzerindeki olumlu etkileri ile hastaya faydalı olacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

Ables A, Nagubilli R. Prevention, diagnosis and management of serotonin syndrome. American Family Physician. 2010; 81(9): 1139-1142.

Abu-Amara M, Yang SY, Taporfa N, Fuller B, Davidson B, Selfalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks-A review. Liver Transplantation. 2010; 16: 1016-1032.

Allen ES. The Liver: Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. In: Human Anatomy & Physiology. 2002, p: 1-14.

Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. Liver Transplantation. 2005; 11(6): 663-668.

Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review pf its chemisty, pharmacology and clinical properties. Pharm Pharmacol. 2001; 53(5): 583-600.

Baykara B, Tekmen I. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2005; 5: 185-194.

Baykara B, Tekmen I, Cilaker Mıcılı S, Sönmez Ü, Erbil G, Özbal S, Özoğul C. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin profilaksi ve sağaltım etkileri. Türkiye Klinikleri. 2010; 30(6): 1896-905.

Bekheet IW, Madkour, Abdel Ghaffar N, Nosseir MMF, Moussa MM, Ibraheim RA, Ateya ME. The role of myeloperoxidase in hepatitis C virus infection and aasociated liver cirrhosis. The Open Tropical Medicine Journal. 2009; 2: 1-7.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. 2008; 214: 149-160.

Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J allergy Clin Immunol*. 2003; 111(2): S460-S475.

Borrelli F, Izzo AA. Her-drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *The AAPS Journal*. 2009; 11(4): 710-727.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(16): 1295-1302.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190(3): 255-266.

Cheng P, Wang F, Chen K, Shen M, Dai W, Xu L, Zhang Y, Wang C, Li J, Yang J, Zhu R, Zhang H, Zheng Y, Lu J, Zhou Y, Guo C. Hydrogen sulfide ameliorates ischemia/reperfusion-induced hepatitis by inhibiting apoptosis and autophagy pathways. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:935251. doi: 10.1155/2014/935251. Epub 2014 May 21.

Cass H. St. John's Wort as an herbal treatment for depression and general considerations for the use of herbs in mental health. *Seminars in Integrative Medicine*. 2003; 1(4): 191-198.

Choudhuri S, Valerio LG. Usefulness of studies on the molecular mechanism of action of herbals/botanicals: The case of St. John's Wort. *J Biochem Molecular Toxicology*. 2005; 19(1): 1-11.

Courtois A, Payen L, Guillouzo A, Fardel O. Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Letters*. 1999; 459: 381-385.

Cruz LN, Guerra MT, Kruglov E, Mennone A, Garcia CRS, Chen J, Nathanson MH. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. *Hepatology*. 2010; 52(1): 327-337.

Czeczot H, Scibior D, Skrzycki M, Podsiad M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patient with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *ABP*. 2006; 53(1): 237-241.

Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*. 2006; 58: 140-161.

Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanism of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19(11): 1683-1698.

Demiryilmaz I, Turan MI, Kisaoglu A, Gulapoglu M, Yilmaz I, Suleyman H. Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: Effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacol Rep*. 2014; 66 (4):647-52.

Dost T. et al. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Dig Dis Sci*. 2009; 71: 414-420.

Elias-Miro M, Jimenez-Castro MB, Peralta C. Ischemia-reperfusion injury associated with liver transplantation in 2011: Past and future. *Basic Issues*, Prof. Hesham Abdeldayem (ed.). 2012, p: 21-56.

Elias-Miró M, Mendes-Braz M, Cereijo R, Villarroya F, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Massip-Salcedo M, Domingo JC, Bermudo R, Rodés J, Peralta C. Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *J Hepatol.* 2014;60(1):87-95.

Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res.* 2005;39:238-42.

Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal.* 2005; 172(3): 367-379.

Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrile-mediated pulmonary cell death. *American Physiological Society.* 1998; 274: L112-L118.

Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Kroll U, Kelber O, Wojnowski L. Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St. John's Wort. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2007; 375: 377-382.

Greeson JM, Sanford B, Monti DA. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature. *Phychopharmacology.* 2001; 153: 402-141.

Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005; 54: 1024-1033.

Güreş N, Tavusbay C, Yılmaz O, Atahan K, Bağrıyanık HA, Hacıyanlı M, Sayın Gür Ö, Genç H, Yolcuoğlu b. Sıçanlarda karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında papaverinin etkisi. *Özgün araştırma.* 2012; 2-6.

Hall M, Buckey N. Serotonin syndrome. *Austrilian Prescriber.* 2003; 26(3): 62-63.

Hawken CM. St. John's Wort. Woodland Publishing. 1997, p: 1-35.

Henderson L, Yue QY, Bergquist C, Gerden B, Arlett P. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol. 2002; 54: 349-356.

Hennessy M, Kelleher D, Spiers JP, Kavanagh P, Back D, Mulcahy F, Feely J. St. John's Wort increases expression of P-glicoprotein: Implications for drug interactions. Blackwell Science Ltd BR J Clin Pharmacol. 2002; 53: 75-82.

Hışıl Y, Şahin F, Omay SB. Knataronun (*Hypericum perforatum* L.) bileşimi ve tıbbi önemi. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 2005; 4(15): 212-218.

Ilmakunnas M. Ischemia-Reperfusion Injury in Human Liver Transplantation. Helsinki University Central Hospital Faculty of Medicine, University of Helsinki, 2008, Helsinki.

Isbbister GK, Buckey NA, Whyte AM. Serotonin toxicity: a practical approach to diagnosis and treatment. MJA. 2007; 187(6); 361- 365.

Jaeschke H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 284: G15-G26.

Kalfa M, Aksu K. Anti-tümör nekrozis faktör- α tedavisi ve enfeksiyon. RAED Dergisi. 2011; 3(3-4): 49-56.

Kim HS, Kim NC, Chae KH, Kim G, Park WS, Park YK, Kim YW. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in human gallbladder carcinoma. BioMed Research International. 2013; 1-7.

Kudo A, Ban D, Aihara A, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Tanaka S, Arii S. Decreased mrp2 transport in severe macrovesicular fatty liver grafts. *Journal of surgical Research*. 2012; 178: 915-921.

Kulkarni KS, Rafiq M, Gopumadhavan S, Venkataranganna MV, Madhumathi BG, Mitra SK. Protective effect of Liv.52 on Na⁺-K⁺-ATPase activity in paracetamol-induced hepatotoxicity. *Medicine Update*. 2002; 5(10): 53-56.

Lawvere S, Mahoney MC. St. John's Wort. *American Family Physician*. 2005; 72 (11): 2249-2254.

Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993; 33: 71-90.

Lemastres JJ. Hypoxic, ischemic and reperfusion injury to liver. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari, N. Fausto, D. Schachter and D.A. Sharfritz, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th ed. Philadelphia; 2001, p: 257-280

Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. 2003; 312(5770): 107-107.

Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. Hepatocyte apoptosis induced by hepatic ischemia-reperfusion injury in cirrhotic rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2003; 2(1): 102-105.

Linde K. St. John's Wort-an overview. *Forsch Komplementmed*. 2009; 16: 146-155.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 265-275.

Malhi H, Gores GJ, Lemastres JJ. apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Liver Biology and Pathobiology*. 2006; 43(2): S31-S44.

Meister A, Anderson ME.: Glutathione. Ann. Rev. Biochem 1983; 52: 711.

Menegazzi M, Paola R.D, Mazzon E, Muia C, Genovese T, Crisafulli C, Suzuki H, Cuzzocrea S. *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. Free Radical Biology & Medicine. 2006; 40: 740-753.

Miller AL. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions. Alt Med Rev. 1998; 3(1): 18-26.

Montalvo-Jave EE, Escalante-Tettersfield T, Ortega-Salgado J, Piina E, Geller D.A. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 2008; 147(1): 153-159.

Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D.B, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. Ann. Surg. 1991; 213(2): 137-142.

Novelli M, Beffy P, Menegazzi M, De Tata V, Martino L, Sgarbossa A, Porozov S, Pippa A, Masini M, Marchetti P, Masiello P. St. John's Wort extract and hyperforin protect rat and human pancreatic islets against cytokine toxicity. Acta Diabetol. 2014;51(1):113-21.

Öniz H. Apoptoz: Ölmeye yatmak. SSK Tepecik Hast. Derg., 14: 1-20, 2004.

Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, Tsoulfas G. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: Current concepts. Archives of Trauma Research. 2013; 2(2): 63-70.

Parasrampur R, Shaik IH, Mehvar R. Effects of *in vivo* hepatic ischemia-reperfusion injury on the hepatobiliary disposition of rhodamine 123 and its

metabolites in isolated perfused rats livers. J Pharm Pharmaceut Sci. 2012; 15(2): 318-328.

Pondugula SR, Dong H, Chen T. Phosphorylation and protein-protein interactions in PXR-mediated CYP3A repression. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009; 5(8): 861-873.

Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. Journal of physiology and pharmacology. 2008; 59(1): 107-117.

Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, Malle E, Greve JW, Buurman W. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. The American Journal of Pathology. 2009; 175(4): 1473-1482.

Saddique Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. Ethnopharmacol. 2010; 131(3): 511-521.

Sagara G, Ogikubo O, Takeyama H, Tada T, Suzuki N, Okamoto H, Otsuka T. Comparison of effects of ischemia period in rat limb ischemia/reperfusion injury. Nagoya Med J. 2009; 50: 83-91.

Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. Gastroenterology. 2003; 125(3): 917-936.

Sindram D, Porte RJ, Hoffmann MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemia rat liver. Gastroenterology. 2000; 118(1): 183-191.

Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote

reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. Br J Pharmacol. 2000; 131(8): 1800-8.

Sündar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kırmızıbekmez H, Alper M, Yeşilada E. Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. J Ethanopharmacol. 2010; 127(2): 468-477.

Şehirli Ö, Özel Y, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Ercan F, Şener G. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Phytotherapy Research. 2008; 22: 43-48.

Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim Dergisi. 2009; 22: 5-13.

Thapa BR, Walia A. Liver function test and their interpretation. Indian Journal of pediatrics. 2007; 74: 67-75.

Van Dyke R, Scharschmidt BF. (Na,K)-ATPase-mediated cation pumping in cultured rat hepatocytes. The Journal of Biological Chemistry. 1983; 258(21): 12912-12919.

Zaman GJR, Flens MJ, Van Leusden MR, De Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxterman HJ, Borst P. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. Proc Natl Acad Sci. 1994; 91: 8822-8826.

Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Wenglinski JW. Ischemia-reperfusion injury in liver transplantation-from bench to bedside. 2013; 10(2): 79-89. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin Nort Am. 1992; 72(1): 65-83.

Wang LS, et al. St. John's Wort induces both cytochrome P450 3A4-catalyzed sulfoxidation and 2C19-dependent hydroxylation of omeprazole. Clin Pharmacol Ther. 2004; 75: 191-197.

Wang Z et al. Effect of St. John's Wort on the pharmacokinetics of fexofenadine. Clinical Pharmacol Ther. 2002; 71: 414-420.

Wang XD, Li JL, Su QB, Guan S, Chen J, Du J, He YW, Zeng J, Zhang JX, Chen X, Huang M, Zhou SF. Impact of the haplotypes of the human pregnane X receptor gene on the basal and St. John's Wort-induced activity of cytochrome P450 3A4 enzyme. British Journal of Clinical Pharmacology. 2008; 67(2): 255-261.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Belkis	Soyadı	SOYLU
Doğum Yeri	Darende	Doğum Tarihi	16.06.1988
Uyruğu	T.C.	Tel	0505 704 47 20
E-mail	blks_soylu@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Dede Korkut Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Ruhsatlandırma ve Biyoeşdeğerlilik Uzmanı	Generica İlaç San. ve Tic. A.Ş.	2011-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK: Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU**

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	95.2013.mar	Çalışma: Yüksek Lisans Tezi
	PROJE ADI	Sıçanlarda yapılan karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında St. John's wort'un etkilerinin incelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Yrd.Doç.Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER	
	DESTEKLEYİCİ		

KARAR BİLGİLERİ	Tarih <u>18.11.2013</u> Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
------------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.
----------------------	---

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile İlişkisi		Toplantıya katılım	İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var	Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürüttücü Sekreteri	Var	Yok	Evet Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var	Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	EVET HAYIR	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var	Yok	Evet Hayır	
Öğr. Gör.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet Hayır	