



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAFRA KANALI BAĞLAMA YÖNTEMİ İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER FİBROZUNA VE BEYİN HASARINA KARŞI
KÜSKÜT (*Cuscuta sp.*) BİTKİSİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÖMERCAN ALBAYRAK
DOKTORA TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. GÖKSEL ŞENER

İSTANBUL-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAFRA KANALI BAĞLAMA YÖNTEMİ İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER FİBROZUNA VE BEYİN HASARINA KARŞI
KÜSKÜT (*Cuscuta sp.*) BİTKİSİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÖMERCAN ALBAYRAK
DOKTORA TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. GÖKSEL ŞENER

İSTANBUL-2022

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 çalışması ile elde edilmemiş 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.

Ömercan ALBAYRAK

TEŞEKKÜR

Bilim sevgisi ile birleşmiş hayatımda aydınlık geleceğimin başlangıcını bana sunan, beni bu değerli ve köklü ailenin içine alarak böyle güçlü bir eğitim imkânı tanıyan, beni her şartta teşvik eden, her zaman yanımda olan, ilgi ve desteğini bir an olsun esirgemeyen, büyük bir sabırla beni yükselten, daima bana hoşgörü ve sevgiyle yol gösteren, sabırlı, fedakâr değerli hocam Prof.Dr. Göksel ŞENER'e tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini, değerli yönlendirmelerini, tavsiyelerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, saygıdeğer hocam Prof.Dr. Levent KABASAKAL'a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Çalışmamızda kullandığımız bitki ekstresini büyük bir titizlikle yapan ve farmakognozi bilgilerini bana aktaran ve sorduğum her soruya büyük bir sabırla cevap veren Doç.Dr. Ali ŞEN'e, modelin cerrahi işlemlerindeki destek ve emeklerinden dolayı Dr. Öğr.Üyesi Dilek ÖZBEYLİ'ye, kan beyin bariyer geçirgenlik ölçümündeki yardımlarından dolayı Dr. Öğr.Üyesi. Türkan KOYUNCUOĞLU'na, dokuların histoloji analizindeki desteklerinden dolayı Prof.Dr. Feriha ERCAN ve Arş.Gör. Dr. Fatma KANPALTA'ya ve dokuların biyokimyasal analizi sırasında desteklerini esirgemeyen Prof.Dr. Özge ÇEVİK'e çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarım sırasında başından sonuna kadar bana her konuda yardım eden değerli çalışma arkadaşım Seren EDE'yi minnetle selamlar; başta Vet.Hek. Deniz Mukaddes TÜRET olmak üzere, DEHAMER çalışanlarına, verdikleri destek ve yardımlarından ötürü kalbi teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman yanımda olup bana destek olan çok kıymetli Dr. Öğr.Üyesi Bahar GÖKER'e, sevgili aileme; anneannem Mubahat Külürbaşına, annem Prof.Dr. Yıldız Esra ALBAYRAK'a, ağabeyim Op.Dr. Ahmet Tevfik ALBAYRAK'a ve sevgili eşim Hande ALBAYRAK'a kalbimin derinliklerinden teşekkürü bu vesile ile bir borç bilirim.

Ömercan ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SİMGELER	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
RESİM LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Hepatik Ensefalopati	6
4.2. Safra Kanalı Bağlama ve Kolestaz.....	7
4.3. Karaciğer Yetmezliği	7
4.3.1. Reaktif oksijen / reaktif nitrojen türleri ve Oksidan Hasar	7
4.3.2. Hepatik fibrozda oksidatif stres	9
4.3.3. Karaciğer yetmezliğinde gelişen hepatik ensefalopati	10
4.3.4. Karaciğer yetmezliğinde kan-beyin bariyerinde bozulma, beyin ödemi ve hepatik ensefalopati	11
4.3.5. Karaciğer yetmezliğinde beyin ödemi ve hepatik ensefalopati.....	13
4.3.6. Karaciğer yetmezliğinde glutamin metabolizması, astrosit şişmesi, beyin ödemi ve hepatik ensefalopati	15
4.3.7. Karaciğer yetmezliğinde glutamat metabolizması, beyin ödemi ve hepatik ensefalopati	16
4.3.8. Hepatik ensefalopatide GABA'nın rolü.....	17
4.3.9. Hepatik ensefalopatide tetikleyici faktörler	20
4.3.10. Amonyanın glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmisyona etkisi.....	23
4.3.11. Karaciğer yetmezliğinde inflamasyonun hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi	26
4.3.12. Karaciğer yetmezliğinde oksidatif stresin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi	29
4.3.13. Karaciğer yetmezliğinde safra asidinin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi	30
4.3.14. Karaciğer yetmezliğinde laktik asidin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi	31
4.3.15. Karaciğer yetmezliğinde hepatik ensefalopatiyi indükleyen tetikleyici faktörler arasındaki sinerjistik ilişki.....	31
4.4. Hepatik Ensefalopatinin Oluşum Mekanizması.....	34
4.5. <i>Cuscuta</i> türleri.....	35
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37

5.1.	Hayvanlar	37
5.2.	Bitki Materyali	37
5.3.	Metanol Ekstresinin Hazırlanması	37
5.4.	<i>In Vitro</i> Çalışmalar	38
5.4.1.	DPPH radikalini süpürücü aktivite tayini	38
5.4.2.	ABTS radikal katyonunu süpürücü aktivite tayini	38
5.4.3.	<i>In vitro</i> anti-enflamatuvar aktivite	39
5.4.4.	Toplam fenol bileşik miktar tayini (TFB).....	39
5.5.	Safra Kanalı Bağlama Yöntemi	40
5.6.	Gruplar ve Deney Protokolü:	40
5.6.1.	Bilişsel (kognitif) testler.....	41
5.6.2.	Kan beyin bariyeri ölçüm yöntemi.....	42
5.7.	Serumda Yapılan İncelemeler	43
5.7.1.	Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), total bilirubin (TB) ve direkt bilirubin (DB) tayini:	43
5.8.	Dokuda Yapılan İncelemeler.....	43
5.8.1.	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz tayini	43
5.8.2.	Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- β) tayini.....	44
5.8.3.	Hidroksiprolin tayini	45
5.8.4.	8-OHdG tayini.....	47
5.8.5.	Histolojik incelemeler	48
5.9.	İstatistik Yöntemi	48
6.	BULGULAR	49
6.1.	Küsküt (<i>Cuscuta</i> sp.) Metanol Ekstresinin Anti-inflamatuvar, Antioksidan Aktiviteleri ve Toplam Fenolik Bileşik İçerikleri	49
6.2.	Karaciğer Hasarı Sonucu Gelişen Siroz ve Buna Bağlı Meydana Gelen Kulak ve İdrar Renk Değişimleri	51
6.2.1.	Siroza bağlı gelişen idrar renk değişimi.....	51
6.2.2.	Siroza bağlı gelişen kulak renk değişimi	51
6.3.	Yeni Obje Tanıma Testi Bulguları	51
6.4.	Morris Su Labirent Testi Bulguları	52
6.5.	Ağırlık Değişimi.....	54
6.6.	Kan Beyin Bariyeri Ölçümüne Ait Bulgular.....	55
6.7.	Serum Örneklerine Ait Bulgular	55
6.8.	Karaciğer ve Beyin Doku Örneklerine Ait Bulgular.....	57
6.9.	Karaciğer ve Beyin Doku Örneklerinin Histolojik Bulguları:	60
6.9.1.	Karaciğer	60

6.9.2. Beyin	61
7. TARTIŞMA	62
8. KAYNAKLAR.....	70



KISALTMALAR VE SİMGELER

8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

AHE: Akut hepatik ensefalopati

ALT: Alanin aminotransferaz

AQP4: Akuaporin-4

AST: Aspartra aminotransferaz

ATP: Adenozin trifosfat

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CaMKII: Kalmodulin kinaz-2

Cl⁻: Klorür iyonu

CM: Kalmodulin

cNOS: Yapısal nitrik oksid sentaz

CYP: Sitokrom P450

ESM: Ekstraselüler matriks

FLA2: Fosfolipaz A2

GABA: Gama-aminobutirik asit

GABAA: Gama-aminobutirik asit reseptörü

GAT-3: GABA taşıyıcısı proteininin

GFAP: Glial fibriler asidik protein

GLAST: Glial glutamat-aspartat taşıyıcısı

GLN: Glutamin

GLU: Glutamat

GS: Gultamin sentaz

GTP: Guanozin trifosfat

HE: Hepatik ensefalopati

HSH: Hepatik stellat hücreler

IL-12: İnterlökin-12

IL-1 β : İnterlökin-1 β

IL-6: İnterlökin- 6
IL-8: İnterlökin-8
IMV: İnferior mezenterik ven
IVC: İnferior vena kava
iNOS: indüklenebilir Nitrojen oksid sentaz
KA: Kainat
KBB: Kan beyin bariyeri
KHE: Kronik hepatik ensefalopati
Küs: Küsküt Otu
METAB: Metabotropik reseptör
mGluR: Metabotropik Glutamat Reseptörü
MRG: Manyetik rezonans görüntüleme
Na⁺/K⁺-ATPaz: Sodyum-Potasyum adenozin trifosfataz
NCCa-ATP: Seçici olmayan katyon kanalı
NF-kB: Nükleer faktör-kappa B (NF-kB)
NH₃: Amonyak
NKCC-1: Na⁺-K⁺-Cl⁻ kotransportör-1
NMDA: N-metil-D-aspartat
NO: Nitrik oksid
NOX: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
p38MAPK: p38 Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
PDEi: Fosfodiesteraz inhibitörü
PKG: Protein kinaz G
RNT: Reaktif nitrojen türleri
RONT: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri
ROT: Reaktif oksijen türleri
SF: Salin
sGMP: siklik Guanozin monofosfat
SK: Sıkı Kavşak
SKB: Safra kanalı bağlı

SMV: Superior mezenterik ven

SV: Dalak damarı

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

SP-1: Spesifisite proteini-1



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin ESM ve HSH'lerin üzerindeki etkileri.

Şekil 2. Hepatik ensefalopatinin patogenezinde katkıda bulunduğu bilinen tüm faktörlerin özeti

Şekil 3. Hepatik ensefalopati sırasında beyinde meydana gelen değişikliklerin gösterimi.

Şekil 4. Vazojenik ve sitotoksik ödemin patolojisi.

Şekil 5. Hiperamonemide glutamat-nitrik oksit (NO)-siklik GMP yolağı ve NMDA-GABA reseptörlerinin etkileşimi.

Şekil 6. Astrositlerde amonyağın detoksifikasyonu ve glutamin-glutamat döngüsü.

Şekil 7. Glutamat-nitrik oksit-sGMP yolağının, N-metil-D-aspartat reseptörleri üzerindeki etkisi.

Şekil 8. Beyindeki glutamat/glutaminin rolü.

Şekil 9. Astrosit hasarında inflamasyonun olası rolü.

Şekil 10. Karaciğer hastalığında KBB bozukluğu.

Şekil 11. Karaciğer yetmezliğinde hepatik ensefalopati oluşumunun moleküler yolu.

Şekil 12. Deney sonunda idrar renkleri.

Şekil 13. Deney sonunda kulak renkleri.

Şekil 14. Yeni obje tanıma testine ait fark skoru grafiğı.

Şekil 15. Morris su labirent testine ait platform bulma zaman grafiğı.

Şekil 16. Morris su labirent testine ait hedef kadranda geçen süre grafiğı.

Şekil 17. Kan Beyin Bariyeri geçirgenliğine ait sonuçlar.

Şekil 18. Serum AST, ALT sonuçları.

Şekil 19. Karaciğer dokusuna ait TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz ve Hidroksiprolin sonuçları.

Şekil 20. Beyin dokusuna ait TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz ve Hidroksiprolin sonuçları.

Şekil 21. Deney gruplarındaki karaciğer numunelerinin ışık mikrografları

Şekil 22. Deney gruplarındaki serebral korteks numunelerinin ışık mikrografları.

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Küsküt (*Cuscuta* sp.), yeşil bitkilerin üzerindeki sarı renkli sarmaşık asalak yapılar olarak gösterilmiştir.



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. *Cuscuta* türünün Antioksidan/Anti-inflamatuvar Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşik İçeriği

Tablo 2. Grupların deney başında (t1) ve deney sonunda (t2) ölçülen vücut ağırlıkları.

Tablo 3. Serum AST, ALT, DB TB değerleri.

Tablo 4. Karaciğer dokusunda TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz, Hidroksiprolin değerleri.

Tablo 5. Beyin dokusunda TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz, Hidroksiprolin değerleri.

1.ÖZET

Tezin Başlığı: Safra Kanalı Bağlama Yöntemi ile Oluşturulan Karaciğer Fibrozuna ve Beyin Hasarına Karşı Küsküt (*Cuscuta* sp.) Bitkisinin Etkinliğinin Araştırılması

Öğrencinin Adı, Soyadı: Ömercan ALBAYRAK

Danışman Adı, Soyadı: Prof.Dr. Göksel ŞENER

Programın Adı: Farmakoloji

Amaç: Bu çalışmada küsküt otundan elde edilen ekstrenin safra kanalı bağlama (SKB) yöntemi ile sıçanlarda oluşturulan karaciğer hasarına ve ona bağlı gelişen ensefalopatiye karşı olası bağlı koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sprague Dawley sıçanlar Kontrol, Küsküt (Küs), SKB ve SKB+Küs olarak 4 gruba ayrılmıştır. Safra bağlama işlemi safra kanalının çift ligasyonu ile yapılmıştır. 28 gün boyunca serum fizyolojik (SF) ya da 250 mg/kg küsküt otu ekstresi oral gavaj ile verilmiştir. 28. günün sonunda yeni obje tanıma ve Morris su labirent testleri ile bilişsel değerlendirmeler yapılmıştır. Deney sonunda grupların yarısında kan beyin bariyeri ölçümü yapılırken diğer yarısı dekapite edilerek serum ve doku örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinde AST (aspartat aminotransferaz), ALT (alanin transaminaz), DB (direkt bilirubin) ve TB (total bilirubin), karaciğer ve beyin dokularında ise TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz, hidrokspirolin tayinleri ve histolojik incelemeler yapılmıştır.

Bulgular: Safra kanalı bağlı hayvanlarda bilişsel performansın düşük olduğu ve kan-beyin-bariyeri (KBB) geçirgenliğinin arttığı bulunmuştur. Kolestaz gelişen sıçanların serum ALT, AST, TB ve DB düzeyleri ile dokularda TGF- β , 8-OHdG ve hidrokspirolin düzeyleri yüksek Na⁺/K⁺-ATPaz düzeyleri düşük bulunmuştur. Küsküt tedavisi bilişsel performansı, KBB geçirgenliği ve biyokimyasal parametreler anlamlı derecede ($p < 0,05-0,001$) tersine çevrilmiştir. Histolojik sonuçlar biyokimyasal sonuçları desteklemiştir.

Sonuç: Çalışmamız küsküt otunun kolestaza bağlı karaciğer hasarında ve bu hasarın neden olduğu ensefalopatide faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fibroz, karaciğer, beyin hasarı, küsküt

2.SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of the Efficacy of Dodder (*Cuscuta sp.*) Plant Against Liver Fibrosis and Brain Damage Caused by Bile Duct Ligation Method

Students Name, Surname: Ömercan ALBAYRAK

Supervisor Name: Prof.Dr. Göksel ŞENER

Program Name: Pharmacology

Purpose: It was aimed to investigate the possible protective effect of the extract of *Cuscuta sp.* against liver damage and related encephalopathy in rats by the bile duct ligation (BDL) method.

Materials and Methods: Sprague Dawley rats were divided into 4 groups as Control, *Cuscuta sp.* (Cus), BDL and BDL+Cus. Method of BDL was performed by double ligation of bile duct. For 28 days, physiological saline or 250 mg/kg of *Cuscuta* extract was given by oral gavage. The end of 28th day, cognitive evaluations were applied with new object recognition and Morris water maze tests. The end of the experiment, blood-brain barrier (BBB) measurements were made in half of the groups, while the other half was decapitated and serum and tissue samples were taken. AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine transaminase), DB (direct bilirubin) and TB (total bilirubin) in blood samples while TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPase, hydroxyproline determinations in liver and brain tissues and histological examinations were performed.

Results: Cognitive performance was found to be low and BBB permeability increased with BDL. Rats with cholestasis had high ALT, AST, TB, DB levels in serum and also TGF- β , 8-OHdG, hydroxyproline levels in tissues and low Na⁺/K⁺-ATPase levels. Cognitive performance, BBB permeability and biochemical parameters were significantly reversed ($p < 0,05-0,001$) while in *Cuscuta*. Histologically supported biochemical results.

Conclusion: Our study suggests that *Cuscuta sp.* may be beneficial in liver damage due to cholestasis and encephalopathy.

Keywords: Fibrosis, liver, brain damage, *cuscuta sp.*

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Safra kanalı bağlama (SKB) metodu, sıçanlarda deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir (Montilla ve ark., 2001). Safra kanalı bağlanmış sıçanlarda, karaciğerde hücre dışı matriks proteinlerin oluştuğu ve bu modelin karaciğer hasarı gelişimi için uygun bir model olduğu bildirilmiştir. Ligasyon (Bağlama); karaciğer hücrelerinde oksidatif hasara ve nihai olarak da karaciğer fibroza sebep olur ve sonuçta siroza yol açmaktadır (Kountouras ve ark.,1984; Marley,1999). Bağlama sonucu safra yolunun tıkanması ve akışın engellenmesi ile safranin veya safra ile atılan toksik maddeler karaciğerde birikerek hasara neden olur. Karaciğer metabolik homeostazın düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Bu nedenle, oluşan karaciğer hasarı ile fonksiyon kaybına, karaciğer yetmezliğine ve ölüme (Law, 2005) yol açabilir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu kanda bilirubin, üre ve amonyak gibi toksik maddelerin birikmesine neden olur (Damink ve ark., 2009; Felipo, 2013) ki bu biriken toksik metabolitler de beyin fonksiyonunu etkileyebilir ve hepatik ensefalopati (HE) olarak adlandırılan nörolojik ve psikolojik değişikliklere yol açabilir. Safra kanalındaki tıkanma, karaciğer yetmezliği, ve fibrozis HE gelişiminde altta yatan önemli faktörlerdir (Butterworth ve ark., 2009)..

Safra yollarının tıkanması sonucu safranin karaciğerden barsağa akışının engellenmesi ile bir dizi metabolik değişiklikler meydana gelir: hepatositlerdeki mitokondriyal fonksiyon değişiklikleri, yağ asidi oksidasyonunda azalma, karaciğer ve plazmadaki hidrofobik safra asitlerinin konsantrasyonundaki artışlar. Bu faktörler inflamatuvar yanıtlara ve bu yanıtlar aracılığı ile hepatositlerin ölümüne ve nihayetinde karaciğer yetmezliği ile de biriken toksinler HE' ye neden olabilir (Butterworth ve ark., 2009). Hiperamonyemi, HE patogenezinde önemli bir faktördür (Rose, 2012a). Hepatik ensefalopatide, amonyak gibi toksinlerin atılmayarak arttığı ve amonyağın santral sinir sistemine girdiği bilinmektedir.

Amonyak beyinde astrositlerde glutamine dönüştürülerek detoksifiye edilir böylece amonyak konsantrasyonu düşmüş olur ve daha sonra glutamin de astrositlerde glutamata

çevrilir (Savlan ve ark., 2014), beyindeki glutamat artışı HE' nin bir biyokimyasal bir belirteci olarak değerlendirilir (Rama Rao ve ark., 2012; Rothman ve ark., 2012). Hastalık ilerledikçe, motor fonksiyon ve zihinsel yetenekler bozulur. Hastalar dikkat, öğrenme, hafıza ve bilinç gibi fonksiyonlarda düşüş gösterirken, hareket ve görme algısında da bozulmalar yaşayabilirler (Blei ve ark., 2002; Weissenborn ve ark., 2005). Bu değişiklikler HE' li hastalarda yaşam kalitesini etkiler ve günlük aktivitelerde bozulmaya yol açabilir (Patel ve ark., 2014).

Karaciğer fibrozisin gelişimini engellemek, durdurmak ve geri çevirmek için çok sayıda deneysel çalışma yapılmaktadır. Fibrozisin tedavisinde kabul edilmiş standart bir yöntem bulunmamaktadır. Çeşitli ilaçlar, antioksidan maddeler, antimitojenik faktörler, bitki ekstreleri fibrozisi önlemek veya tedavi etmek için kullanılmıştır (Tahan ve ark., 2007).

Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisi için tıbbi bitkiler ve ürünler oldukça önemli yerleri vardır (Singh ve ark., 2012). Antik çağlardan beri, bitki ve bitki ekstresi insanlar tarafından sıkça kullanılmaktadır. Kullanılan birçok geleneksel ilaç, şifalı bitkilerden, mineraller ve organik maddelerden elde edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında tıbbi amaçlar için kullanılan yaklaşık 21.000 bitki listelemiştir. Bunlar arasında 150 tür ticari amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (DeLoach ve Lewis, 2004; Joseph ve Jini, 2011). Yapılan detaylı literatür taramasında farklı *Cuscuta* türlerinin antitümör, antimikrobiyal, hepatoprotektif, antikonvülsan, immünoestimülatör, antioksidan, α -glukosidaz inhibisyonu, psikofarmakolojik, saç büyümesini teşvik edici, anti-steroidojenik, anti-inflamatuvar, diüretik, analjezik, antipiretik, anti-HIV, antidiyabetik, nöroprotektif, antiülser, antispazmodik, hemodinamik, bradikardi, antihipertansif, kardiyotonik ve kas gevşetici gibi etkilere sahiptir (Noureen ve ark., 2019).

Ülkemizde de geleneksel tıpta bazı bitkilerin karaciğer-safra rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu türlerden biri de halk tarafından sarılığın tedavisinde kullanılan *Cuscuta* türleridir. Arap cinsaçı, bağboğanotu, boğmacaotu, bostanbozan, cazısaçı, cinsaçı, eftimon, gelinsaçı, göktenyağan, ince bağboğanotu, kâfırsaçı, kızılıkurtotu, kızıl sarmaşık, koç bostanbozan, küşüt, küt bostanbozan, tekcinsaçı, top

bostanbozan, uslu cinsaçı, serend, şeytansaçı, som bostanbozan, som kızilkurtotu, zar bostanbozan isimlerle bilinen *Cuscuta* türleri özellikle ülkemizde Bostanbozan ismiyle tanınan bir veya çok yıllık, klorofilsiz ve asalak bitkilerdir. Ayrıca Mardin ve yöresine özgü olarak “İkşut” ismiyle bilinirliği yüksek olan küsküt bitkisi İngilizcede ‘Dodder’ ismiyle tanınır (Erecevit Sönmez ve ark., 2019; Koca-Caliskan ve ark., 2018a). *Cuscuta* türleri Mardin ilinin yanı sıra Denizli, Diyarbakır, Manisa’da halk tarafından sarılığın tedavisinde kullanılır. Aynı zamanda bu türlerin diüretik, karminatif, müshil ve safra söktürücü olarak geleneksel kullanıma sahip oldukları rapor edilmiştir (Sari ve ark., 2010). *Cuscuta* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda bu türlerin flavonoidler (Kersetin, hiperozit vd.), alkaloidler (Kuskutamin, lupanin vd.), glikozitler (Kuskutin, Kuskutozit-A ve B vd.), steroid ve steroller (Kampesterol, sesamin vd.), triterpenler (Lupeol, ursolik asit vd.), karotenoidler (Lutein, likopen), yağ asitleri (Oleik asit, linolenik asit) ve diğer bileşikler (Kuskutalin, amarvelin vd.) taşıdığı ortaya çıkarılmıştır (Ahmad ve ark., 2017).

Bu çalışmada, sıçanlarda SKB yöntemi ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı *Cuscuta* sp. ekstresi kullanarak potansiyel tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hepatik Ensefalopati

Hepatik ensefalopati (HE)'nin tanımı, isimlendirilmesi, tanısı ve dereceleri oy birliği ile 2002 yılında kabul edilmiş ve yayımlanmıştır. Buna göre üç HE tipi belirlenmiştir (Díaz-Gómez ve ark., 2011; Jover ve ark., 2005): Tip A: Akut karaciğer yetmezliği ile ilişkili, Tip B: Porto-sistemik iletişim ile ilişkili, Tip C: Karaciğer sirozu ile ilişkili.

Hepatik ensefalopati, karaciğer yetmezliği olan hastalarda görülen yaygın bir nöropsikiyatrik komplikasyondur (Choudhury ve Borah, 2015; Kornerup ve ark., 2018; Rodrigo ve Felipe, 2006). Karaciğer yetmezliği gelişen hastalarda iki tip HE vardır: Kronik HE (KHE) ve Akut HE (AHE) (Bleibel an Al-Osaimi, 2012). Kronik HE (porto-sistemik ensefalopati) genellikle alkolik karaciğer sirozu gelişen hastalarda görülür ve kişilikte bozulma, değişmiş ruh hali, azalmış entelektüel kapasite, anormal kas tonusu ve titreme dahil olmak üzere gerilemiş nörolojik fonksiyonlar ile karakterizedir (Lockwood ve ark., 1991). Akut hepatik ensefalopati, akut karaciğer yetmezliğinde ortaya çıkmış olup genellikle viral hepatit (hepatit B ve C), hepatik neoplazmlar, vasküler hasar, aşırı asetaminofen kullanımı veya diğer hepatotoksinlere bağlı hepatositlerde meydana gelen ağır nekrozların sonucu ile ortaya çıkar (Mair ve ark., 2011; Trautwein ve Koch, 2014). Akut hepatik ensefalopati, ani deliryum, nöbet ve koma ile ilişkilidir (Siew ve ark., 2017). Ayrıca merkezi sinir sisteminde meydana gelen bozulma şiddeti West Haven sınıflandırmasına göre 4 derecelidir: hafif zihinsel değişiklikler (derece I), zamansal ve uzamsal algı bozukluğu (derece II), kafa karışıklığı ve tutarsız konuşma (derece III) ve derin koma (derece IV) (Choudhury ve Borah, 2015). (Şekil 2).

Akut HE ve kronik HE sırasıyla; gizli (kovert) ve aşikar (overt) HE (Patidar ve Bajaj, 2015) şeklinde iki ana derecede sınıflandırılmıştır. Gizli HE, nörolojik zayıflama, kişilik değişiklikleri, zayıf hafıza, uyku problemleri, azalmış konsantrasyon, bilgi işleme hızında

ve motor koordinasyonunda düşme, araba sürmek gibi günlük aktivitelerde önemli ölçüde düşüş ve belirti göstermeyen (subklinik) semptomlarla karakterizedir (Ferenci, 2017; Jayakumar ve ark., 2015). Gizli HE; uyuşukluk, oryantasyon bozukluğu, asteriks (istemsiz el titremeleri) ve koma gibi klinik semptomlarla hastanın sağkalımı üzerinde olumsuz etkilere sebep olarak aşikar HE'ye dönüşebilir (Stewart ve Smith, 2007). Sirozlu hastaların % 80'inden fazla gizli HE'ye sahipken; son dönem karaciğer yetmezliği olan hastaların % 30' u hastanede kalışın (hospitilizasyon) çok önemli olduğu bir dönem içindedir ve aşikar HE (Romero-Gómez ve ark., 2001)'yi geliştirebilir. Bu nedenle HE, hastanın ve sağlık sistemi üzerinde sosyoekonomik açıdan bir yük olarak sayılmıştır (Neff, 2010).

4.2. Safra Kanalı Bağlama ve Kolestaz

Safra kanalı bağlama (SKB) yöntemi, yüksek tekrarlanabilirliği ve güvenliği nedeniyle kolestaz oluşturmak için en yaygın ve en uzun süre kullanılan deneysel modeldir. Bu model orta ventral laparotomi ve ortak safra kanalının duodenum üzerinde izole edilmesi, ardından safra kanalının çift ligasyonunu ve ligatürler arasında diseksiyon ile oluşturulur; böylece obstrüktif kolestaz geliştirilmiş olur (Tag ve ark., 2015). Kısaca, SKB, çeşitli karaciğer hasarlarında olduğu gibi, hepatik progenitör hücrelerin aktivasyonuna bağlı olarak kolanjiyositlerin proliferasyonunu indükleyerek duktüler reaksiyon sonucu kanallarda hiperplazi, kolestaz, portal inflamasyon ve biliyer fibrozise neden olur (Aller ve ark., 2010; Geerts ve ark., 2008; Tag ve ark., 2015).

4.3. Karaciğer Yetmezliği

Karaciğer yetmezliğinde fibroz gelişimi ve fibrozun oluşumunda da oksidatif stresin rolü bilindiğinden bu bölümde önce reaktif oksijen ve nitrojen türleri anlatılacaktır.

4.3.1. Reaktif oksijen / reaktif nitrojen türleri ve Oksidan Hasar

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip, genellikle kararsız ve oldukça reaktif olan atomlar/moleküllerdir (Muriel, 2009). Biyolojik sistemlerde iki tür serbest radikal mevcuttur: oksijenden türetilen reaktif oksijen türleri (ROT) ve azottan türetilen reaktif nitrojen türleri (RNT). Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (RONT)'nin serbest radikallerin

neden olduğu lipid peroksidasyonu, DNA zincirlerindeki kırılmalar ve oksitlenmiş proteinler hücrelerin zarar görmesine aracılık edebilir (Casas-Grajales ve Muriel, 2017; Li ve ark., 2015). Reaktif oksijen türleri ve RNT'nin organizmada belirli miktarları önemli fizyolojik etkilere de sahiptir. Organizmada endojen antioksidanların üretimi ile ROT/RNT arasındaki denge sayesinde organizmanın normal işlevi devam eder ve aşırı radikallerin oluşumu da engellenir (Ramos-Tovar ve Muriel, 2020b). ROT/RNT birikimine neden olan bir dengesizlik, oksidatif/nitrozatif stres olarak tanımlanmıştır. Oksidatif/nitrozatif stresin, hepatik hastalıklar dahil çeşitli patolojilerde rol oynadığı gösterilmiştir (Ramos-Tovar ve Muriel, 2020a).

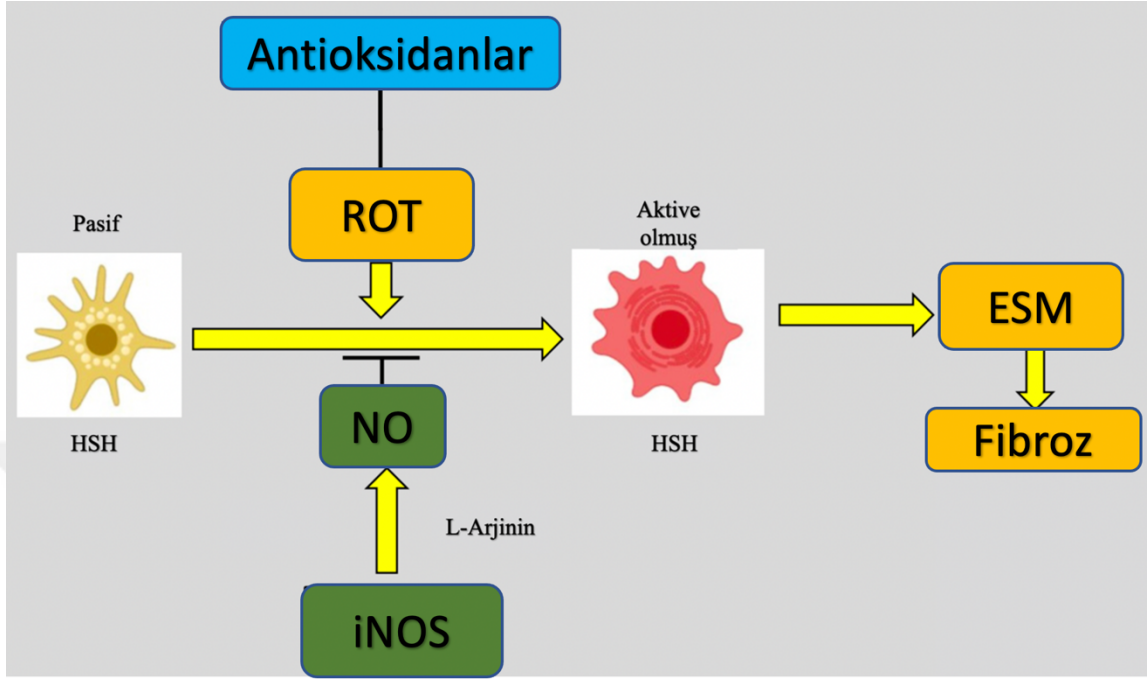
Oksidatif stres, kanser, diyabet, nörolojik hastalık ve karaciğer hastalığı gibi çeşitli patolojilerde önemli bir faktördür (Cichoz-Lach ve Michalak, 2014; Giacco ve Brownlee, 2010; Li ve ark., 2015). Bununla birlikte, ROT düşük konsantrasyonlarda; hücre yapılarının olgunlaşma süreçlerinde, sinyal yollarında ikinci haberciler olarak ve patojenlere karşı rol oynar (Li ve ark., 2015; Valko ve ark., 2006). Karaciğerde bulunan mitokondriler ROT üretim kapasitelerinden dolayı önemli bir role sahiptirler (Brown ve Borutaite, 2012). Özellikle, CYP enzimleri de karaciğerde ROT oluşumunda önemli bir rol oynar (Cederbaum, 2017). Bu enzimler ksenobiyotiklerin yaklaşık dörtte üçününün metabolizmasını faz I metabolizma evresinde gerçekleştirir (Guengerich, 2008). Sitokrom P450 enzimleri ile ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin karaciğerdeki metabolizması, ROT ve biyoaktif ara maddelerin oluşması oksidatif strese yol açar ve bu şekilde karaciğer hasarı ve kanser gibi hepatik hastalıklara neden olabilir (Ushioda ve Nagata, 2019).

Nitrozatif strese neden olan RNT içinde en çok araştırılan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından aşırı ve dengesiz sentezlenen nitrik oksit (NO)'tir. Nitrik oksit sentazlar, arginin amino asitini kullanarak NO'yu sentezler (Casas-Grajales ve Muriel, 2017; Muriel, 2009). Nitrik oksit, ikincil bir haberci olarak kan basıncının düzenlenmesinde endotel gevşetici faktör olarak görev alan bir biyolojik bir faktör olduğu kadar, aşırı üretilmiş NO tümör hücresi oluşumlarını indükleyebilmektedir (Jerca ve ark., 2002; Pacher ve ark., 2008).

Ayrıca yapılan çalışmalar, NO' nun karaciğerde önemli fizyolojik ve patolojik roller oynadığını da göstermiştir (Ramos-Tovar ve Muriel, 2020b).

4.3.2. Hepatik fibrozda oksidatif stres

Reaktif oksijen türleri çoğu hücreler tarafından normal fizyolojik fonksiyonlar için ve ekzojen zararlılara; mikroplara ve virüslere karşı bir savunma mekanizması olarak üretilir (Veterans, 2012). Hepatik makrofajlar (Kupffer hücreleri), sinüzoidal endotelial hücreler, hepatositler ve hepatik stellat hücreleri (HSH'ler) ROT üretebilme yeteneğine sahiptir (Altenhöfer ve ark., 2012; Crosas-Molist ve Fabregat, 2015). Reaktif oksijen türleri akut ve kronik karaciğer hasarı sırasında inflamatuvar mediyatörlerin hücrelere infiltre olması sonucu üretilebilirler (Nanji ve ark., 1994; Nordmann ve ark., 1992). Artan ROT seviyeleri, hepatositlerin apoptotik/nekrotik ölümü ve karaciğer yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir (Jaeschke ve ark., 1996; Ziol ve ark., 2001). Reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünleri, hepatositlerde hasara neden olmasının yanı sıra aktive olmamış/pasif HSH'leri oldukça aktif ve proliferatif bir miyofibroblast benzeri fenotipe dönüşümünü indükleyebilirler (Wells, 2014; Wells ve Schwabe, 2015). Reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünleri ayrıca aktifleştirilmiş HSH'ler aracılığı ile ekstraselüler matriksin (ESM) sentezini de uyarır (Veterans, 2012). Aşırı miktarda ESM birikmesi, karaciğerdeki fibroz ve sirozun birincil mekanizması olmuştur (Arriazu ve ark., 2014). Bu bilgiler ışığında ROT ile HSH'lerin arasındaki etkileşimin bu patolojide önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Veterans, 2012) (Şekil 1).

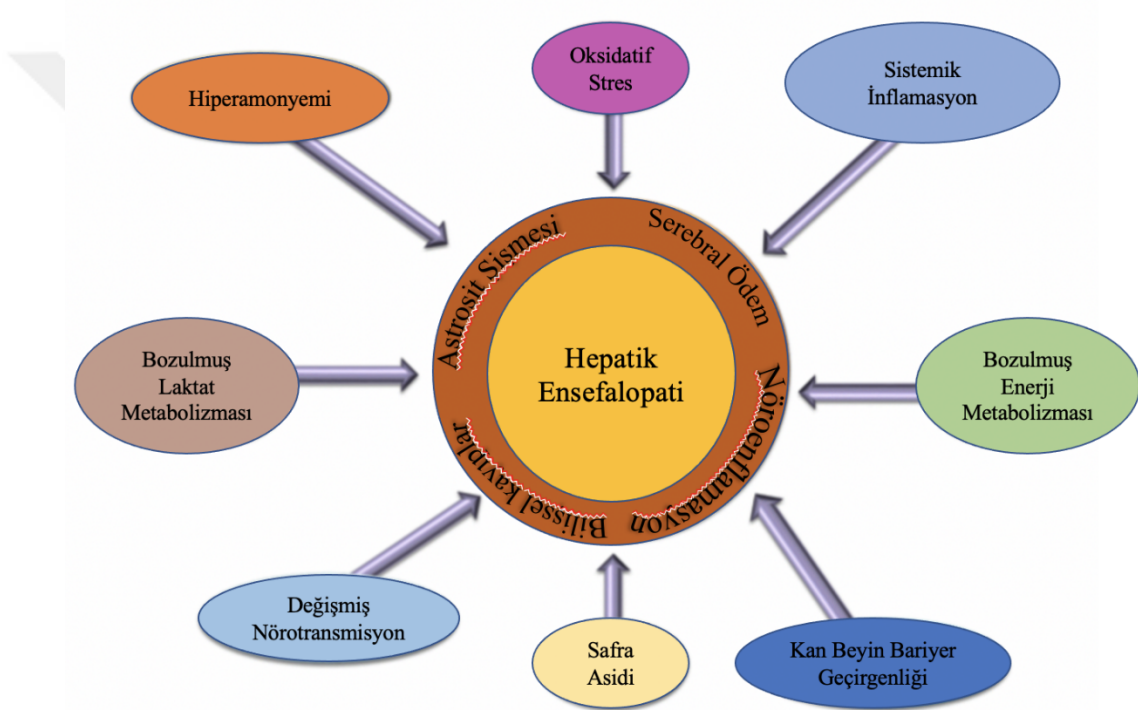


Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin ESM ve HSH'lerin üzerindeki etkileri. Reaktif oksijen türleri, ESM üretebilen bir fenotipe sahip olan bu aktive olmamış HSH'leri aktif ederek, ESM'nin birikimine yol açarak fibroza, siroza ve HSK'ya yol açabilir. Antioksidanlar ve NO, ROT ile indüklenen HSH aktivasyonunu inhibe ederek antifibrotik roller oynamaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), substrat olarak L-arginin kullanarak karaciğerde büyük miktarlarda NO sentezleyebilir. ESM: Ekstraselüler matriks, NO: Nitrik oksit, iNOS: indüklenebilir Nitrik oksit sentaz, ROT: Reaktif oksijen türleri, HSH: Hepatik stellat hücreleri HSK: Hepatoselüler karsinom (Ramos-Tovar ve Muriel., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır)

4.3.3. Karaciğer yetmezliğinde gelişen hepatik ensefalopati

Karaciğer yetmezliğinde HE'nin patolojik temeli karmaşık olup birçok sebebi vardır (Butterworth, 2019). Hepatik ensefalopati'den sorumlu kesin mekanizmalar tam olarak karakterize edilememiştir; bununla birlikte, sirozlu hastalarda nörolojik hasarın gelişmesinden, kanda konsantrasyonu artan tetikleyici faktörlerin sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Cordoba, 2014). Kanda özellikle amonyak konsantrasyonunun artışı, beyinde hiperamonyemiye neden olup HE'li sirozlu hastalarda ve HE'li hayvan modellerinde görülen beyindeki astrosit şişmesi ve beyin ödemi gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Bosoi ve Rose, 2013a; Choudhury ve Borah, 2015; Rodrigo ve Felipo, 2006). Dolayısıyla karaciğer yetmezliği kaynaklı hiperamonyemi, astrosit şişmesi ve beyin ödemine, nörolojik fonksiyon bozukluğuna, HE'ye, kimyasal homeostazi değişimlerine ve glutamaterjik nörolojik iletim bozukluklarına neden olmaktadır. (Felipo

ve Butterworth, 2002; Hermenegildo ve ark., 1998; Lombardi ve ark., 1994; Marcaida ve ark., 1995; Michalak ve ark., 1997; Minana ve ark., 1997; Monfort ve ark., 2002; Moroni ve ark., 1983; Raghavendra Rao ve Murthy, 1991; Sepehrinezhad ve ark., 2020). Amonyak dışında inflamasyon, oksidatif stres, artmış safra asitleri ve laktat gibi diğer sistemik faktörler de HE'nin gelişmesinde önemli faktörler arasındadır (DeMorrow ve ark., 2017) (Şekil 2).

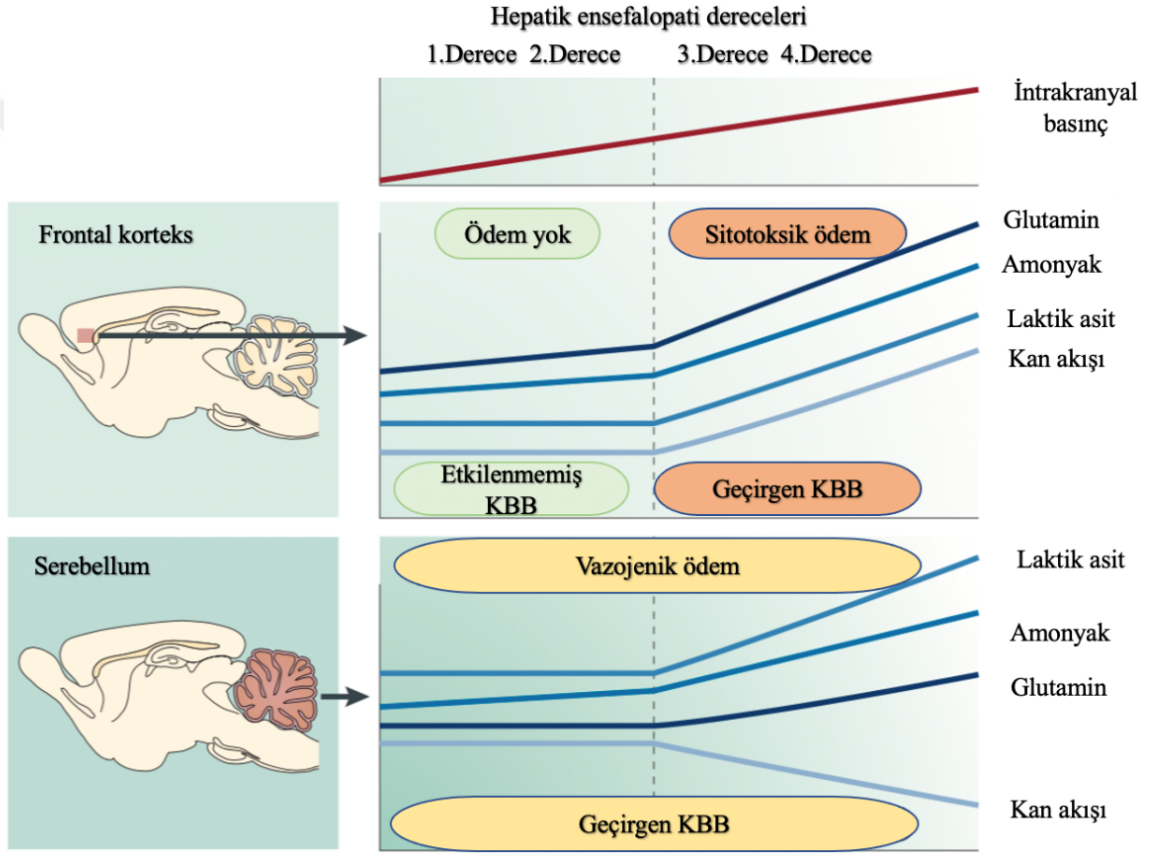


Şekil 2. Hepatik ensefalopatinin patogenezi katkıda bulunduğu bilinen tüm faktörlerin özeti (Liere ve ark., 2017' den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.4. Karaciğer yetmezliğinde kan-beyin bariyerinde bozulma, beyin ödemi ve hepatic ensefalopati

Beyin ödemi, sitotoksik ve vazojenik olmak üzere iki patofizyolojik süreç nedeniyle ortaya çıkabilir (Michinaga ve Koyama, 2015). Vazojenik beyin ödemi, kan-beyin bariyeri (KBB)'nin yıkımı ile başlar ve daha sonra ozmotik değişimlerle devam eder: beyin hipertansitesi sonucu beyin içine su akışı gerçekleşir. Glutamin, amonyak ve laktik

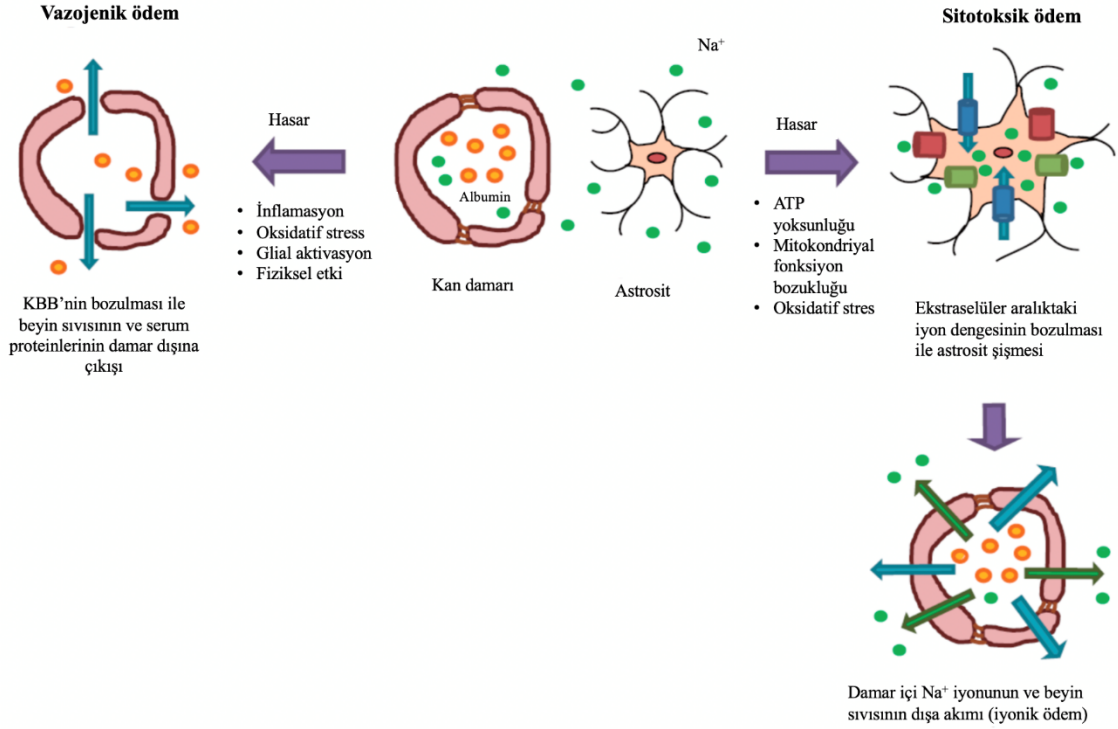
asit konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir (Bosoi ve Rose, 2013a; Stokum ve ark., 2015). Sitotoksik beyin ödeminde hücresel değişiklikler vardır; KBB'de fiziksel bir bozulma olmadan ozmotik gradyan fonksiyonları ile ilgilidir. Glutamin, amonyak, laktik asit ve kan akışında artış gözlemlenmiştir (Lemberg ve Fernández, 2009) (Şekil 3).



Şekil 3. Hepatik ensefalopati sırasında beyinde meydana gelen değişiklikler. Karaciğer yetmezliği beyin farklı alanlarını farklı şekillerde etkiler. Karaciğer yetmezliğinin erken evrelerinde, frontal korteksin kan-beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği ve ödemi üzerinde somut bir etkisi yoktur, oysa serebellumda (beyincik) artmış KBB geçirgenliği ve vazojenik ödem kendini gösterir. Karaciğer yetmezliğinin erken evrelerinde kan akış hızı ve laktik asit konsantrasyonu etkilenmez, ancak daha sonraki aşamalarda (hepatik ensefalopatinin 3. ve 4. dereceleri), beyincikte artmış laktik asit ve azalmış kan akışı kendini gösterir. Ayrıca, frontal kortekste sitotoksik ödem ve artmış kan akışı kendini gösterir. (Felipo, 2013' ten değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.5. Karaciğer yetmezliğinde beyin ödemi ve hepatik ensefalopati

Beyin ödemi, ozmotik bir değişim sonucu beynin hücre içi veya hücre dışı alanlarında aşırı sıvı birikimi (esas olarak su) olarak tanımlanır (Jha, 2003). Beyin ödeminin HE ile ilişkisi yaygın olarak kabul edilmiştir (Rabinstein, 2010). Vasküler kompartmandan beyin içine sıvı girişi (vazojenik ödem) beyin hacmini artırır bunun bir sonucu olarak da kafa içi basıncı yükselir ve yüksek bir mortalite oranına sahip olan “beyin sapı sıkışması”na yol açabilir (Bémeur ve ark., 2016; Fix, 2013; Jover ve ark., 2005; Shawcross ve Wendon, 2012). Vazojenik ödem esas olarak KBB’yi oluşturan sıkı endotel kavşakların yıkımı ile meydana gelirken (Bosoi ve Rose, 2013a) hücrel metabolizmanın bozulması ise glial hücre membranındaki sodyum-potasyum pompasının işleyişini değiştirir ve ozmotik değişimler sonucu bazı moleküllerin birikmesine neden olur; bunun bir sonucu olarak da hücrede sodyum ve su tutulumu gerçekleşir — sonuçta sitotoksik ödem gelişir (Bosoi ve Rose, 2013a; Norenberg ve ark., 2005; Unterberg ve ark., 2004). Sitotoksik ödem hücre içi şişmeye neden olarak gösterilse de, KBB'nin geçirgenliğindeki artış sonrası da ortaya çıkabilir (Cudalbu ve Taylor-Robinson, 2019) (Şekil 4).



Şekil 4. Vazojenik ve sitotoksik ödemin patolojisi. Vazojenik ödem: Beyin yaralanmalarından sonra endotelin sıkı bağlantıları, inflamatuvar reaksiyonlar ve oksidatif stres tarafından bozulur. Ayrıca, aktive edilmiş glial hücreler vasküler geçirgenlik faktörlerini ve inflamatuvar faktörlerini serbest bırakır ve bu faktörler kan-beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğini artırır. Bu olaylar, sıvının ve albuminin ekstrasvazasyonuna (damar dışına çıkışına) neden olarak serebral parankimdeki sıvının hücre dışına birikmesine yol açar. Sitotoksik ödem: Beyin hasarı ile hücre içi ATP konsantrasyonunda düşüş sonrası ATP yoksunluğu meydana gelir; bu da beraberinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ve oksidatif stresi doğurur. Bu olaylar hücre içi iyon dengesinin bozulmasına neden olur. Sonuç olarak; astrositlerin içine Na⁺ iyon girişi ile aşırı hücre dışı sıvı girişi olur ve bu da astrosit şişmesine yol açar. Damar içinden Na⁺ iyon çıkışı, serebral parankimde hücre dışı sıvı birikimine neden olur. Mavi oklar; sıvı akışı, yeşil oklar; Na⁺ iyon akışı, turuncu küreler; albumin, yeşil küreler; Na⁺, mavi sütunlar; su kanalı, yeşil sütunlar; iyon taşıyıcı ve kırmızı sütunlar; iyon kanalı. (Michinaga ve Koyama, 2015' ten değiştirilerek kullanılmıştır)

Astrositler, KBB'nin önemli bileşenleridir ve beyin homeostazını sürdürerek nöronları eksitotoksositeye karşı korurlar; bu nedenle astrositlerdeki işlevsel bozulmalar beyin ödeminde ve nöronal değişikliklerde önemli bir etkidir (Stokum ve ark., 2015). Hepatik ensefalopati hastalarında postmortem (ölüm sonrası) incelemelerine bakıldığında beyin dokusunda astrositoz sonucu Alzheimer tip II olarak adlandırılan morfolojik değişiklikler (şişme dahil) gözlemlenmiştir (Hazell ve Butterworth, 1999; Martin ve ark., 1987; Norenberg ve ark., 2005)

Elektron mikroskobu kullanılarak safra kanalı bağı (SKB) sıçanların beyin dokuları incelenmiş ve astrosit şişmesi bildirilmiştir (Wright ve ark., 2007). Bu nedenle karaciğer yetmezliğinde astrositlerin morfolojik ve fonksiyonel bozulması, nöronal işlevi aksatacak nitelikte olmasının yanı sıra beyin ödemi ve HE etiolojisinde merkezi bir rol oynar. Astrosit şişmesine bağlı beyin ödemi açıklayabilecek mekanizmalar olarak akuaporin 4 (AQP4) kanalının mekanizmasındaki düzensizliği (Abo El gheit ve ark., 2020; Tang ve Yang, 2016), beyin sodyum ve potasyum homeostazındaki değişiklikler (Stokum ve ark., 2015), astrosit içindeki glutamin sentezindeki değişimler (Albrecht ve Norenberg, 2006) ve hücre dışı glutamat konsantrasyonundaki artış sayılabilir (Stokum ve ark., 2015).

4.3.6. Karaciğer yetmezliğinde glutamin metabolizması, astrosit şişmesi, beyin ödemi ve hepatik ensefalopati

Bir amino asit olan glutamin, amonyak detoksifikasyonunun son ürünüdür. Astrositlerdeki amonyak glutamat ile birleşerek yaklaşık olarak glutamatın %85'i glutamine dönüşür (Albrecht ve Norenberg, 2006). Glutamin HE ve beyin ödemi nörofizyolojisinde yer alan temel aminoasittir.—Beyin omurilik sıvısının (BOS) biyokimyasal değerlendirmelerine göre, HE'nin şiddeti ile glutamin seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon görünmüştür (Albrecht ve Norenberg, 2006). Benzer şekilde; manyetik rezonans spektroskopisi ile yapılan bir *in vivo* çalışmada, karaciğer yetmezliği sonucu gelişen HE'ye paralel olarak glutamin sinyalinde de artış bildirilmiştir (Albrecht ve Norenberg, 2006). Hepatik ensefalopatili sirotik hastalardan alınan postmortem beyin dokusunda yapılmış yüksek basınçlı sıvı kromatografisi floresan çalışmalarına göre, beyin glutamini artmıştır bu artış en çok, prefrontal kortekste gözlemlenmiştir (Albrecht ve Norenberg, 2006).

Glutamin sinyalindeki artışın, astrosit şişmesinde ve karaciğer yetmezliğinde meydana gelen beyin ödemindeki etkisinin yanında sinyalin bu artışı hiperamonyemi ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Damink ve ark., 2009). Bu bağlamda; beyin ödemi ve sitotoksik astrosit şişmesinin astrositlerde hipertonsiteye neden olan glutaminin yarattığı ozmotik basınç değişimlerine neden olduğu sonucuna varılmıştır (Albrecht ve Norenberg, 2006; Jover ve ark., 2005).

Ek olarak; beyin ödemi, sitoplazmada bulunan glutaminin astrositlerin mitokondrileri üzerinde aşırı oksidatif hasar oluşturur. Bu da astrosit şişmesine yol açan mitokondriyal geçirgenlik artışı ile ilişkili bulunmuştur (Norenberg ve ark., 2007; Rama Rao ve ark., 2014).

4.3.7. Karaciğer yetmezliğinde glutamat metabolizması, beyin ödemi ve hepatik ensefalopati

Bir amino asit olan glutamat, merkezi sinir sistemde ana uyarıcı nörotransmitterdir ve glutamat konsantrasyon değişimleri karaciğer yetmezliğinde HE dahil, nörolojik problemlerle ilişkili bulunmuştur (Lemberg ve Fernández, 2009). Glutamat homeostazisinin korunması, astrositlerde glutaminin de novo sentezine bağlıdır (Lian ve ark., 2018). Özellikle glutamatın hücre dışı konsantrasyonu yükseldiğinde, astrosit ve nöronal fonksiyon bozukluğuna yol açan toksik bir madde gibi davranır (Lemberg ve Fernández, 2009). Beyin dokusu ve BOS bulgularına göre; glutamat molekülü, sirozlu ve HE'li hastalarda artarken, HE'si olmayan hastalarda artmadığı bildirilmiştir (Watanabe ve ark., 1984).

Glutamatın sitotoksik etkileri, astrosit hücrelerindeki glutamat geri alım taşıyıcılarının aktivite azalması, yani sinaptik aralıkta konsantrasyonu artan ve biriken glutamattan kaynaklanmaktadır (Choudhury ve Borah, 2015; Lemberg ve Fernández, 2009; Rodrigo ve Felipo, 2006). Ayrıca bu glutamat taşıyıcılarındaki aktivite değişiklikleri, HE'li hastaların motor ve bilişsel eksiklikleri ile de ilişkilidir (Ochoa-Sanchez ve Rose, 2018). Bir çalışmaya göre, glial glutamat-aspartat taşıyıcısı (GLAST), HE'li ve sirozlu hastaların beyin dokusunda artışı (upregülasyon) gözlemlenmiş, ancak HE'si olmayan hastalarda bu artış bildirilmemiştir (Görg ve ark., 2010).

Hücre dışı glutamat birikimi sirozlu hastalarda beyin ödemi ile ilişkili bulunmuştur (Lemberg ve Fernández, 2009; Poveda ve ark., 2010). *In vitro* olarak astrosit hücre kültürlerinde metabotropik glutamat reseptörlerinde (mGluR) aktivasyon (Jakaria ve ark., 2018; Stokum ve ark., 2015) ve AQP4 kanal ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir.

Bu *in vitro* çalışmada astrositlerin belirtilen reseptör ve kanal aktivasyonlarına bağlı mekanizmalar üzerinden yoğun glutamat sinyaline maruz kaldıkları ve şiştikleri de gözlenmiştir (Shi ve ark., 2017). Bu nedenle, sirozda glutamat kaynaklı hücre şişmesi, sonuçta sinirsel nörotransmisyonu değiştirerek nörolojik eksikliklere yol açar (Cauli ve ark., 2009). Örneğin, karaciğer yetmezliğinde glutamat reseptörü N-metil-D-aspartat (NMDA) ekspresyonunun artışı, HE hastalarındaki motor ve bilişsel eksikliklerle ilişkilendirilmiştir (Soria Fregozo ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmaya göre, sirozlu hayvanların beyin korteksinde NMDA ekspresyonu artmıştır (Soria Fregozo ve ark., 2012). Ayrıca, öğrenme ve bilinç gibi bilişsel süreçlerde yer alan bir yolak olan glutamat-nitrik oksit (NO)-siklik guanozin monofosfat (sGMP) yolağının karaciğer yetmezliği olan hayvan modellerindeki aktivitesi azalmış olduğu ve sGMP sinyal seviyelerindeki değişikliklerinin de HE ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Llansola ve ark., 2015). Ek olarak, artan glutamaterjik nörotransmisyon, HE patogeneğinde yer alan bir inhibitör nörotransmitter olan gama-aminobütirik asit (GABA) gibi diğer nörotransmitterleri de etkileyebilir (Jones 2002).

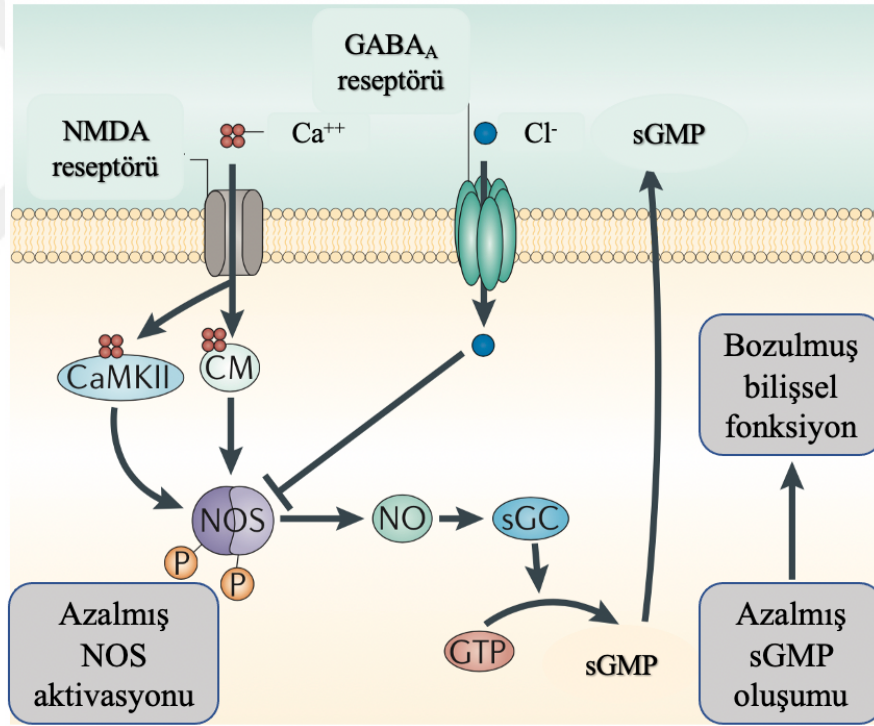
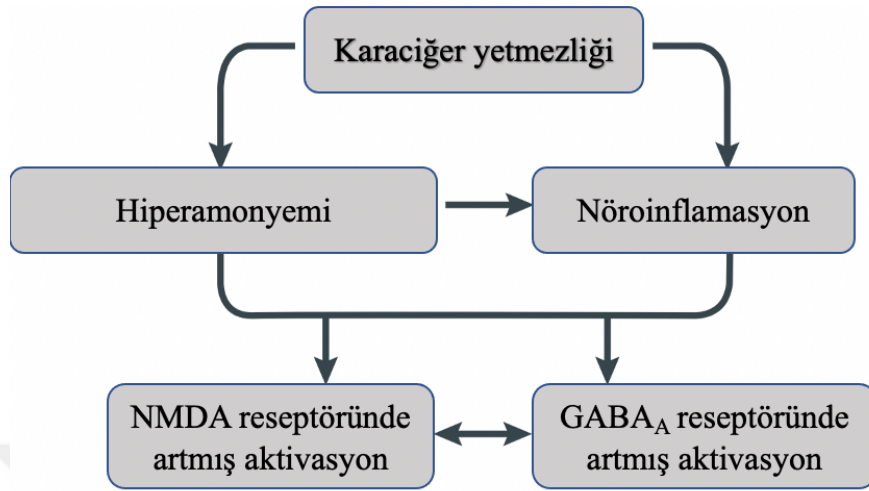
4.3.8. Hepatik ensefalopatide GABA'nın rolü

Santral sinir sisteminin bir inhibitör nörotransmitteri olan GABA, HE patogeneğinde önemli rol oynar. Gamma aminobütirik asit A (GABA_A) reseptörünün aktivasyonunun GABA nörotransmisyonunu artırarak nörolojik eksikliklere yol açtığı ileri sürülmüştür (Albrecht ve Jones, 1999; Hines ve ark., 2012). Gerçekten de, GABA_A aktivasyonu HE'deki yatıştırıcı (sedatif), motor ve bilişsel bozukluklarla ilişkili bulunmuştur (Palomero-Gallagher ve ark., 2009).

Gamma aminobütirik asit A yanı sıra, serebral endojen benzodiazepinler ve nörosteroidler gibi karaciğer yetmezliği sırasında yükselen diğer maddeler de GABA_A'yı aktive eder ve GABAerjik tonusu artırır (Ahboucha ve ark., 2012). Hepatik ensefalopatinin GABAerjik tonusu artıran ilaçlara karşı nöronal duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (Jones, 2002).

Safra kanalı bağlı HE'li sıçanlarda GABA sentezi yükselmiş ve GABAerjik tonus artmıştır (Leke ve ark., 2011). Gamma aminobütirik asit beyinde sıvı homeostazından sorumlu olduğu, dolayısıyla GABA sentezindeki değişimlerin beyin ödemine neden olan çeşitli hastalıkların temelini oluşturduğu bilinmektedir (Cesetti ve ark., 2012). Astroitlerin ozmotik dengede önemli yeri vardır ve anyon akımını GABA_A üzerinden düzenlerler (Cesetti ve ark., 2012). Sonuç olarak, GABA_A aktivasyonu hücre hacmini etkileyebilir ve nöronal aktivasyonu düzenleyebilir (Cesetti ve ark., 2012). Nitekim GABA_A'nın astroitlerde AQP4 ile birlikte sentez edildiği ve GABA_A'nın aktivasyonu ozmotik şişmeye neden olduğu gösterilmiştir (Cesetti ve ark., 2012).

Hepatik ensefalopatide meydana gelen motor, dikkat, öğrenme ve hafıza üzerindeki bozulmalarda etkili olan bir diğer mekanizmanın glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmisyon arasındaki etkileşimde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür: Örneğin, NMDA ve GABA_A reseptörlerinin aktivasyonunun glutamat-NO-sGMP yolunu bozarak HE'li hayvan modellerinde nörolojik hasara yol açtığı gösterilmiştir (Choudhury ve Borah, 2015; Llansola ve ark., 2015; Rodrigo ve Felipo, 2006) (Şekil 5).



Şekil 5. Hiperamonemide glutamat-nitrik oksit (NO)-siklik GMP yolağı ve NMDA-GABA reseptörlerinin etkileşimi. Hiperamonemi, glutamat-nitrik oksit (NO)-siklik GMP yolağının işlevini bozar. Hiperamonemi, NMDA ve GABA_A reseptörlerinin tonik aktivasyonunu artırır, bu da kalsiyum (Ca²⁺)/kalmodüline bağımlı protein kinaz II'nin (CaMKII) aktivitesinin artışına yol açar ve nöronal NO sentaz (nNOS) fosforile (P) ederek aktivitesini ve NO oluşumunu azaltır. Bu durumun çözünür guanilil siklazın (sGC) aktivasyonunu ve siklik guanilil monofosfat (sGMP)'in sentezini azalttığı ve dolayısıyla labirent öğrenme test (maze test)'lerinde öğrenme yeteneğinin azalmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. Nöroinflamasyon aynı zamanda beyincikteki glutamat-NO-sGMP yolağının işlevini de bozarak bu yolak üzerinden öğrenme yeteneğini bozduğu da gösterilmiştir. Hiperamonemi nöroinflamasyona neden olur, ancak karaciğer yetmezliği ile ilişkili diğer faktörler de nöroinflamasyona katkıda bulunabilir. CM: Kalmodulin, Cl⁻: Klorür iyonu. (Felipo, 2013' ten değiştirilerek kullanılmıştır)

4.3.9. Hepatik ensefalopatide tetikleyici faktörler

Amonyak, barsak enterositlerinde bulunan glutaminaz ve üreaz içeren bakteriler tarafından gıda ile alınan proteinlerin (amino asitler) deaminasyonu sonucu üretilen bir azot metabolizmasının yan ürünüdür (Levitt ve Levitt, 2018).

Barsakta üretilen amonyak emilerek portal ven yoluyla karaciğere taşınır (Liu ve ark., 2018). Amonyak, karaciğerde üre döngüsü yolu ile metabolize edilir ve daha sonra böbrekler aracılığı ile atılır (Vissek, 1979). Ancak, karaciğer fonksiyonlarında meydana gelen bir bozulma veya yetmezlik sonucu amonyak vücuttan yeterince uzaklaştırılmaz ve kanda amonyak birikir buna da hiperamonyemi denir (Aldridge ve ark., 2015).

Amonyak, HE'ye neden olan majör nörotoksin olarak kabul edilir; bu nedenle hiperamonyemide birincil terapötik strateji amonyak seviyesini düşürmektir (Rodrigo ve Felipe, 2006; Rose, 2012b). Gerçekten de, sistemik amonyak seviyeleri HE şiddeti ile pozitif (Odeh ve ark. 2005) ve nörolojik performans ile negatif (Jain ve ark., 2013) korelasyon göstermiştir. Özellikle, plazma amonyak seviyesi HE'li ve sirotik hastalarda, HE olmayan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (Jain ve ark., 2013; Rai ve ark., 2015). Ayrıca, etkili amonyak düşürücü ajanlar HE olan sirozlu hastalarda zihinsel durumun iyileşmesinde etkili olmuştur (Jain ve ark., 2013).

Amonyak, oksidatif stres, inflamasyon, safra asitleri ve laktat karaciğer yetmezliğinin bir sonucu olarak dolaşıma katılan patojenik faktörler olarak sayılmıştır (Ochoa-Sanchez ve Rose, 2018). Karaciğer yetmezliğinde sayılan bu sistemik faktörler astrosit ve nöronal fonksiyonları bozarak nörolojik kayıplar oluşturur; bu da bir dizi patofizyolojik etkiler başlatabilir (Ochoa-Sanchez ve Rose, 2018).

Amonyak, oksidatif ve nitrozatif strese neden olmak suretiyle hücrenin homeostazını, elektrofizyolojik dengesini, iç pH'sını bozar. Ayrıca benzodiazepin reseptörlerinin (GABA_Aerjik ve Glutamaterjik) nörotransmisyonunu bozarak eksitotoksisteye neden olur (Norenberg ve ark., 2007; Norenberg ve ark., 2009; Rama Rao ve ark., 2014). Amonyaga

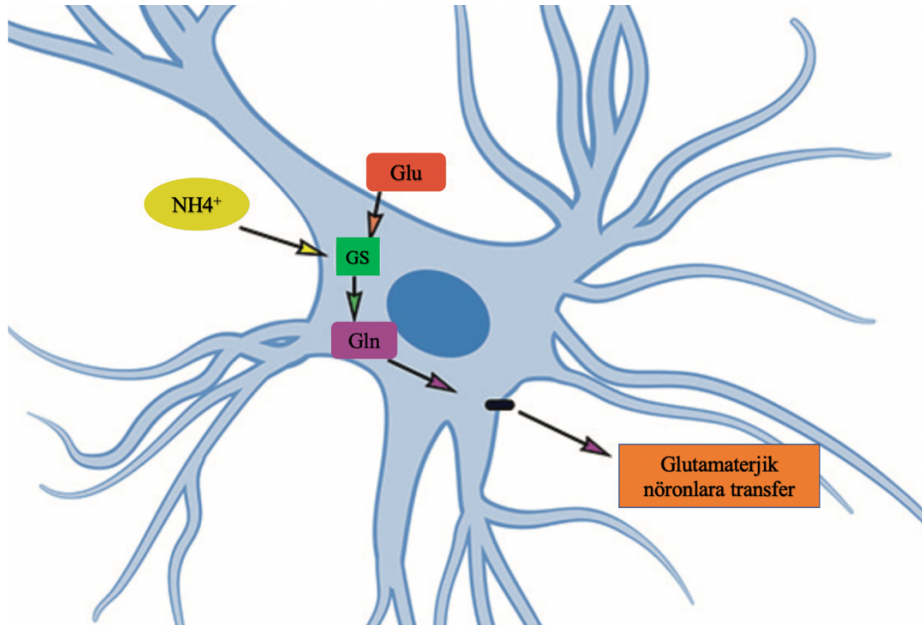
maruz bırakılmış ve *in vitro* kültürlenmiş astrositlerde c-fos (Bodega ve ark., 2007), mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar (MAPK) (Bodega ve ark., 2007), protein kinaz G (PKG) (Konopacka ve ark., 2009), Src kinaz ailesi (Aspinall ve ark., 2011), siliyer nörotrofik faktör (CNTF) (Bodega ve ark., 2007), tümör baskılayıcı gen olan p53 (Panickar ve ark., 2009), specificity protein-1 (SP-1) (Bodega ve ark., 2007), nükleer faktör-kappa B (NF-kB) (Jayakumar ve ark., 2011; Schliess ve ark., 2002; Sinke ve ark., 2008), yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX), RONT, ve fosfolipaz A₂ (FLA₂) dahil olmak üzere hücre içi sinyal sistemlerinin aktivasyonunun amonyak nörotoksitesinin mekanizmasında, özellikle akut HE'de görülen nöroinflamasyonda rol oynadığı bildirilmiştir. Amonyacağıne indüklediği bu faktörlerin inhibisyonu astrositlerde meydana gelen ödemde gerileme yapmıştır (Feuerstein ve ark., 1998; Jayakumar ve ark., 2006; Jayakumar ve ark., 2009; Jayakumar ve ark., 2012).

Son zamanlarda, Na⁺-K⁺-Cl⁻ kotransportör-1 (NKCC-1) (Jayakumar ve ark., 2008; Jayakumar ve ark., 2011), seçici olmayan katyon (NCCa-ATP) kanalı (Jayakumar ve ark., 2014), iyon taşıyıcıların uyarılması ve astrosit membrandaki AQP4 ekspresyonundaki artış (Rao ve ark., 2010) amonyak nörotoksitesite mekanizmasında, özellikle akut HE ile ilişkili astrosit şişmesinde (sitotoksik beyin ödeminin gelişiminde) rol oynadığı gösterilmiştir (Jayakumar ve ark., 2015).

Beyinde manyetik rezonans görüntüleri (MRG) değerlendirildiğinde, sirozlu hastalarda hiperamonyemiye bağlı gelişen nörolojik bozukluklar ile beyin ödeminin ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rai ve ark., 2015). Sirozlu hastalarda gelişen hiperamonyemi beyinde sıvı dağılımını değiştirerek doğrudan beyin ödeminin neden olmaktadır (Mardini ve ark., 2011). Benzer şekilde, SKB sıçanlarda, hiperamonyeminin beyin ödemi ve zayıf nörolojik performans ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup; kanda yükselen amonyağın tekrardan normal seviyelere geri dönmesi durumu normalleştirilmiştir (Bosoi ve ark., 2011). Karaciğer yetmezliğinde; hiperamonyemiye bağlı gelişen beyin ödemi, hiperamonyeminin astrositlerin üzerindeki yıkıcı etkileri ve bunu takiben astrosit

şişmelerinden kaynaklanır; yıkıcı etkiler arasında glutamin birikimi (Albrecht ve Norenberg, 2006), glial fibriler asidik protein (GFAP)'in sentezindeki düşme (Bélanger ve ark., 2002; Butterworth, 2001; Sobel ve ark., 1981), Alzheimer tip II astrositozu (Agarwal ve Mais, 2019), ve artmış AQP4 ekspresyonu gibi faktörler sayılabilir (Stokum ve ark., 2015). Yapılan bir çalışma, SKB sıçanlarda hiperamonyemik diyetin beyin ödemiyle birlikte Alzheimer tip II astrositozunu da indüklediğini göstermiştir (Jover ve ark., 2006).

Amonyakın beyindeki detoksifikasyonu astrositlerde amonyak ve glutamatın glutamin sentetaz (GS) ile glutamine çevrilmesi ile olur. Bu sayede beyinden amonyak kaldırılmış olur. (Jover ve ark., 2005; Martinez-Hernandez ve ark., 1977; Norenberg, 1996; Schousboe ve ark., 2014). Glutamin sentetaz amonyak ve glutamati metabolize ederek ozmotik etkisi olan glutamin aminoasitini üretir, glutamin glutamaterjik nöronlara transfer edilir ve öğrenme-bellek mekanizmasında fonksiyon kaybına neden olur (Hakvoort ve ark., 2017; Jover ve ark., 2005) (Şekil 6).



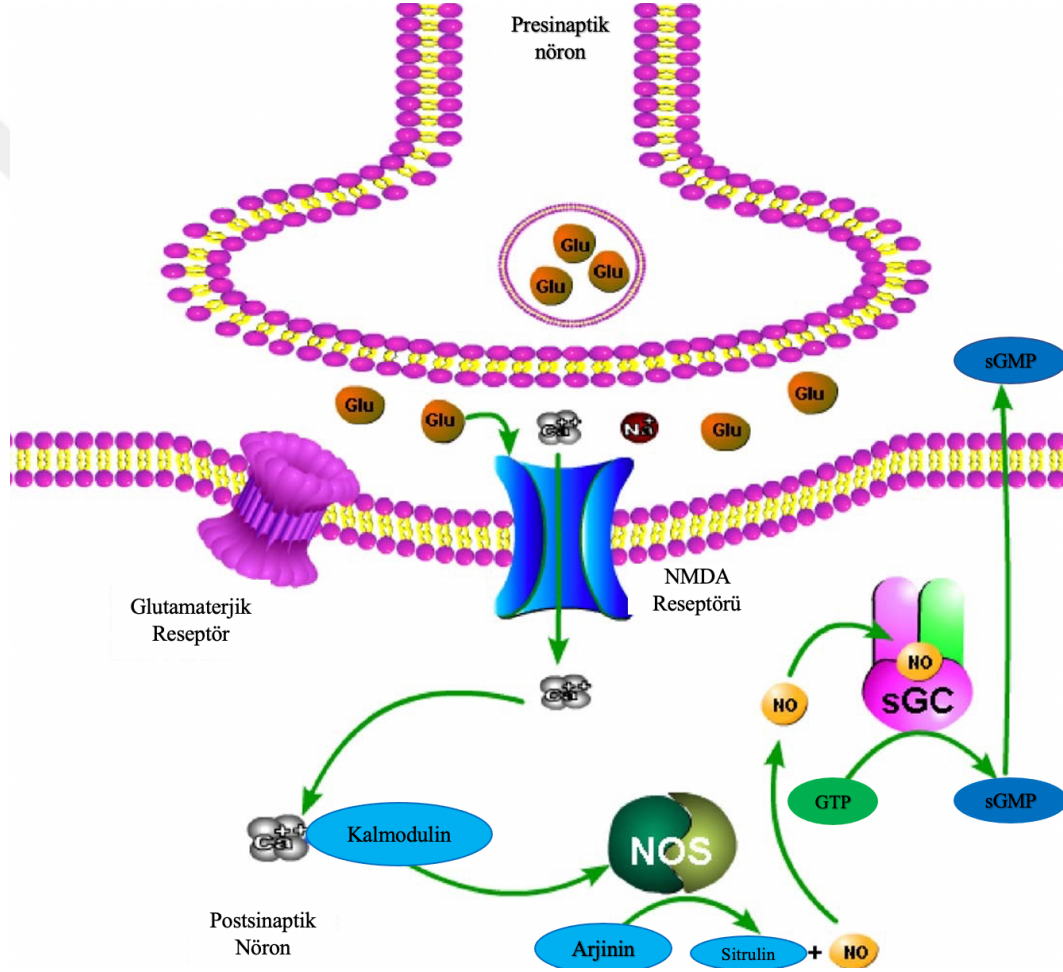
Şekil 6. Astrositlerde amonyağın detoksifikasyonu ve glutamin-glutamat döngüsü. Glutamin sentaz, amonyak ve glutamatın glutamine dönüşümüne aracılık eder. Gln: Glutamin, Glu: Glutamat, NH₃: Amonyak, H₂O: Su. (Perez-Monter ve Torre-Delgado, 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır)

Daha önce de belirtildiği gibi, hiperamonyemi, glutamin düzeylerinde artışa neden olur; bu da hipertensiyeye ve dolayısıyla sitotoksik astrosit şişmesine yol açar (Albrecht ve Norenberg, 2006). Hepatik ensefalopati ve sirozlu hastaların BOS biyokimyasal analizinde, glutamin düzeyi ve plazma amonyak düzeyi arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir (Watanabe ve ark., 1984). Sirozlu hastalarda hiperamonyemi, beyinde glutamin konsantrasyonunu artırıp, nihai olarak beyin ödemeine yol açar (Mardini ve ark., 2011). Safra kanalı bağlı sıçanlarda hiperamonyeminin beyinde artmış glutamin seviyesi, beyin ödemi ve motor aktivite bozukluğu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bosoi ve ark., 2014; Jover ve ark., 2006). Glutamat sentaz inhibisyonunun ile glutamin birikimini azaltılması amonyak kaynaklı astrosit şişmesini engelleyeceğinden bu yolla beyin ödemi zayıflatmak bir tedavi seçeneği olmuştur (Jover ve ark., 2005; Master, 1999). Bu bulgulardan yola çıkarak, karaciğer yetmezliğine bağlı olarak meydana gelen beyin şişmesinin, astrositlerde amonyak detoksifikasyonu sonucu biriken glutaminin ozmotik etkileri ile gerçekleştiği anlaşılmıştır (Şekil 6) (Jover ve ark., 2005; Norenberg, 1996). Sonuç olarak hepatik ensefalopatiye neden olan beyin ödemi astrosit şişmesinden ileri gelir. Buna da amonyağın astrositlerde detoksifikasyonu sonucu ortaya çıkan ozmotik etkili glutamin neden olmaktadır (Jover ve ark., 2005): Hiperamonyemik koşullardaki fazla glutamin anormal seviyelerde sitoplazmadan mitokondriye geçer ve mitokondri içinde yüksek konsantrasyonda amonyak oluşumuna neden olur— hücrede aşırı oksidatif stres ve mitokondriyal geçirgenlikte artış olur (Albrecht ve Norenberg, 2006; Norenberg ve ark., 2007; Rama Rao ve ark., 2012; Rama Rao ve ark., 2014).

4.3.10. Amonyakın glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmisyonuna etkisi

Karaciğer yetmezliği sonucu aşırı miktarda artan amonyak hücre dışı glutamat ve glutamaterjik nörotransmisyonu etkiler (Cauli ve ark., 2009; Felipe ve Butterworth, 2002; Szerb ve Butterworth, 1992). Dolayısıyla kronik hiperamonyemi, NMDA reseptörlerine bağlı olarak sinyal iletimini değiştirir (Llansola ve ark., 2013). Özellikle amonyak, sirozlu hastaların beyin dokusunu ve kronik HE'li hayvan modellerinde yapılan çalışmalara göre NMDA reseptörü ile ilişkili glutamat-NO-sGMP yolunu bozduğu bildirilmiştir (Jover ve ark., 2005; Lemberg ve Fernández, 2009; Rodrigo ve Felipe, 2006). Glutamat-NO-sGMP

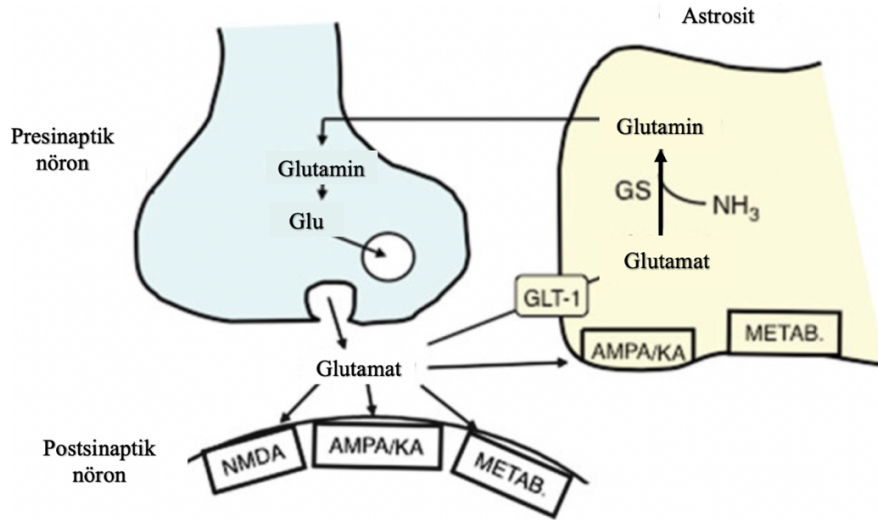
ekseni, öğrenme ve bilişsel süreçlerde temel bir mekanizma olduğu bilindiğine göre, karaciğer yetmezliği sonucu burada meydana gelen bozukluk; HE'nin bilişsel fonksiyonlardaki bozulmalar glutamat-nitrik oksit-sGMP mekanizması ile daha ayrıntılı olarak aşağıda görüldüğü üzere açıklanabilir (Choudhury ve Borah, 2015; Hawkins, 1996; Rodrigo ve Felipo, 2006) (Şekil 7).



Şekil 7. Glutamat-nitrik oksit-sGMP yolu. N-metil-D-aspartat reseptörlerinin aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar. Buradaki kalsiyumlar kalmödin ile bağlanarak kalsiyum-kalmödin kompleksi oluşturur. Bu kompleks nöronal NOS enzimini aktive ederek NO üretiminin artmasına neden olur. Oluşan NO, sGMP sentezinin artışından sorumludur. Oluşan sGMP'nin bir kısmı hücre dışı alana salınır. Glu: Glutamat, NMDA: N-metil-D-aspartat, sGMP: siklik Guanozin monofosfat, NO: Nitrik oksit, NOS: Nitrik oksit sentaz, GTP: Guanozin trifosfat, sGC: çözümlü Guanilat siklaz, Na⁺: Sodyum. (Rodrigo ve Felipo, 2006'dan değiştirilerek kullanılmıştır)

Buna göre, karaciğer yetmezliği sonucu meydana gelen hiperamonyemik hayvan modellerinde yapılan bilişsel ve öğrenme eksiklikleri çalışmalarına bakıldığında, sGMP seviyelerini artıran fosfodiesteraz-5 inhibitörü olan sildenafil kullanılarak sGMP'nin fizyolojik değerlerine geri döndürülmesi ile tedavi edilebildiği gözlemlenmiştir (Llansola ve ark., 2015). Buna ek olarak, yüksek seviyelerde amonyağa (hiperamonyemi) maruz kalmış sıçan beyinde glutamatın alımı azalır; bu da hücre dışında yüksek glutamat seviyelerine yol açar (Bender ve Norenberg, 1996).

Benzer şekilde *in vitro* olarak kültürlenmiş astrositler amonyağa maruz bırakılmış ve hücre dışında glutamat konsantrasyon yükselişine bağlı olarak NMDA reseptöründe aktivasyon artışı gözlemlenmiştir (Choudhury ve Borah, 2015; Ohara ve ark., 2009). Bu bulgulardan doğrultusunda karaciğer yetmezliği sonucu metabolize edilemeyen amonyağın vücutta birikerek hücre dışı glutamat seviyelerindeki artışına ve NMDA reseptör aktivasyonuna sebep olarak toksik etki gösterdiği, bu durumun da beyin ödemi ve santral sistemde oluşacak nörolojik hasarı açıklayıcı bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır (Choudhury ve Borah, 2015) (Şekil 8).

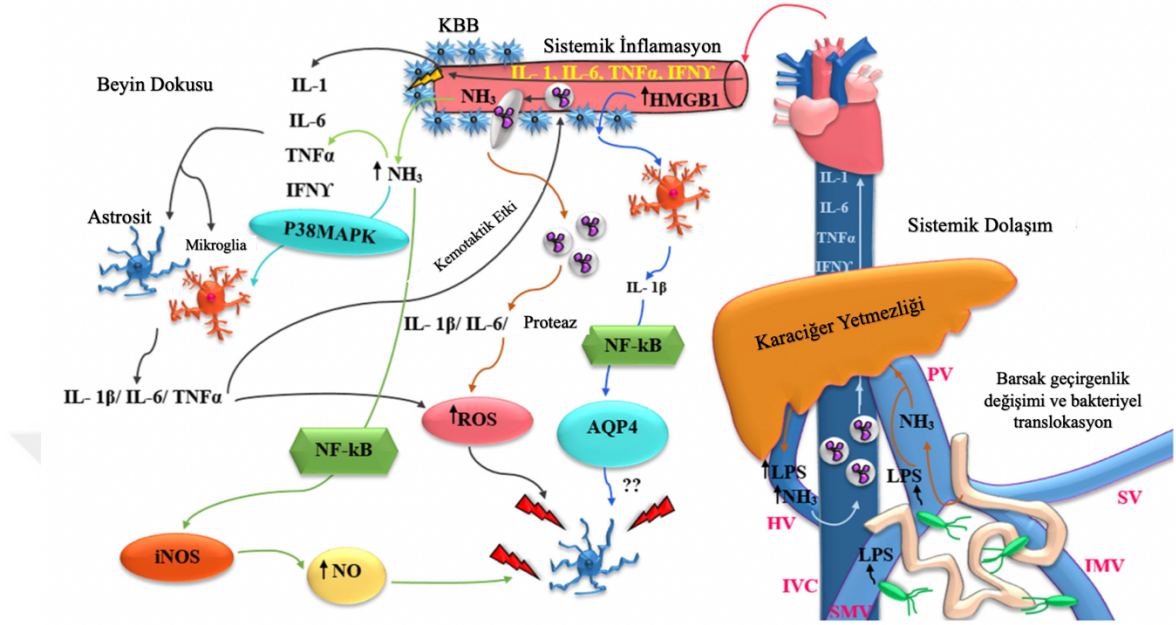


Şekil 8. Beyindeki glutamat/glutaminin rolü. Glutamat taşıyıcısının (GLT-1) ve glutamat reseptör alt tiplerinin (ör: NMDA) astrositler üzerindeki lokalizasyonları ve glutamaterjik nörotransmisyonunda yer alan nöronlar gösterilmiştir. Glu: Glutamat, GLT-1: Glutamat taşıyıcısı-1, GS: Glutamin sentetaz, Glu: Glutamat, NMDA: N-metil-D-aspartat, AMPA: α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik asit, KA: Kainat, METAB: Metabotropik reseptör, NH₃: Amonyak. (Trautwein ve Koch, 2014'ten değiştirilerek kullanılmıştır)

Amonyakın beyindeki zararlı etkilerine, GABA_A reseptörü üzerinden artan GABAerjik nörotransmisyon aracılık eder (Jones ve Basile, 1998). Hiperamonyemi, motor ve bilişsel kayıplarla birlikte GABAerjik tonusu artırırken, daha yüksek amonyak seviyeleri GABAerjik tonusu daha da artırır ve HE'nin daha önce de bahsedilen klinik bulgularına yol açar (Jones, 2002). Hiperamonyemik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, hafıza bozukluklarının serebellumda GABA_A'nın aktivasyonundaki artışı ve kortekste aktivasyonun azalışından kaynaklandığı görülürken, GABA_A'nın blokajı ile birlikte hafızanın tekrar kontrol seviyelerine geri döndüğü gösterilmiştir (Hernandez-Rabaza ve ark., 2016). Ayrıca; amonyak, GABA'nın GABA_A'ya karşı bağlanma eğilimini yükselterek GABA'nın nörohibitör etkilerini artırdığı gözlemlenmiştir (Takahashi ve ark., 1993). Buna ek olarak; amonyak, astrositlerin GABA alım kapasitesini azaltır, bu da sinaptik aralıktaki GABA'nın artışına neden olur (Jones, 2002). Bu anlatılan mekanizmayı destekler nitelikteki bir çalışmada, benzodiazepin agonistleri amonyak kaynaklı astrosit şişmesini şiddetlendirirken benzodiazepin antagonistleri amonyak kaynaklı şişliği azalttığı da bildirilmiştir (Norenberg ve Bender, 1994).

4.3.11. Karaciğer yetmezliğinde inflamasyonun hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi

Sistemik inflamasyon, karaciğer hasarının oluşmasıyla meydana gelir ve proinflamatuvar sitokin alt grubuna ait olan IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi interlökin (IL)'lerin dolaşımında saptanması ile karakterize edilmiştir (Aldridge ve ark. 2015; Jayakumar ve ark. 2015; Wigmore ve ark., 1998) (Şekil 9).



Şekil 9. Astrosit hasarında inflamasyonun olası rolü. Hepatik vende artan amonyak ve lipopolisakarit, inferior vena kavaya boşaltılır ve sistemik dolaşımda proinflamatuvar sitokinler üretmek ve salmak için nötrofilleri ve doğal bağışıklık sisteminin diğer bileşenlerini tetikler. Sistemik inflamasyon, KBB geçirgenliğinin artmasına yol açar ve proinflamatuvar sitokinlerin ve amonyanın beyne girişini artırır. İnflamatuvar mediatörler ve amonyak, mikroglia ve nötrofil kemotaksisi ile indüklenen ROS/RNT üretimi yoluyla astrosit hasarına neden olur. Kısaltmalar: AQP4: Aquaporin-4 su kanalı, KBB: Kan beyin bariyeri, HMGB-1: Yüksek mobilite grup kutu proteini1, HV: Hepatik ven, IFN γ : İnterferon-gama, IL-1: İnterlökin 1, IL-1 β : İnterlökin 1 beta, IL-6: İnterlökin 6, IMV: İnteröz mezenterik ven, iNOS: indüklenebilir Nitrik oksit sentaz, IVC: İnteröz vena kava, LPS: Lipopolisakarit, NF- κ B: Nükleer faktör kappa B, NH $_3$: amonyak, NO: Nitrik oksit, PV: Portal ven, p38MAPK: p38 Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz, ROS: Reaktif oksijen türleri, SMV: Superior mezenterik ven, SV: Dalak damarı, TNF- α : tümör nekroz faktörü-alfa. (Sepehrinezhad ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır)

İnflamasyonun ve proinflamatuvar sitokinlerin HE'li sirozlu hastalarda, HE'si olmayan sirozlu hastalara göre bilişsel yan etkileri daha fazla olmuştur (Rai ve ark., 2015). Özellikle serum IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin artışı, karaciğer yetmezliğinde HE' nin şiddetini artırırken (Jain ve ark., 2013; Odeh ve ark., 2005) azalması ise HE'li hastalarda iyileşme gözlemlenmiştir (Rai ve ark., 2015).

Safra kanalı bağlı sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre, ibuprofen ve indometasin anti-inflamatuvar ilaç olan beyin ve kandaki pro-inflamatuvar belirteçleri azaltırken, öğrenme kapasitesini ve motor koordinasyonunu kontrol seviyelerine geri döndürmüştür (Chung ve ark., 2001; Rodrigo ve ark., 2010). Benzer şekilde başka bir çalışmada, TNF- α

inhibitörü kullanılarak serum ve beyin TNF- α seviyelerindeki normalleşme SKB sıçanlarda hafıza kapasitesini kontrol seviyelerine geri döndürmüştür (Sheen ve ark., 2016).

Hepatik ensefalopati ve sirozlu hastaların beyin korteksindeki postmortem bulgular HE'si olmayan sirozlu hastalardaki bulgularla karşılaştırıldığında, bir mikroglia belirteci olan Iba-1'in gen ifadesinde artış gözlemlenmiştir (Zemtsova ve ark., 2011). Özellikle HE'li hastalarda; mikroglia aktivasyonunda, inflamatuvar yolaklarda, hücre proliferasyonunda ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinde artış olmuştur (Görg ve ark., 2013). Bu bulgular nöroinflamasyonun HE patogenezinde rol oynadığını açık bir şekilde göstermektedir.

Sistemik dolaşımda ve santral sinir sisteminde inflamasyonun astrosit şişmesi ve beyin ödemi ile ilişkisi tespit edilmiştir (Chastre ve ark., 2010; Jayakumar ve ark., 2015; Wright ve ark., 2007; Zemtsova ve ark., 2011). İnflamasyonla ortaya çıkan nörolojik hasarlar, HE'li sirozlu hastalarda beyin ödeminin varlığı ile ilişkili bulunmuş ve inflamasyonun azaltılması beyin ödemi ve nörolojik performansı kontrol seviyelerine geri döndürmüştür (Rai ve ark., 2015).

Safra kanalı bağlı sıçanlarda meydana gelen inflamatuvar yanıt beyin ödeme neden olmuştur (Jover ve ark., 2006). Ayrıca, hiperamonyemik sıçanlarda inflamatuvar yanıtın sitotoksik beyin ödemi artırdığını göstermiştir (Jayakumar ve ark., 2015; Wright ve ark., 2007). İnflamasyona bağlı beyin ödemi; beyin endotel hücrelerindeki sitotoksik aktiviteler, sıkı bağlantı proteinlerin yapısındaki bozulmalar ve lökositlerin girişini kolaylaştıran kan beyin bariyer (KBB)'in yıkımı ile karakterize edilmiştir (Stokum ve ark., 2015). Özellikle IL-1 β (Blamire ve ark., 2000) ve TNF- α , BBB geçirgenliği ve beyin ödeminin artışı ile ilişkili bulunmuştur (Vakili ve ark., 2011).

Ayrıca, *in vitro* olarak kültürlenmiş astrositler TNF- α , IL-1 β , IL-6 veya interferon gamaya maruz kaldıklarında şiştikleri gözlemlenmiştir (Rama Rao ve ark., 2010), bunun GFAP ve

AQP4 kanallarında meydana gelen oksidatif stresin zararlı etkileri ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Chastre ve ark., 2010).

Nükleer faktör kapp B (NF-kB), iltihap oluşumu ve astrosit şişmesi ile ilgili bir yolağı oluşturmuştur (Rama Rao ve ark., 2010) ve HE'li sirotik hastalarda aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Görg ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmaya göre, rifaximinin *in vitro* olarak kültürlenmiş hücrelerde NF-kB'yi inhibe ettiği ve apoptotik faktörlerin toksik etkilerindeki azalma bildirilmiştir (Esposito ve ark., 2016).

Ayrıca, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve prostaglandin E2 (Rodrigo ve ark., 2010) gibi beyin ödeminde yer alan diğer beyin nöroinflamatuvar faktörler; karaciğer yetmezliğindeki nörolojik hasarlarla ilişkili bulunmuştur (Chastre ve ark., 2010). Astrositlerde meydana gelen fonksiyon bozuklukları yanında nöroinflamasyon da nörotransmisyonu bozar ve bu HE'nin oluşumuna yol açar (Hernández-Rabaza ve ark., 2016). Örneğin nöroinflamasyon, glutamat alımını azaltır, hücre dışı glutamatı artırır, glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasını ve astrositlerden glutamat salınımını artırır (Mahmoud ve ark., 2019). Nöroinflamasyon, sıçanlarda GABAerjik tonusu ve motor koordinasyon bozukluğunu artırmıştır ancak, yukarıda da belirtildiği gibi, bir fosfodiesteraz inhibitörü olan (PDEi) ve anti-inflamatuvar etkili sildenafil uygulandığında GABA nörotransmisyonunu ve motor bozukluklarını yeniden iyileştirmiştir (Agusti ve ark., 2017).

4.3.12. Karaciğer yetmezliğinde oksidatif stresin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi

Hepatik ensefalopati patogeneğinde yer alan bir başka faktör; peroksit, serbest radikaller ve lipid peroksitler dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerine (ROT) bağlı gelişen oksidatif stres olarak gösterilmiştir (Cichoż-Lach ve Michalak, 2014). Karaciğer yetmezliğinde, albümin ve glutatyon dahil antioksidan etkilerle ilişkili proteinlerin sentezi azalırken, ROT sentezi artar (Pemberton ve ark., 2006). Bu nedenle, karaciğer yetmezliğinde, oksidatif stres ve hücre fonksiyon bozukluğuna yol açan ROT sentezi

ve nötralizasyonu arasında bir dengesizlik vardır (Bosoi ve Rose, 2013b). Klinik çalışmalar, HE'li sirozlu hastalarda sistemik oksidatif stresin bir belirteci olan 3-nitrotirozin oluşumunu göstermiştir; ancak HE'si olmayan sirotik hastalarda bu belirteçler görülmemiştir (Montoliu ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında, HE'li sirotik hastalardan alınan postmortem kortikal beyin dokusunda oksidatif stres belirteçleri artarken, HE'si olmayan hastalarda artmaması; beyinde oluşan oksidatif stresin, HE'ye neden olabilecek önemli faktörlerden biri olabileceği sonucuna ulaşılabılır (Görg ve ark., 2010). Sonuç olarak, diğer tetikleyici faktörler gibi oksidatif stres de karaciğer yetmezliğinde meydana gelen hepatik ensefalopati, astrosit şişmesi ve beyin ödemi gibi oluşumların gelişiminde rol aldığı görülmüştür (Sepehrinezhad ve ark., 2020).

4.3.13. Karaciğer yetmezliğinde safra asidinin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi

Yüksek safra asit seviyeleri, karaciğer yetmezliğinde HE patogenezinde de görülür (DeMorrow ve ark., 2017). Safra asitleri karaciğerdeki kolesterolden sentezlenir, daha sonra safra asitleri barsağa ulaşır ve mikrobiyota ile metabolize edilir (Molinero ve ark., 2019). Safra asitleri genellikle safra asit taşıyıcıları tarafından geri dönüştürülmek üzere karaciğere geri döner (McMillin ve DeMorrow, 2016). Bununla birlikte, karaciğer yetmezliğinde safra asitleri karaciğerde geri dönüştürülmez ve dolaşımda birikir (Chiang, 2017). Bu nedenle safra asitleri beyine KBB'nde bulunan safra asitlerinin taşıyıcıları aracılığıyla girer ve HE'yi tetikler (DeMorrow ve ark., 2017).

Sirozlu hastalarda hepatik safra asitlerinin klerensinin azalması nedeniyle serum safra asit seviyeleri kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (Taegtmeyer ve ark., 2014). Fulminant (aniden ortaya çıkan hızlı bir şekilde yükselen ve ölümcüllük noktasına kadar ilerleyen yoğun ve şiddetli bir karaktere sahip olay veya süreç) hepatik yetmezlikten ölen hastalarda; serum, BOS ve beyin safra asitlerin seviyeleri artmış olup beyin ödemi ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Bron ve ark., 1977). Safra kanalı bağlı sıçanlarda plazma ve beyin safra asit seviyelerinde artış gözlemlenmiş; KBB geçirgenliğinin artışı ile ilişkili bulunmuştur (Quinn ve ark., 2014).

Ek olarak safra asitleri HE'deki bellek ve motor koordinasyon bozuklukları ile ilişkili olabilecek GABAerjik, glutamaterjik, noradrenerjik ve serotonerjik mekanizmalar gibi ve HE patogenezinde yer alan nörotransmisyon ile ilişkili sistemleri bozar (McMillin ve DeMorrow, 2016). Özellikle beyinde safra asitlerinin taşınmasında görev alan taşıyıcıların ekspresyonunda ve nöronlardaki farnesoid X nükleer reseptör (safra asidi reseptörü) aktivasyonunda azalış gözlemlenmiştir (Czarnecka ve ark., 2020; McMillin ve DeMorrow 2016; Mertens ve ark., 2017).

4.3.14. Karaciğer yetmezliğinde laktik asidin hepatik ensefalopati üzerindeki tetikleyici etkisi

Laktat, glikozdan sentezlenir ve hem nöronlarda hem de astrositlerde laktat dehidrogenaz tarafından metabolize edilen organik bir moleküldür (Magistretti ve Allaman, 2018). Astrositlerden gelen laktik asit (laktat), beyin metabolizmasında ortaya çıkan substrat ihtiyacını karşılaması açısından önemlidir (Cali ve ark., 2019). Laktat, hücre dışı boşluğa taşınır ve nöronlar tarafından bir enerji substratı olarak kullanılır (Mason, 2017). Genel olarak serebral laktat artışı, enerji eksikliği/bozukluğu belirteci olarak kabul edilmiştir; ayrıca son zamanlarda yapılan bir çalışmaya göre, laktat homeostazındaki değişiklikler nöronal fonksiyon bozukluğu ve HE ile ilişkilendirilmiştir (Bosoi ve Rose, 2014).

Hepatik ensefalopatili hastalarda; sistemik dolaşımında ve beyinde laktat konsantrasyonlarında artış bildirilmiştir (Bosoi ve Rose, 2014). Safra kanalı bağlı sıçanlardan alınan beyin dokusunda yapılan post mortem çalışmaya göre; laktat ve glutaminin beyin ödemi ile birlikte arttığı gösterilmiş ve laktat sentezinin inhibisyonu beyin laktat seviyesini düşürmüş olup beyin ödemi de hafifletmiştir (Bosoi ve ark., 2014).

4.3.15. Karaciğer yetmezliğinde hepatik ensefalopatiyi indükleyen tetikleyici faktörler arasındaki sinerjistik ilişki

Klinik ve temel araştırmalara göre; inflamasyon ve amonyak arasında bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir (Jover ve ark., 2006; Rai ve ark., 2015). Gerçekten de inflamasyon

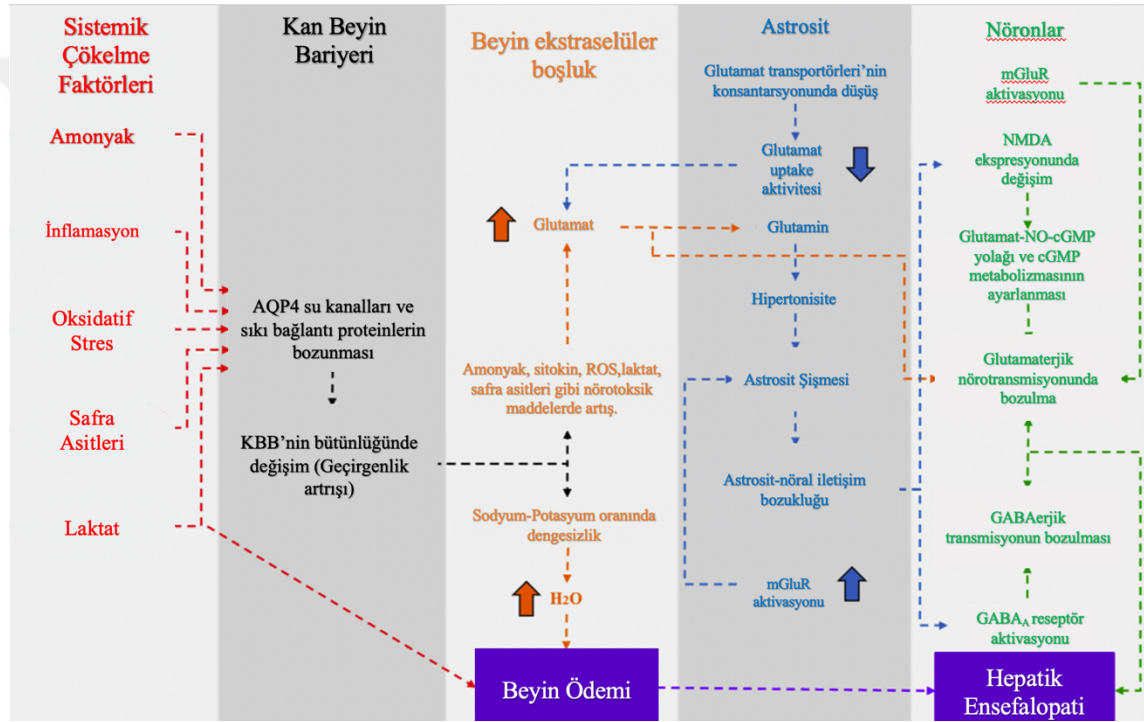
-HE'si olmayan sirozlu hastalar HE'li sirozlu hastalar ile karşılaştırıldığında- HE'li siroz hastalarında hiperamonyemi, beyin ödeminin oluşumu ve nörolojik performansın zayıflaması üzerinde artırıcı etkisi olmuştur (Rai ve ark., 2015). Benzer şekilde SKB sıçanlarda, inflamasyon ve hiperamonyeminin beyin ödeme ve HE'ye yol açtığı gözlemlenmiştir (Jover ve ark., 2006).

Ayrıca, kronik hiperamonyemili sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre, astrosit ve mikrogliaların aktivitesi ile birlikte proinflamatuvar sitokinlerin de seviyelerinde artış bildirilmiştir (Hernandez-Rabaza ve ark., 2016). *In vitro* deneyler; amonyağın glutamat, prostaglandinler ve IL-1 β gibi moleküllerin salıverilmesini indüklediğini göstermiştir (Zemtsova ve ark., 2011). Ek olarak, proinflamatuvar sitokinlerin neden olduğu astrositlerin şişmesi, amonyağa önceden maruz kaldıklarında daha da şiddetlenmiştir (Rama Rao ve ark., 2010). Bunun temel nedeni, amonyak tarafından, NF-kB yolununun aktivasyonu astrositlerin inflamatuvar sitokinlerin sitotoksik etkilerine karşı duyarlı hale getirmesi olarak tanımlanmıştır (Rama Rao ve ark., 2010).

Hiperamonyemiye bağlı gelişen nöroinflamasyon, astrositlerin membranında bulunan GABA taşıyıcısı proteininin (GAT-3) sentezini artırarak, GABA molekülünün salıverilmesini artırır ve dolayısı ile hücre dışı GABA konsantrasyonu artmış olur, bunun da sıçanlarda hafıza ve motor fonksiyonlarda eksikliklere yol açtığı bildirilmiştir (Hernandez-Rabaza ve ark., 2016). Ek olarak, beyinde artmış amonyak ve inflamasyon, glutamat reseptörleri ve glutatyon sentaz gibi önemli beyin proteinlerinin üzerinde nitrasyon sonucu oksidatif/nitrosatif stresi tetiklemiş olur (Bobermin ve ark., 2012).

Genel olarak, buradan çıkarılacak sonuç; karaciğer yetmezliğinde inflamasyon ve amonyak etkileşiminin astrosit şişmesini, beyin ödemi ve HE'yi artırdığıdır (Jayakumar ve ark., 2015). Ayrıca astrosit şişmesi, beyin ödemi ve HE'nin gelişimi üzerindeki oksidatif stres ile amonyak arasında sinerjistik ilişkinin önemi de vurgulanmıştır (Jia ve ark., 2020). Klinik çalışmalara göre, karaciğerinde fibroz gelişen hastalarda sadece hiperamonyeminin gelişmesi HE'ye neden olmamış, oksidatif stres ve hiperamonyeminin

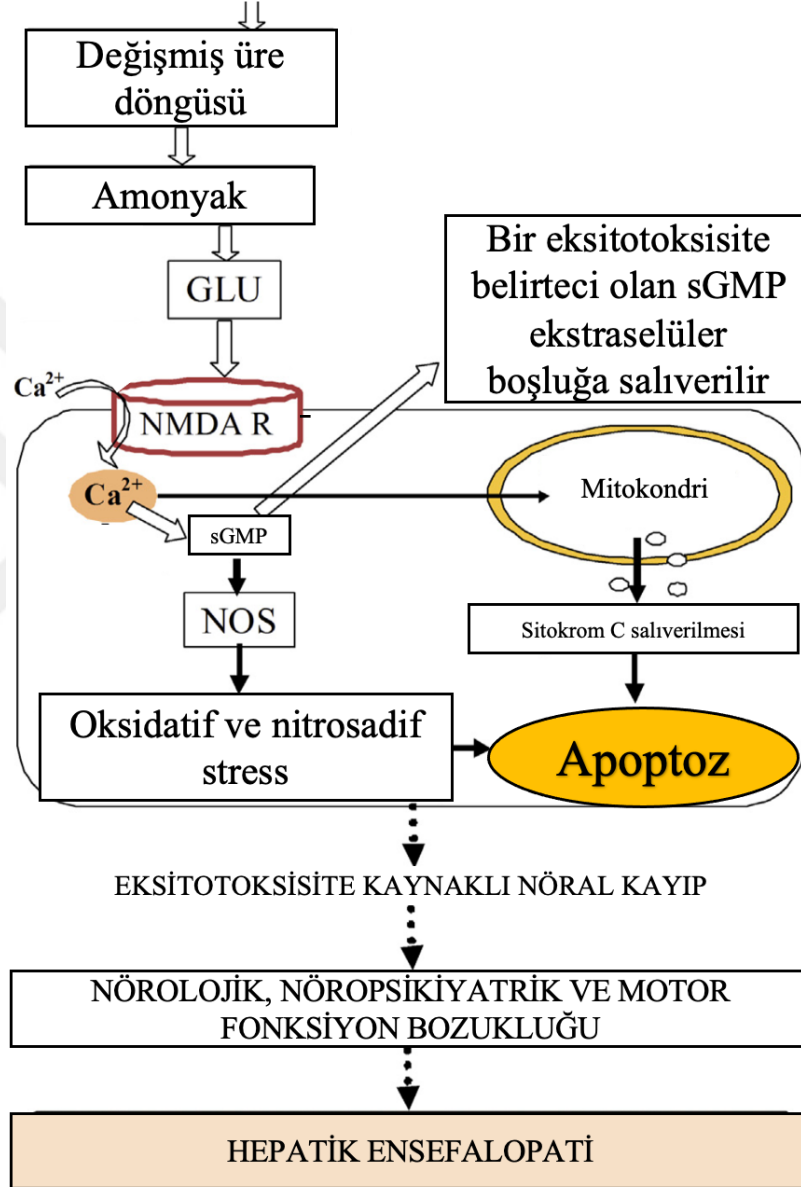
ikili kombinasyonunun HE'ye neden olduğu gözlemlenmiştir (Bosoi ve Rose, 2013b). Karaciğer hastalıklarında hiperamonyemi, inflamasyon ve safra asitlerinin; KBB geçirgenliği, astrosit şişmesi ve beyin ödemi üzerindeki sinerjistik etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (Tominaga ve ark., 1991). Ayrıca, safra asitleri karaciğerde proinflamatuvar sitokin sentezini uyardığından beyin fonksiyonlarını da etkileyebilir (Cai ve Boyer, 2017)(Şekil 10).



Şekil 10. Karaciğer hastalığında KBB bozukluğu. Astrosit şişmesi ve beyin ödemi sonrası HE tetiklenebilir. Tetikleyici faktörler, nörotoksik maddelerin beynin hücre dışı boşluğuna girmesini kolaylaştırarak KBB geçirgenliğini etkileyebilir, bu da beyin ödeminde neden olabilir. Ek olarak, nörotoksik maddelerin astrositlerdeki glutamat ve glutamin metabolizmasını bozarak, astrosit şişmesine yol açarlar. Bu nedenle, astrosit şişmesinin beyin ödeminde önemli bir rolü vardır ve astrosit-nöronal iletişimi etkiler. Sonuç olarak, HE' nin oluşumuna neden olan glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmisyon iletiminin bozulmasına neden olur. AQP4: Akuaporin 4, SK: Sıkı kavşak, ROT: Reaktif oksijen türleri, mGluR: Metabotropik glutamat reseptörü, NMDA: N-metil-D-aspartat, NO: Nitrik oksit, sGMP: siklik Guanosin monofosfat, GABA: Gama-aminobutirik asit. (Ochoa-Sanchez ve Rose, 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır)

4.4. Hepatik Ensefalopatinin Oluşum Mekanizması

Karaciğer Yetmezliği



Şekil 11. Karaciğer yetmezliğinde hepatic ensefalopati oluşumunun moleküler yolu. Karaciğer yetmezliği, kanda amonyak konsantrasyon artışına, hiperamonyemiye neden olur. Yüksek amonyak konsantrasyonu, glutamat (GLU)'ın sinaptik aralıkta birikiminde neden olur. Glutamat NMDA reseptörünün (NMDA-R) glutamat bağlanma bölgesini aktive eder. NMDA reseptör aktivasyonu Ca²⁺'un nöronlara akışına yol açar. Artan Ca²⁺, sGMP üretimini artırır. Siklik guanozin monofosfat (sGMP) ayrıca nitrik oksit sentazı (NOS) aktive eder ve ayrıca eksitotoksitenin bir belirteci olan sGMP ekstraselüler boşluğa salıverilir. Nitrik oksit sentaz aktivasyonu oksidatif ve nitrosatif strese yol açar. Dahası, Ca²⁺ iyonları mitokondriye girer ve sitokrom c'nin saliverilmesini tetikler, böylece apoptotik kaskad başlar. Bu olaylar nöron kaybına ve bunun sonucunda ortaya çıkan nörolojik, nöropsikiyatrik ve motor fonksiyon bozukluğu ile karakterize olan hepatic ensefalopatiye neden olur. (Choudhury ve Borah., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır)

4.5. *Cuscuta* türleri

Yapılan detaylı literatür taramasında farklı *Cuscuta* türlerine ait antitümör, antimikrobiyal, hepatoprotektif, antikonvülsan, immünostimülatör, antioksidan, α -glukosidaz inhibisyonu, psikofarmakolojik, saç büyümesini uyarıcı, anti-steroidojenik, anti-inflamatuvar, diüretik, analjezik, antipiretik, anti-HIV, antidiyabetik, nöroprotektif, antiülser, antispazmodik, hemodinamik, bradikardi, antihipertansif, kardiyotonik ve kas gevşetici gibi etkiler bulunmuştur (Noureen ve ark., 2019).

Ülkemizde de geleneksel tıpta bazı bitkilerin karaciğer-safra rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu türlerden biri de halk tarafından sarılığın tedavisinde kullanılan *Cuscuta* türleri olmuştur. Arap cinsaçı, bağboğanotu, boğmacaotu, bostanbozan, cazısaçı, cinsaçı, eftimon, gelinsaçı, göktenyağan, ince bağboğanotu, kâfırşaçı, kızılkurtotu, kızıl sarmaşık, koç bostanbozan, küşüt, küt bostanbozan, tekcinsaçı, top bostanbozan, uslu cinsaçı, serend, şeytansaçı, som bostanbozan, som kızılkurtotu, zar bostanbozan isimlerle bilinen *Cuscuta* türleri özellikle ülkemizde Bostanbozan ismiyle tanınan bir veya çok yıllık, klorofilsiz ve asalak bitkilerdir ayrıca Mardin ve yöresine özgü olarak “İkşut” ismiyle bilinirliği yüksek olan küsküt otu İngilizcede ‘Dodder’ ismiyle tanınır (Ereçevit Sönmez ve ark., 2019). *Cuscuta* türleri Mardin ilinin yanı sıra Denizli, Diyarbakır, Manisa’da halk tarafından sarılığın tedavisinde kullanılır. Aynı zamanda bu türlerin diüretik, karminatif, müshil ve safra söktürücü olarak geleneksel kullanıma sahip oldukları rapor edilmiştir (Koca-Caliskan ve ark., 2018b). *Cuscuta* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda bu türlerin flavonoidler (Kersetin, hiperozit vd.), alkaloidler (Kuskutamin, lupanin vd.), glikozitler (Kuskutin, Kuskutozit-A ve B vd.), steroid ve steroller (Kampesterol, sesamin vd.), triterpenler (Lupeol, ursolik asit vd.), karotenoidler (Lutein, likopen), yağ asitleri (Oleik asit, linolenik asit) ve diğer bileşikler (Kuskutalin, amarvelin vd.) taşıdığı ortaya çıkarılmıştır (Sari ve ark., 2010).



Resim 1. Küsküt otu (*Cuscuta* sp.), yeşil bitkilerin üzerindeki sarı renkli sarmaık asalak yapılar (siyah oklar) olarak gösterilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Hayvanlar

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 03.03.2021 tarihli toplantısında 40.2021mar karar no'lu onayı alınarak başlatılmış (Ek-1). Deney hayvanları, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edilmiştir. 200-300 gram ağırlığında erkek Norvecigus Spraque Dawley türü (n= 24) sıçanlar poliakrilik malzeme (60x40x40 cm) ile yapılan kafeslerde her kafeste 4 adet olacak şekilde barındırılmıştır. Çalışma ortamı 22 ± 2 ° C sabit sıcaklık $\%50 \pm 5$ nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlenmiştir. Çalışmada hayvanların standart pellet yemi ve suya serbest erişimine izin verilmiştir.

5.2. Bitki Materyali

Küsküt (*Cuscuta* sp.) bitkisinin toprak üstü kısımları, 2018 yılının mayıs ayında Mardin ilinin Midyat ilçesinde bulunan aktardan satın alınmıştır. Bitki, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Doğan tarafından teşhis edilmiş olup, bitkinin birkaç örneği uygun herbaryum örneği haline getirilerek Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda 22668 MARE numarası ile kayıt altına alınmıştır.

5.3. Metanol Ekstresinin Hazırlanması

Küsküt otu kurutulmuş toprak üstü kısımları toz edildikten sonra yaklaşık 757,06 g tartılmış ve 1600 ml metanol ile 10 gün boyunca masere edilmiştir. Süzme işleminin ardından elde edilen metanol ekstresinin çözücüsü rotary evaporatörde (Rotavapor® R-300) kuruluğa kadar uçurulmuştur. $\%10,83$ verimle elde edilen metanol ekstresi analizlere kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

5.4. *In Vitro* Çalışmalar

5.4.1. DPPH radikalini süpürücü aktivite tayini

Ekstrenin antioksidan aktivitesine Zou ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edilmiştir (Zou ve ark., 2011). Özetle, ekstreden 5 mg/ml konsantrasyonda dimetil sülfoksitte hazırlanan stok çözeltilerden, 1:8 oranında seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin 10 µl'si mikropiplara kuyucuklarına aktarılmıştır. Üzerlerine 190 µl 0,1 mM'lık DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar 30 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbansları 517 nm'de kör olarak kullanılan dimetil sülfoksit karşı ölçülmüştür. Standart olarak askorbik asit (0,25- 0,016 µg/ml) çözeltisi kullanılmıştır. Ekstrenin, serbest radikali süpürme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

DPPH radikali süpürme yüzdesi (%): $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$

A kontrol: DPPH çözeltisi ve metanol içerir.

A örnek: DPPH çözeltisi ve örnek solüsyonlarını içerir.

DPPH radikallerinin %50'sini ortadan kaldıran ekstrelerin inhibisyon konsantrasyonları (İK₅₀) Graphpad Prism 6 programı aracılığıyla ekstrelerin konsantrasyonlarına bağlı inhibisyon grafiği çizilerek hesaplanmıştır. Ölçümler üç defa tekrarlanmıştır.

5.4.2. ABTS radikal katyonunu süpürücü aktivite tayini

Ekstrenin total antioksidan kapasite tayininde kullanılan 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal katyonunun üretimi için, 7 mM ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu], 2,45 mM potasyum persülfat ile karıştırılmış ve reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında (23 °C), 16 saat boyunca karanlıkta beklenmiştir. ABTS çözeltisi analitik saflıkta %96'lık etanol çözücüsüyle 734 nm'de $0,700 \pm 0,050$ absorbans değeri verecek şekilde dilüe edilmiştir. Ekstrelerden 5 mg/ml konsantrasyonda dimetil sülfoksitte hazırlanan stok çözeltilerden, 1:8 oranında seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan her

konsantrasyondaki çözeltinin 10 µl'si mikrolaka kuyucuklarına aktarılmıştır. Üzerlerine 190 µl ABTS solüsyonu eklenmiştir. Çözelti, 30 dakika oda sıcaklığında tutulduktan hemen sonra absorbansları 734 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak troloks kullanılmış ve sonuçlar İK₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir (Zou ve ark., 2011).

5.4.3. *In vitro* anti-enflamatuvar aktivite

Anti-inflamatuvar aktivite tayini için Phosrithong ve arkadaşlarının metodu bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (Phosrithong ve Nuchtavorn, 2016; Şen ve ark., 2019). Farklı konsantrasyonlarda 10 µL ekstre/standart üzerine 20 µL etanol ve 20 µL borat tamponu ve 25 µL tip V soya lipoksijenaz çözeltisi (20.000 U/ml) ilave edilmiştir. Karışım 5 dakika 25°C'de inkübe edildikten sonra 100 µL 0,6 mM linoleik asit çözeltisi eklenerek karışım iyice karıştırılmış ve 234 nm'de absorbanstaki değişim 6 dakika süreyle kaydedilmiştir. İndometasin referans standart olarak kullanılmıştır. Yüzde inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A \text{ kontrol} - A \text{ örnek}) / A \text{ kontrol}] \times 100$$

İK₅₀ değerlerini belirlemek için bir doz-cevap eğrisi çizilmiştir. İK₅₀, enzimin aktivitesinin %50'sini inhibe etmek için yeterli olan ekstre konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Tüm analizler üç kez tekrarlanmıştır (Phosrithong ve ark., 2016).

5.4.4. Toplam fenol bileşik miktar tayini (TFB)

Ekstrenin toplam fenol içeriği, Folin-Ciocalteu solüsyonu kullanılarak Gao ve arkadaşlarının metoduna göre yapılmıştır (Gao ve ark., 2000; Şen ve ark., 2019). Ekstreden 5 mg/ml konsantrasyonda dimetil sülfoksitte hazırlanan stok çözeltiden yapılan dilüsyonlar ile çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 10 µL mikrolakalara alınmış ve ardından sırasıyla 20 µL Folin-Ciocalteu solüsyonu, 200 µL ultra saf su ve 100 µL %15'lik Na₂SO₄ ilave edilmiştir. Çözeltiler 765 nm absorbansta diğer bileşenler sabit kalmak şartıyla, sadece ekstrenin yerine aynı miktarda DMSO konularak oluşturulan köre karşı okunmuştur. Standart eğri grafiği için, gallik asit

kullanılarak (500-0,977 µg/ml) her bir konsantrasyona karşılık gelen absorbanslar ölçülmüştür. Ekstrenin toplam fenolik bileşik miktarı, bu grafikten hesaplanarak sonuçlar mg GAE / g bitki ekstresi olarak ifade edilmiştir. Ekstrenin ölçümleri üç defa, standart eğri ölçümleri ise beş defa tekrarlanmıştır.

5.5. Safra Kanalı Bağlama Yöntemi

Anestezi sonrası (ketamin 100 mg/kg ve ksilazin 10 mg/kg) orta hat kesisi ile karın bölgesi açılmıştır. Criado ve ark tekniğine uygun olarak karaciğer lobları ile duodenumun arasından yerleşmiş olan safra kanalı gözlenerek çevre dokulardan temizlenmiştir. Ortaya çıkarılan safra kanalına birincisi hepatik kanalın birleşiminin altında ikincisi ise pankreatik kanalın girişinin üzerine olacak şekilde tıkanma oluşturmak amacıyla iki yerden 4,0 ipek ile düğüm atıldı ve bu iki düğüm arasındaki bağlantıya kesi işlemi yapılmıştır. Son olarak cilt ve cilt altı birbirinden bağımsız olarak devamlı sütürle kapatılıp, cerrahi işlem tamamlanmıştır (Criado ve ark. 1997). Taklit operasyonlu sıçanlarda ise, karında bir kesi yapıp safra kanalı gözlenmiş ancak bağlama yapılmaksızın kesi yeri kapatılmıştır.

5.6. Gruplar ve Deney Protokolü:

Çalışmamızda randomize 4 grup oluşturulmuştur.

Kontrol (K) grubu (n=12): Taklit operasyonu yapılan hayvanlara 28 gün boyunca oral yoldan 1 ml serum fizyolojik (SF) verilmiştir.

Küsküt (Küs) grubu (n=12): Taklit operasyonu yapılan hayvanlara 28 gün boyunca 250 mg/kg dozunda küsküt ekstresi (1 ml) oral gavaj ile verilmiştir.

Safra kanalı bağlı (SKB) grup: 14 sıçana safra kanalı bağlama işlemi gerçekleştirilmiş ve 28 gün boyunca oral yoldan 1 ml SF uygulanmıştır.

Küsküt ekstresi ile tedavili SKB (SKB+Küs) grubu: 14 sıçana safra kanalı bağlama işlemi gerçekleştirilmiş ve 28 gün boyunca 250 mg/kg dozunda küsküt ekstresi (1 ml) oral gavaj ile verilmiştir.

Hayvanlar 22. gün itibari ile aşağıda metodları verilen bilişsel testlere tabi tutulmuşlar ve deney 28. günde sonlandırılmıştır.

Hayvanlar deneyin başlangıcında ve sonunda (dekapitasyon öncesi) olmak üzere iki kere tartılmıştır. 28. günde her grup ikiye ayrılmış ve hayvanların yarısı kan-beyin bariyeri ölçümü için ayrılmış, diğer yarısı dekapite edilerek kan, karaciğer ve beyin doku örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinde ALT, AST, total bilirubin ve direkt bilirubin tayinleri yapılmıştır. Karaciğer dokularından alınan örneklerden ise TGF- β , Na⁺/K⁺ATPaz, hidrokspirolin ve 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) parametreleri tayin edilmiştir. Ayrıca karaciğer ve beyin doku kesitlerinde ışık mikroskobu altında histolojik incelemeler yapılmıştır. Beyin dokuları homojenizasyon işlemi sonrası kan beyin bariyeri geçirgenlik incelemeleri için spektrofotometrik analiz yapılmıştır.

5.6.1. Bilişsel (kognitif) testler

5.6.1.1. Moris su labirenti testi

Su havuzu paslanmaz çelik dairesel bir tanktan (çapı 160cm, yüksekliği 35cm) oluşmaktadır. Tank 4 sabit noktadan 4 kadran oluşturacak şekilde bölünmüştür. Bu havuz içerisinde havuzla aynı renkte (görüntüyle ilgili herhangi bir yanlış pozitif sonucu elimine etmek için) 10x10x10 cm ölçülerinde bir kaçış platformu içermiştir. Bu platform çalışma boyunca havuzun sabit bir kadranında ve su yüzeyinin 1,5 cm altında tutulmuştur. Sıçanlar yüzleri duvara bakar bir halde kaçış alanı bulunmayan bir kadranın kenarında bir başlangıç noktasına yavaşça bırakılmıştır. Eğer sıçan 90 saniye içerisinde kaçış platformunu bulmayı başaramazsa kibarca platforma yönlendirilmiş ve 30 saniye boyunca üzerinde kalmasına izin verilmiştir. Hayvanlara 4 ardışık gün boyunca 10'ar dakika ayrılarak 4 deneme yapılmış ve bu süre zarfında 3 parametre değerlendirilmiştir: Platforma ulaşmak için geçen süre, yüzme mesafesi ve yüzme hızı.

5.gün, önceki denemeden 24 saat sonra, kaçış platformu çıkarılmış ve hayvanlar çalışmayı sonlandırmadan önce 75 saniye boyunca serbest bir şekilde yüzmeye bırakılarak prob çalışmaları başlatılmıştır. Bu prob çalışmasında hayvanın hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirdiği süre hesaplanmıştır. Bu test uzaysal öğrenme ve hafızanın bir ölçüsü olarak kabul edilmiştir (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.6.1.2. Yeni obje tanıma testi

Yeni obje tanıma testi 50x50x30 cm siyah pleksiglastan yapılmış bir düzenekte yarı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Her bir hayvan teste alınmadan önce objeler ve düzenek etanolle temizlenmiştir. Yeni obje tanıma testine başlamadan bir gün önce alıştırma yapılır ve ertesi gün teste geçilmiştir. Alıştırma gününde aynı kafesteki hayvanlar pleksiglas düzeneğe obje olmaksızın yerleştirilmiş ve 60 dakika boyunca test düzeneğine alışmaları sağlanmıştır. Alıştırma süreci tüm hayvanlar için uygulanmıştır. Test gününde her bir hayvan 60 dakika arayla 3 dakika süresince düzeneğe yerleştirilmiştir. İlk yerleştirme tanıma evresi olarak adlandırılmıştır. Bu süreçte aynı iki nesne test düzeneğine yerleştirilecek ve 3 dakika boyunca hayvan düzenekte serbestçe gezinerek bu nesnelere tanıması sağlanmıştır. 3 dakika süre dolduğunda hayvan düzenekten alınarak kafesine konulmuştur (T1). 60 dakika sonra aynı hayvan tekrar düzeneğe alınmış ve T1'de görmüş olduğu objelerden bir tanesi değiştirilerek 3 dakika boyunca serbestçe gezinmesi sağlanmıştır (T2). Her iki periyod da bilgisayar destekli kamera sistemi yardımıyla kayıt altına alınmış ve hayvanların T2'de her iki objeye olan ilgileri skorlandırılmıştır. Hayvanın yeni objeye karşı olan ilgisinin eski objeye karşı olan ilgisine oranı bu hayvanın öğrenme ve bellek fonksiyonunun bir ölçüsü olarak kabul edilmiştir (Bevins ve Besheer, 2006).

5.6.2. Kan beyin bariyeri ölçüm yöntemi

Kan-beyin bariyeri permeabilitesini değerlendirmek için intakt kan-beyin bariyerini geçemeyen albümin proteinine bağlanan Evans mavisi boyası (Sigma-Aldrich, E2129) kullanılmıştır. Deneylerin sonunda ketamin (Ketalar, 100 mg/kg) ve klorpromazin (Largactil, 10 mg/ml) anestezisi altında sıçanlara juguler venden %2' lik Evans mavisi (4 ml/kg) injekte edilmiştir. 30 dakika sonra evans mavisinin dolaşımdan uzaklaştırılması için sıçanların göğüs kafesi açılıp sol ventrikülden girildi ve aortaya ulaşılmıştır. Sağ atriya bir kesi atılarak buradan çıkan dolaşım sıvısı berraklaşınca kadar %0,9' luk serum fizyolojik ile yaklaşık 15 dakika boyunca transkardiyak perfüzyon yapılmıştır. Sıçanlar dekapite edilerek beyin dokusu çıkarılmış ve tartılmıştır. Beyin doku örnekleri 2,5 ml fosfat tamponlu salin çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Dokudaki proteini

çökeltmek amacıyla %60' lık trikloroasetik asit (2 ml) eklendikten sonra 2 dakika boyunca örnekler vortekste karıştırılmıştır. +4°C' de soğutulan örnekler 10 dakika 3000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Süpernatandaki Evans mavisinin absorbansı spektrofotometrede 620 nm' de ölçülmüştür. Değerler mg/mg doku şeklinde hesaplanarak ifade edilmiştir (Kaya ve Ahishali, 2011).

5.7. Serumda Yapılan İncelemeler

5.7.1. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), total bilirubin (TB) ve direkt bilirubin (DB) tayini:

SKB kaynaklı karaciğer hasarını değerlendirmek için karaciğer enzimleri olan ALT, AST ve bilirubin ölçülmüştür (Limdi ve ark., 2003). Serum AST, ALT, DB ve TB spektrofotometrik yöntemlerle ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür (BT Laboratory, Shanghai).

5.8. Dokuda Yapılan İncelemeler

5.8.1. Na⁺/K⁺-ATPaz tayini

Dokuda Na-K-ATPase seviyeleri ticari kit (AFG, EK720668) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Doku örnekleri PBS (pH 7.4) içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm' de +4°C' de santrifüj edildi ve üst faz kit ölçümleri için kullanılmıştır.

Kitin ölçüm aralığı 50-1000 pg/ml ve sensitivitesi 20 pg/ml

Standartların hazırlanması: Kitin içindeki stok standart (1350 pg/ml) dilüe edilerek 900 pg/ml-75 pg/ml aralığında standart hazırlanmıştır. Bunun için:

900 pg/ml	Standart No.5	100 µl Stok standart	+ 100 µl standart dilüent
600 pg/ml	Standart No.4	100 µl Standart No.5	+ 100 µl standart dilüent
300 pg/ml	Standart No.3	50 µl Standart No.4	+ 100 µl standart dilüent
150 pg/ml	Standart No.2	50 µl Standart No.3	+ 100 µl standart dilüent
75 pg/ml	Standart No.1	50 µl Standart No.2	+ 100 µl standart diluent

0 pg/ml Standart No.1 0 µl Standart No.1 + 100 µl standart diluent

Deneyin yapılışı: Hazırlanan örnek ve standartlar için kit içerisindeki özel antikor bağlı plakalar kullanılmıştır.

1. Plakalardaki kuyucuklara her bir standarttan 50 µl, her bir örnekten 10 µl eklenerek üzerine 40 µl dilüsyon tamponu konulmuştur. Kör kuyucuğuna hiçbir şey eklenmemiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
2. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
3. Örneklerin ve standartların üzerine 50 µl HRP konjugatlı reaktif eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
5. Kör kuyucuk dahil her bir kuyucuğa önce 50 µl substrat Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B substrat solüsyon eklenip karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonunda mavi renk oluşumu gözlenince, 50 µl durdurma solüsyonu konulup oluşan sarı rengin absorbansı 450 nm'de ölçülmüştür.
7. Standart konsantrasyonlarından elde edilen grafik sonucundaki değerlere göre örneklerin içerisinde bulunan Na-K-ATPase değerleri hesaplanmıştır.

5.8.2. Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF-β) tayini

Dokuda TGF-β seviyeleri ticari kit (AFG, EK720060) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Doku örnekleri PBS (pH 7.4) içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş ve üst faz kit ölçümleri için kullanılmıştır.

Kitin ölçüm aralığı 10 ng/ml-200 ng/ml ve sensitivitesi 3 ng/ml

Standartların hazırlanması: Kitin içindeki stok standart (225 ng/ml) dilüe edilerek 150 ng/ml-12.5 ng/ml aralığında standart hazırlanmıştır. Bunun için:

150 ng/ml Standart No.5 100 µl Stok standart + 100 µl standart dilüent

100 ng/ml	Standart No.4	100 µl Standart No.5 + 100 µl standart dilüent
50 ng/ml	Standart No.3	50 µl Standart No.4 + 100 µl standart dilüent
25 ng/ml	Standart No.2	50 µl Standart No.3 + 100 µl standart dilüent
12.5 ng/ml	Standart No.1	50 µl Standart No.2 + 100 µl standart diluent
0 ng/ml	Standart No.1	0 µl Standart No.1 + 100 µl standart diluent

Deneyin yapılışı: Hazırlanan örnek ve standartlar için kit içerisindeki özel antikor bağlı plakalar kullanılmıştır.

1. Plakalardaki kuyucuklara her bir standarttan 50 µl, her bir örnekten 10 µl eklenerek üzerine 40 µl dilüsyon tamponu konulmuştur. Kör kuyucuğuna hiçbir şey eklenmemiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
2. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
3. Örneklerin ve standartların üzerine 50 µl HRP konjugatlı reaktif eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
5. Kör kuyucuk dahil her bir kuyucuğa önce 50 µl substrat Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B substrat solüsyon eklenip karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonunda mavi renk oluşumu gözlenince, 50 µl durdurma solüsyonu konulup oluşan sarı rengin absorbansı 450 nm'de ölçülmüştür.
7. Standart konsantrasyonlarından elde edilen grafik sonucundaki değerlere göre örneklerin içerisinde bulunan TGF-b değerleri hesaplanmıştır.

5.8.3. Hidroksiprolin tayini

Dokuda Hydroxyproline seviyeleri ticari kit (AFG, EK720734) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Doku örnekleri PBS (pH 7.4) içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş ve üst faz kit ölçümleri için kullanılmıştır.

Kitin ölçüm aralığı 1 ug/ml-20 ug/ml ve sensitivitesi 0,5 ug/ml

Standartların hazırlanması: Kitin içindeki stok standart (22.5 ug/ml) dilüe edilerek 15 ug/ml-1.25 ug/ml aralığında standart hazırlanmıştır. Bunun için:

15 ug/ml	Standart No.5	100 µl Stok standart + 100 µl standart dilüent
10 ug/ml	Standart No.4	100 µl Standart No.5 + 100 µl standart dilüent
5 ug/ml	Standart No.3	50 µl Standart No.4 + 100 µl standart dilüent
2.5 ug/ml	Standart No.2	50 µl Standart No.3 + 100 µl standart dilüent
1.25 ug/ml	Standart No.1	50 µl Standart No.2 + 100 µl standart diluent
0 ug/ml	Standart No.1	0 µl Standart No.1 + 100 µl standart diluent

Deneyin yapılışı: Hazırlanan örnek ve standartlar için kit içerisindeki özel antikor bağlı plakalar kullanılmıştır.

1. Plakalardaki kuyucuklara her bir standarttan 50 µl, her bir örnekten 10 µl eklenerek üzerine 40 µl dilüsyon tamponu konulmuştur. Kör kuyucuğuna hiçbir şey eklenmiştir. 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
2. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
3. Örneklerin ve standartların üzerine 50 µl HRP konjugatlı reaktif eklenmiştir. 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
5. Kör kuyucuk dahil her bir kuyucuğa önce 50 µl substrat Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B substrat solüsyon eklenip karanlıkta 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonunda mavi renk oluşumu gözlenince, 50 µl durdurma solüsyonu konulup oluşan sarı rengin absorbansı 450 nm’de ölçülmüştür.
7. Standart konsantrasyonlarından elde edilen grafik sonucundaki değerlere göre örneklerin içerisinde bulunan Hydroxyproline değerleri hesaplanmıştır.

5.8.4. 8-OHdG tayini

Dokuda 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) seviyeleri ticari kit (AFG, EK720424) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Doku örnekleri PBS (pH 7,4) içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş ve üst faz kit ölçümleri için kullanılmıştır.

Kitin ölçüm aralığı 0,625 ng/ml-20 ng/ml ve sensitivitesi 0,078 ng/ml

Standartların hazırlanması: Kitin içindeki stok standart (22,5 ng/ml) dilüe edilerek 15 ng/ml-1,25 ng/ml aralığında standart hazırlanmıştır. Bunun için:

15 ng/ml	Standart No.5	100 µl stok standart	+ 100 µl standart dilüent
10 ng/ml	Standart No.4	100 µl Standart No.5	+ 100 µl standart dilüent
5 ng/ml	Standart No.3	50 µl Standart No.4	+ 100 µl standart dilüent
2,5 ng/ml	Standart No.2	50 µl Standart No.3	+ 100 µl standart dilüent
1,25 ng/ml	Standart No.1	50 µl Standart No.2	+ 100 µl standart diluent
0 ng/ml	Standart No.1	0 µl Standart No.1	+ 100 µl standart diluent

Deneyin yapılışı: Hazırlanan örnek ve standartlar için kit içerisindeki özel antikor bağlı plakalar kullanılmıştır.

1. Plakalardaki kuyucuklara her bir standarttan 50 µl, her bir örnekten 10 µl eklenerek üzerine 40 µl dilüsyon tamponu konulmuştur. Kör kuyucuğuna hiçbir şey eklenmemiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
2. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
3. Örneklerin ve standartların üzerine 50 µl HRP konjugatlı reaktif eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. 30 dakika sonunda 30X olan yıkama tamponu 1X yapıp hazırlanan yıkama tamponu ile plaka 5 defa yıkama yapılmıştır.
5. Kör kuyucuk dahil her bir kuyucuğa önce 50 µl substrat Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B substrat solüsyon eklenip karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyon sonunda mavi renk oluşumu gözlenince, 50 µl durdurma solüsyonu konulup oluşan sarı rengin absorbanı 450 nm'de ölçülmüştür.
7. Standart konsantrasyonlarından elde edilen grafik sonucundaki değerlere göre örneklerin içerisinde bulunan 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) değerleri hesaplanmıştır.

5.8.5. Histolojik incelemeler

Karaciğer ve beyinden alınan numuneler %10'luk formaldehit ile sabitlenerek ışık mikroskobu incelemelerinde kullanılmış ve dereceli olarak alkol konsantrasyonu artırılmıştır. Toluene ile temizlenen örnekler parafine gömülmüştür. Doku kesitleri (5 µm) genel morfoloji incelemeleri için hematoksilin ve eozin (H&E) ile ve fibrozun belirlenmesi için de Gomori'nin tek basamaklı trikromu ile boyanmıştır. Ardından bir fotomikroskop (Olympus BX51)'un dijital kamerası (Olympus, Tokyo, Japonya) ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Deney gruplarının her birinde, histopatolojik incelemeler için her hayvandan bir kesit ve kesitin her birinde en az beş benzer bölge gözlemlenmiştir.

5.9. İstatistik Yöntemi

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Tüm veriler ortalama \pm S.E.M olarak ifade edilmiştir. Veri grupları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Küsküt (*Cuscuta* sp.) Metanol Ekstresinin Anti-inflamatuvar, Antioksidan Aktiviteleri ve Toplam Fenolik Bileşik İçerikleri

Ölçümlerde elde edilen düşük İK₅₀ (Radikalin % 50'sini ortadan kaldıran veya enzimin aktivitesini % 50 oranında durduran konsantrasyon) değeri yüksek aktiviteli olduğunu gösterir. Tablo 1 incelendiğinde, Ks ekstresinin 125.5 µg/ml'lik İK₅₀ değeriyle DPPH radikaline karşı iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Elde edilen ekstre aynı zamanda, 138.9 µg/ml'lik İK₅₀ değeriyle ABTS radikaline karşı önemli bir antioksidan aktivite sergilemiştir. 5-lipoksijenaz enzimine karşı, 103.5 µg/ml'lik İK₅₀ değeriyle iyi derecede bir anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Küsküt ekstresinin, total fenolik bileşik miktarı g ekstrede gallik asite eşdeğer olarak 38.58 mg/g olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Küsküt ekstresinin Antioksidan/Anti-inflamatuvar Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşik İçeriği

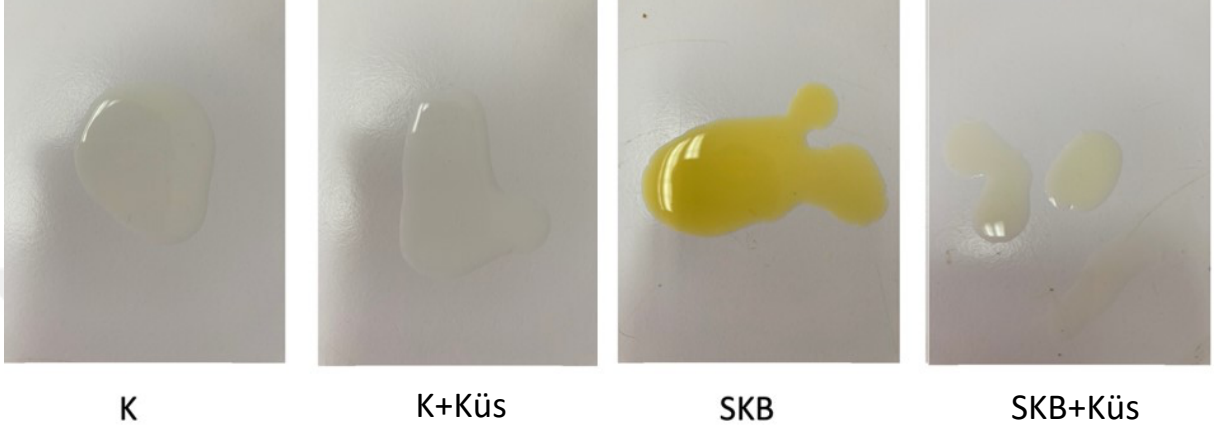
Deneyle	Küsküt ekstresi	Askorbik asit	Troloks	İndometasin
DPPH radikal süpürücü aktivite (İK ₅₀ , µg/ml)	125,5±0,14 ^b	17,6 ±0,37 ^a		
ABTS radikal süpürücü aktivite (İK ₅₀ , µg/ml)	138,9±0,28 ^b		13,00 ±0,21 ^a	
Anti-lipoksijenaz aktivite (İK ₅₀ , µg/ml)	103,5±4,72 ^b			22,39 ±0,26 ^a
Total fenolik bileşik içeriği (mg GAE/g ekstre)**	38,58±0,39 ^b			

*Toplam fenolik içerik gallik asit eşdeğeri olarak ifade edildi (GAE).

**Tablodaki her bir değer ortalama ± SD (n=3) olarak verilmiştir. Aynı satırda yer alan değerler üzerinde üssü olarak gösterilen farklı harfler değerler arasında önemli farklılıkları gösterir (p<0,05).

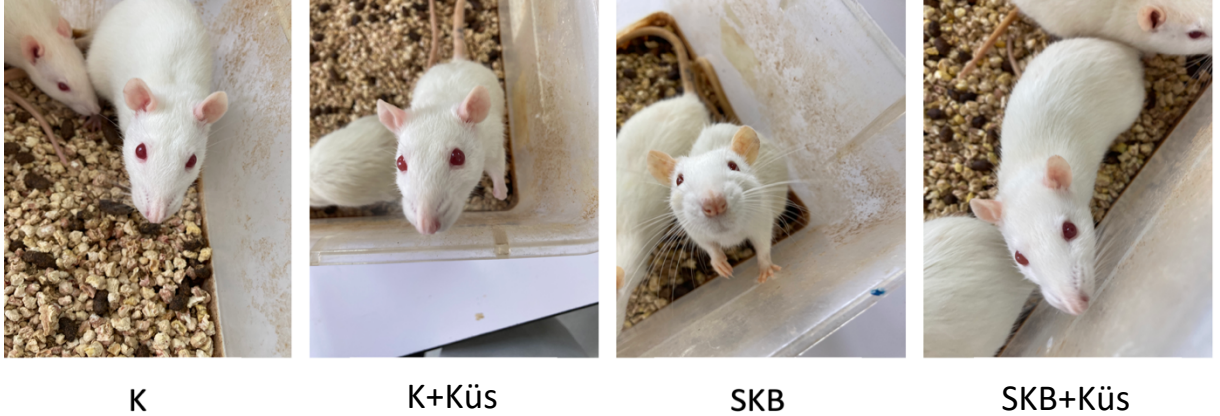
6.2. Karaciğer Hasarı Sonucu Gelişen Siroz ve Buna Bağlı Meydana Gelen Kulak ve İdrar Renk Değişimleri

6.2.1. Siroza bağlı gelişen idrar renk değişimi



Şekil 12: Tüm gruplara göre idrar renklerinin değişimine ait görsel. K: Kontrol, SKB: Safra Kanalı Bağlı, Küs: Küsküt Otu.

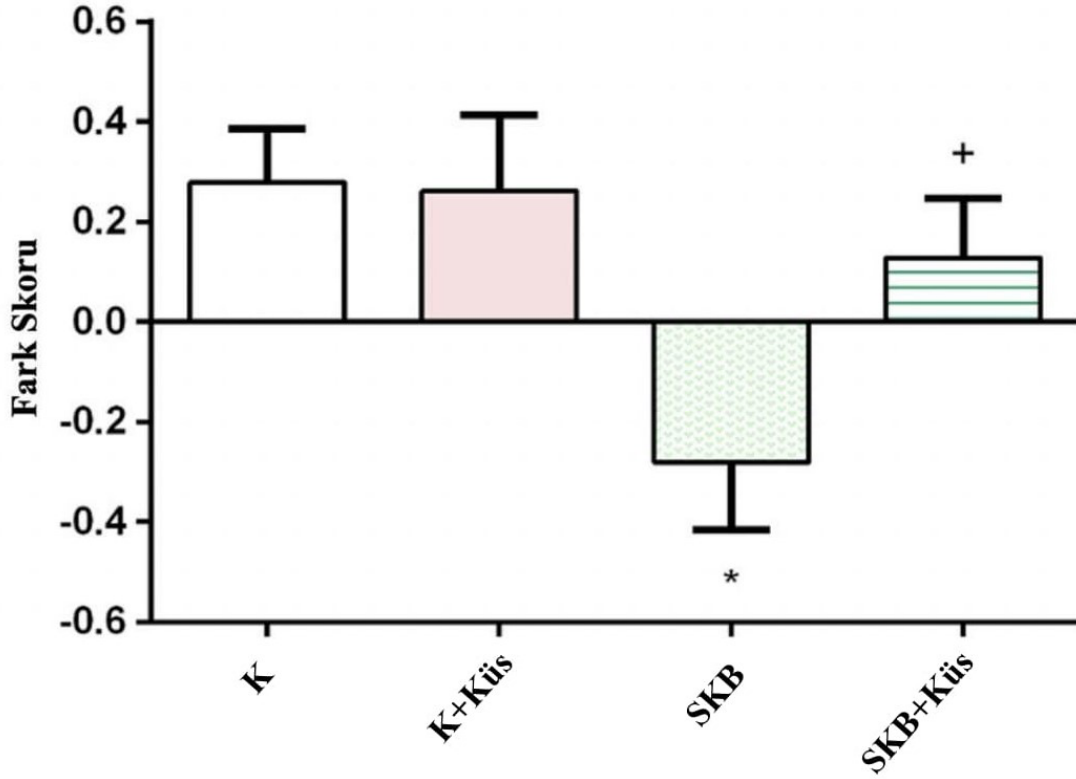
6.2.2. Siroza bağlı gelişen kulak renk değişimi



Şekil 13. Tüm gruplara ait kulak renklerinin değişiminine ait görsel. K: Kontrol, SKB: Safra Kanalı Bağlı, Küs: Küsküt Otu.

6.3. Yeni Obje Tanıma Testi Bulguları

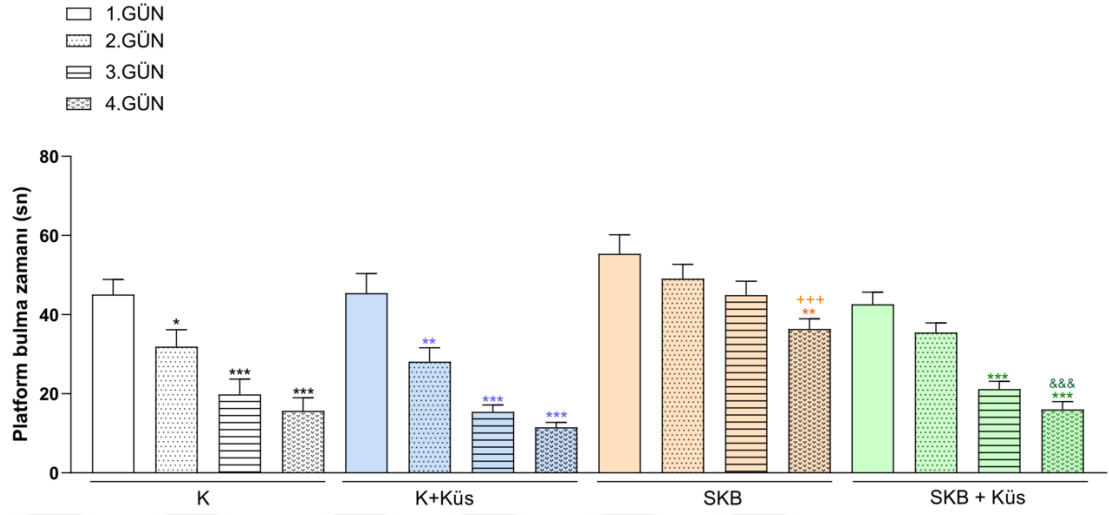
Deney sonunda yapılan yeni obje tanıma testi verilerine göre, SKB grubunun fark skoru K grubuyla kıyaslandığında anlamlı ($p<0,05$) olarak bir düşüş görülmüştür. Ayrıca SKB+Küs grubunun fark skoru SKB grubuyla kıyaslandığında anlamlı ($p<0,05$) olarak bir artış görülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. Yeni obje tanıma testine ait fark skoru grafiği. K: Kontrol, SKB: Safra Kanlı Bağlı, Kus: Küsküt Otu. Objeye tanıma testine ait veriler Mann-Whitney U non-parametrik testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p < 0,05$: Kontrol grubuna göre, + $p < 0,05$: SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

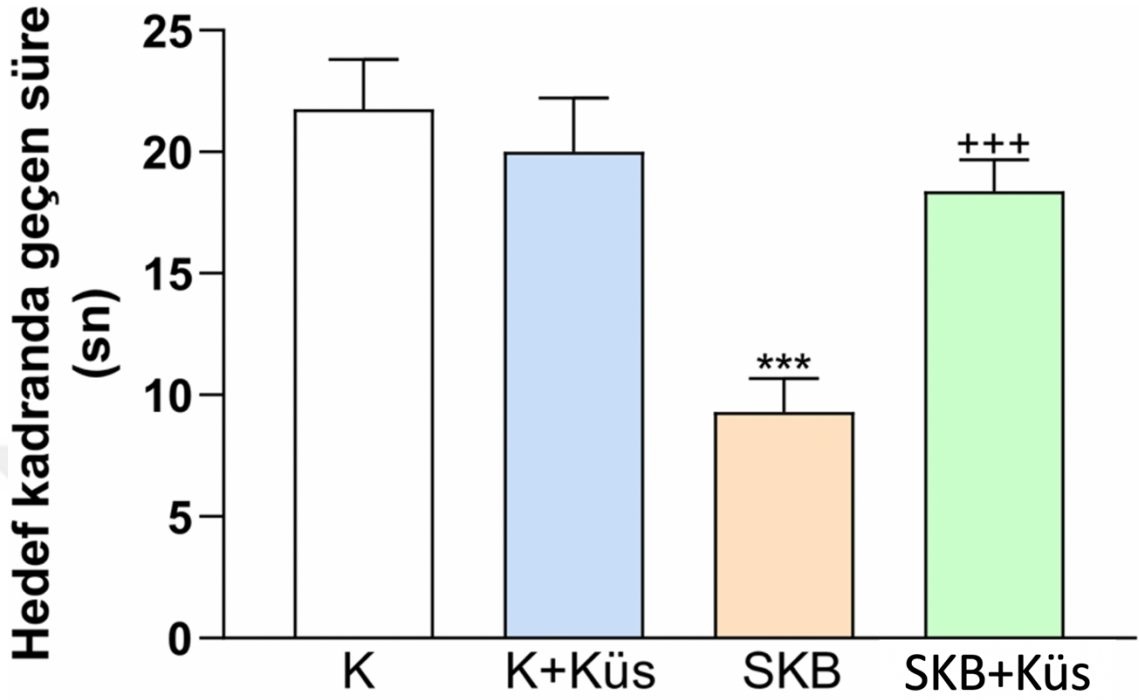
6.4. Morris Su Labirent Testi Bulguları

Yeni obje tanıma testinin ardından yapılan Morris su labirent testi alıştırmaya verilerine göre, tüm gruplarda ve testin birinci gününde, platformu bulma süresi en yüksek olup dördüncü günde en düşük seviyede olmuştur. Safra kanalı bağlı grubunun platform bulma zamanı K grubuna göre anlamlı ($p < 0,01$) olarak yükseldiği görülürken, tedavi grubunda ise platform bulma zamanını SKB grubuna göre anlamlı ($p < 0,001$) olarak düşmüştür (Şekil 15).



Şekil 15. Morris su labirent testine ait öğrenme performanslarının değerlendirildiği platform bulma zaman grafiği. K: Kontrol, SKB: Safra Kanalı Bağlı, Küs: Küsküt Otu. Morris su labirent testine ait veriler Mann-Whitney U non-parametrik testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ her grubun kendi içinde 1. gününe göre, +++ $p<0,001$ her grubun 4. günü ile kontrol grubunun 4. gününe göre, &&& $p<0,001$ SKB+Küs grubunun 4. günü ile SKB grubunun 4. gününe göre karşılaştırmalar.

Test günü bulgularına göre SKB grubunun platform bulma zamanı K grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir yükselme ($p<0,001$); SKB+Küs grubunun platform bulma zamanı SKB grubuyla kıyaslandığında anlamlı ($p<0,001$) olarak düşüş görülmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. Morris su labirent testine ait hedef kadranda geçen süre grafiği. K: Kontrol, SKB: Safra Kanalı Bağlı, Küs: Küsküt Otu. Morris su labirent testine ait veriler Mann-Whitney U non-parametrik testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. ***p<0,001 Kontrol grubuna göre, +++p<0,001 SKB grubuna göre.

6.5. Ağırlık Değişimi

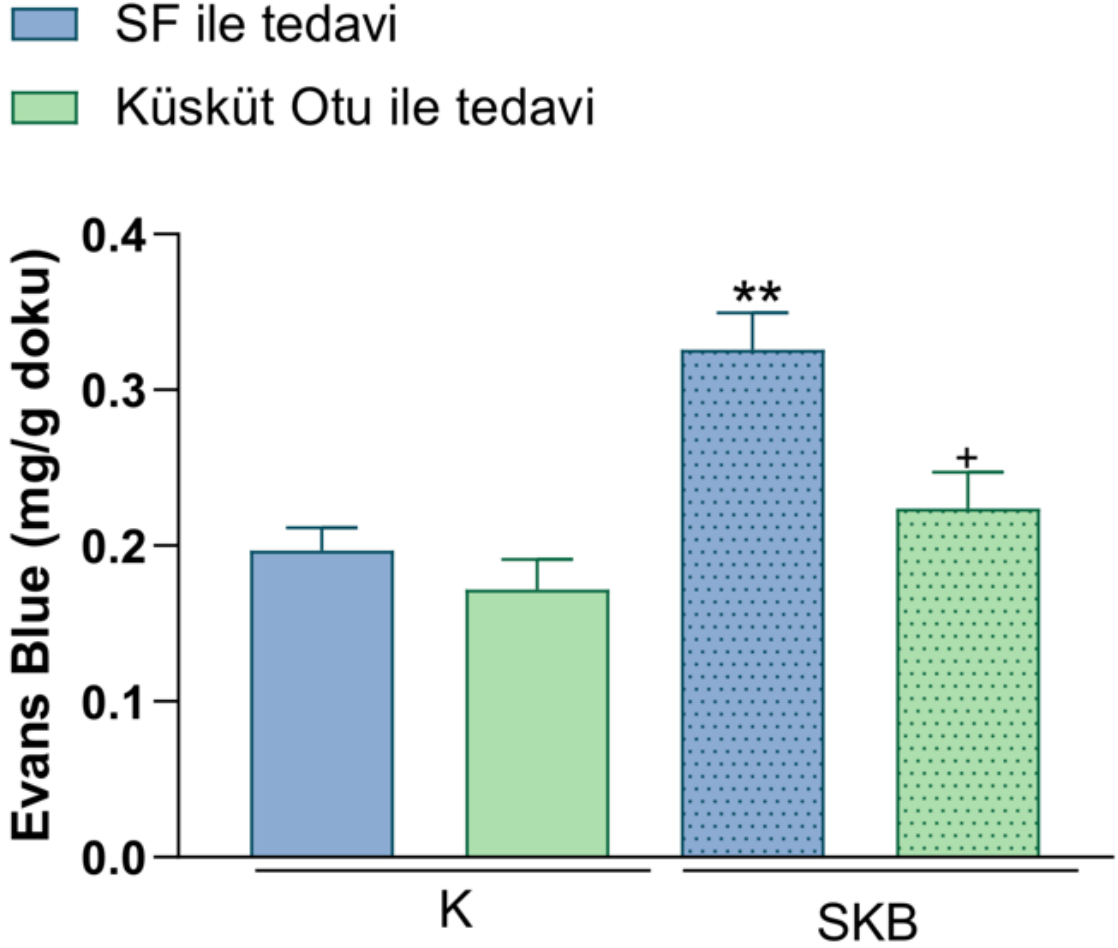
Vücut ağırlıkları değerlendirilirken deneyin başlangıcında (t1) ve sonunda (t2) kaydedilen vücut ağırlıkları karşılaştırılmıştır. Her grubun kendi içinde t1 ve t2 değerleri (***) arasında anlamlı farklılıklar bulunmuş ve tüm gruplarda kilo alımı olduğu gözlemlenmiştir. Gruplar arasında gerek başlangıç gerekse son dönemde vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. (Tablo 2).

Tablo 2. Grupların deney başında (t1) ve deney sonunda (t2) ölçülen vücut ağırlıkları. ***p<0,001: t1 ve t2 arasındaki karşılaştırmalar. K: Kontrol, SKB: Safra Kanalı Bağlı, Küs: Küsküt Otu, SF: Salin.

Vücut Ağırlığı	K+SF	K+Küs	SKB+SF	SKB+Küs
t1	224±7,1	220 ± 4,6	235 ± 4,7	239 ± 5,1
t2	279 ± 6,3***	266 ± 10,1***	280 ± 10,5***	285 ± 5,8***

6.6. Kan Beyin Bariyeri Ölçümüne Ait Bulgular

Safra kanalı bağı grubun beyinde çalışılan Evans Blue absorbans seviyeleri K grubuna göre anlamlı ($p<0,01$) olarak yükseldiği görülürken, tedavili grupta ise bu seviyelerin SKB gurubuna göre anlamlı ($p<0,05$) olarak düştüğü görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. Kan Beyin Bariyeri geçirgenliğine ait sonuçlar. K: Kontrol grubu, SKB: Safra kanalı bağı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi için ANOVA kullanılmıştır. ** $p<0,01$; Kontrol grubuna göre, + $p<0,05$; SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

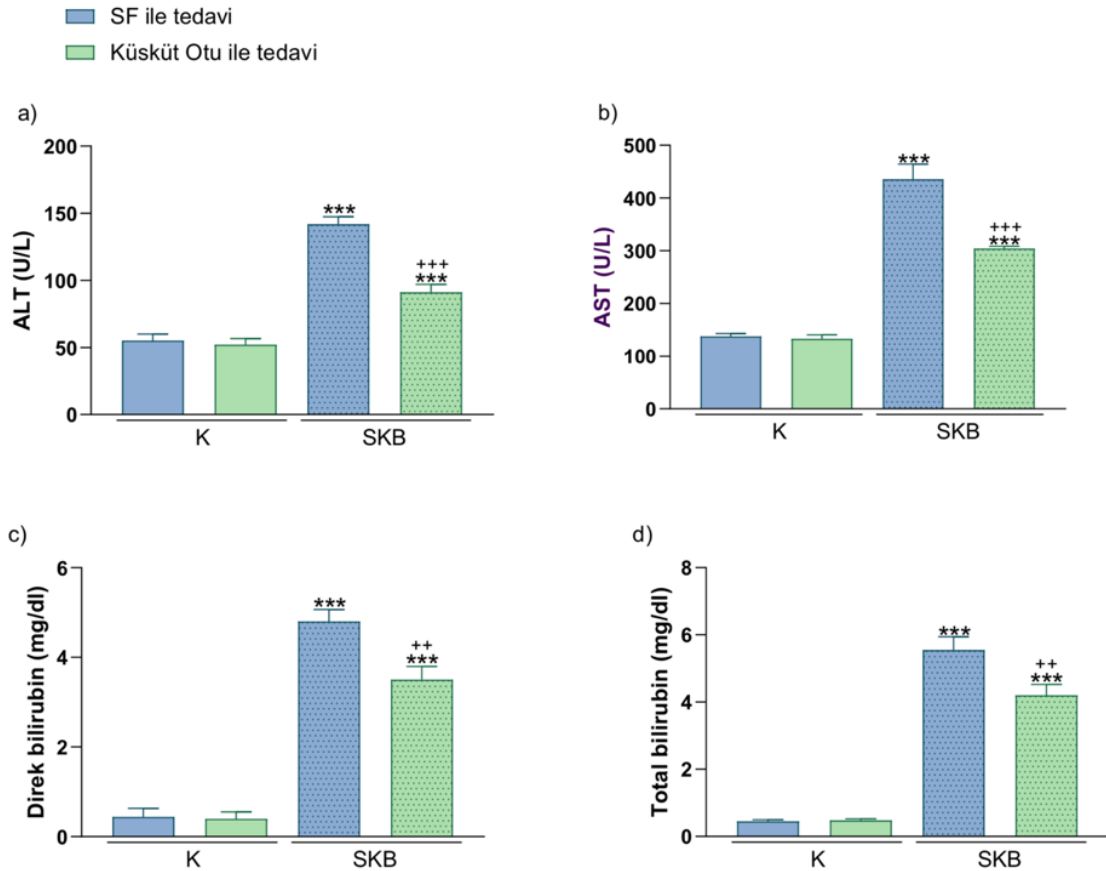
6.7. Serum Örneklerine Ait Bulgular

Safra kanalı bağı grubun serum AST, ALT DB ve TB seviyeleri K grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak yükseldiği görülürken, tedavili grubun AST, ALT DB ve TB seviyeleri SKB gurubuna göre anlamlı ($p<0,01$, $p<0,001$) olarak düşük bulunmuştur. Aynı zamanda

tedavili grubun serum AST, ALT, DB ve TB seviyeleri K grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 3 ve Şekil 18).

Tablo 3. Serum AST, ALT, DB TB değerleri. AST: Aspartra aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, DB: Direk bilirubin, TB: Total bilirubin, K: Kontrol grubu, SF: Salin, SKB: Safra kanalı bağı, Küs: Küsküt Otu. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrol grubuna göre, + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

Serum	K	K+Küs	SKB	SKB+Küs
AST (U/L)	137,8 ± 5,5	133,0 ± 7,6	435,5 ± 28,8***	304,3 ± 4,318***, +++
ALT (U/L)	55,3 ± 4,8	52,3 ± 4,4	142,0 ± 5,6***	91,3 ± 5,8***, ++
DB (mg/dl)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	4,8 ± 0,3***	3,5 ± 0,3***, ++
TB (mg/dl)	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,04	5,5 ± 0,4***	4,2 ± 0,32***, ++



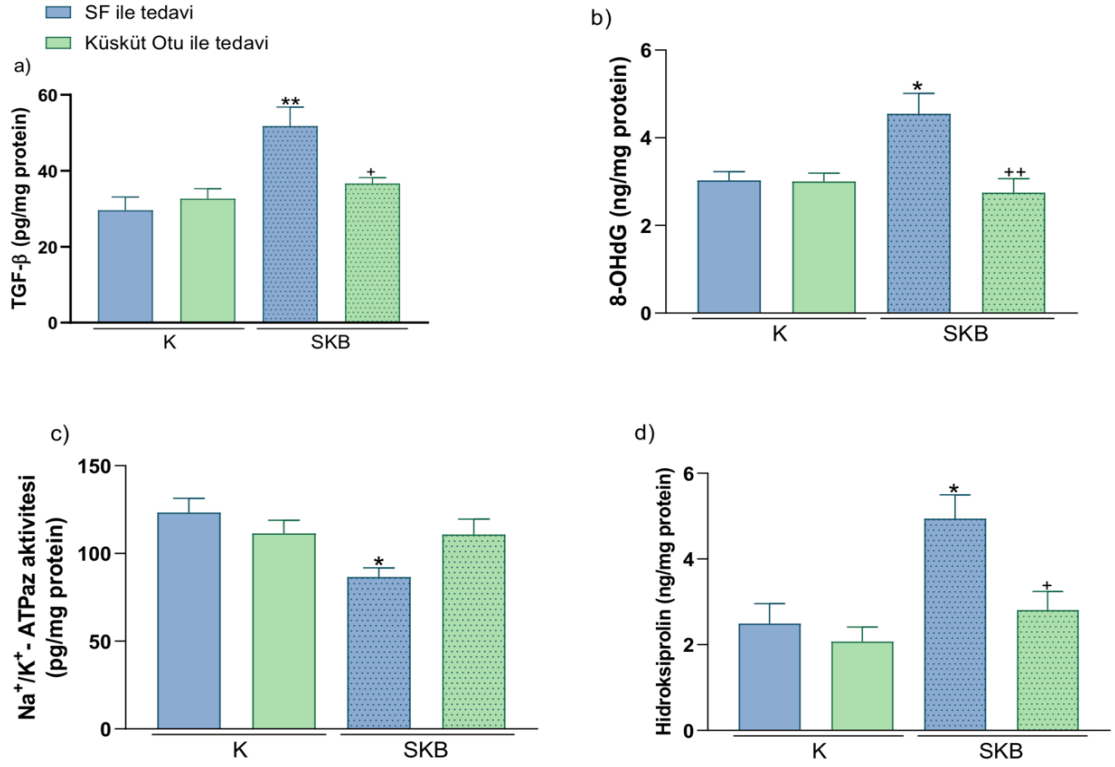
6.8. Karaciğer ve Beyin Doku Örneklerine Ait Bulgular

Safra kanalı bağlı grubun karaciğer dokularında TGF- β , 8-OHdG ve hidroksprolin seviyeleri K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$, $p<0,01$) olarak yükseldiği görülürken, tedavili grupta ise TGF- β , 8-OHdG ve hidroksprolin seviyeleri SKB gurubuna göre anlamlı ($p<0,05$, $p<0,01$) olarak düşük bulunmuştur (Tablo 4 ve Şekil 19a, 19b, 19d).

Safra kanalı bağlı grubun karaciğer dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz seviyelerinin K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) olarak düştüğü görülürken, tedavili grupta ise ise Na⁺/K⁺-ATPaz seviyelerini SKB gurubuna göre yüksek bulunmuştur ancak anlamlılık yoktur (Tablo 4 ve Şekil 19c).

Tablo 4. Karaciğer dokusunda TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz, Hidroksprolin değerleri. TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü, 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, Na⁺/K⁺-ATPaz: Sodyum-Potasyum adenzin trifosfataz, K: Kontrol grubu, SF: Salin, SKB: Safra kanalı bağlı, Küs: Küsküt Otu. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrol grubuna göre, + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

Karaciğer	K+SF	K+Küs	SKB+SF	SKB+Küs
TGF- β (pg/mg protein)	29,6 \pm 3,5	32,7 \pm 2,6	51,8 \pm 5,0**	36,7 \pm 1,6++
8-OHdG (ng/mg DNA)	3,0 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	4,5 \pm 0,5*	2,8 \pm 0,3++
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz (pg/mg protein)	123,3 \pm 8,1	111,4 \pm 7,6	86,6 \pm 5,2*	110,8 \pm 8,8
Hidroksprolin (ng/mg protein)	2,5 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3	4,9 \pm 0,6*	2,8 \pm 0,4+



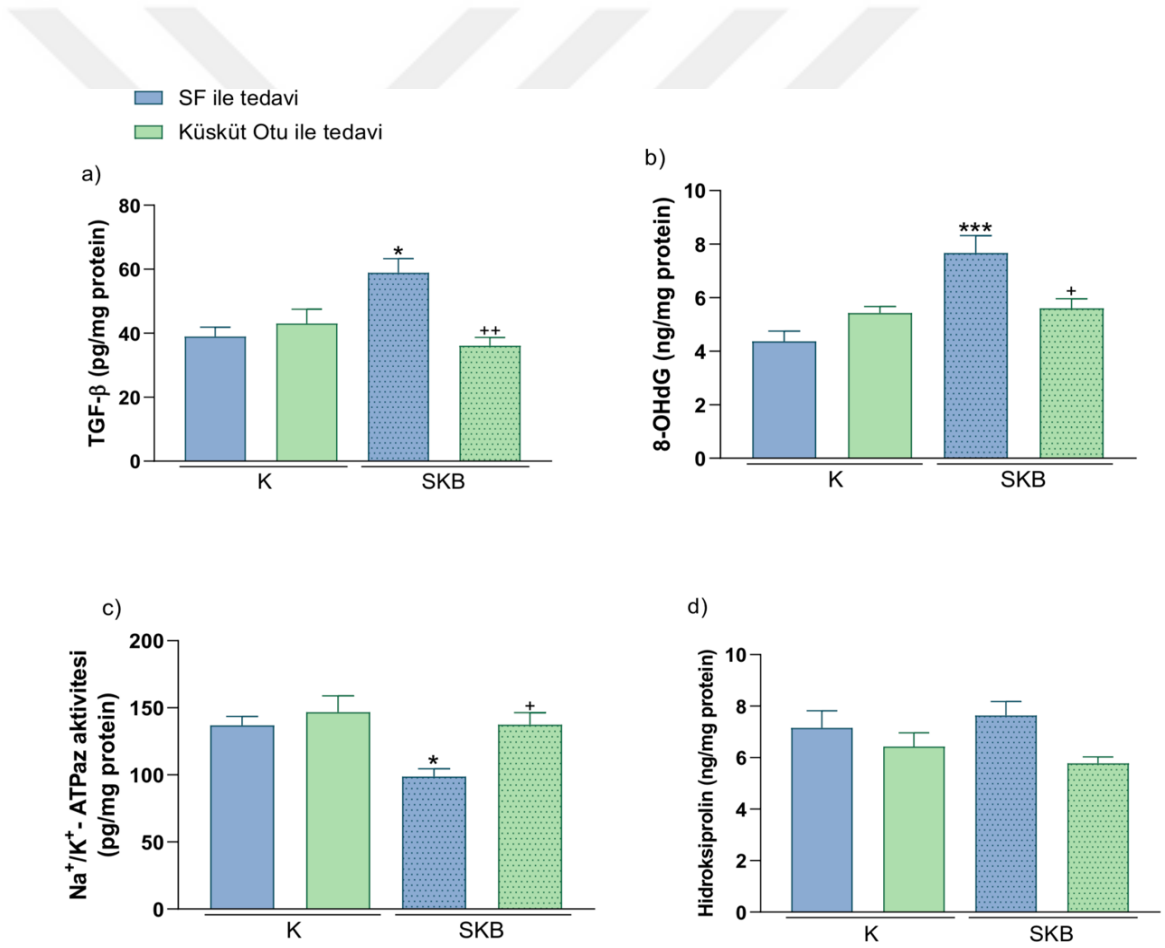
Şekil 19. Karaciğer dokusuna ait TGF-β, 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz ve Hidroksiprolin sonuçları. TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü, 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, Na⁺/K⁺-ATPaz: Sodyum-Potasyum adenozin trifosfataz, K: Kontrol grubu, SKB: Safra kanalı bağlı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA. *p<0,05, **p<0,01; Kontrol grubuna göre, +p<0,05, ++p<0,01; SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

Safra kanalı bağlı grubun beyin dokularında TGF-β, 8-OHdG seviyelerinin K grubuna göre anlamlı (p<0,05, p<0,001) olarak yükseldiği görülürken hidroksiprolin seviyelerinde herhangi bir artış görülmemiştir. Tedavili grupta ise TGF-β, 8-OHdG seviyeleri SKB grubuna göre anlamlı (p<0,05, p<0,01) olarak düştüğü görülürken, hidroksiprolin seviyelerinde düşüş görülse de bu anlamlı bulunamamıştır (Tablo 5 ve Şekil 20a, 20b, 20d).

Safra kanalı bağlı grubunun beyin dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz seviyelerinin K grubuna göre anlamlı (p<0,05) olarak düştüğü görülürken, tedavili grupta ise Na⁺/K⁺-ATPaz seviyeleri SKB grubuna göre yüksek bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 5 ve Şekil 20c).

Tablo 5. Beyin dokusunda TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz, Hidroksiprolin değerleri. TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü, 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, Na⁺/K⁺-ATPaz: Sodyum-Potasyum adenozin trifosfataz, K: Kontrol grubu, SF: Salin, SKB: Safra kanalı bağlı, Ks: Küsküt Otu. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrol grubuna göre, +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

Beyin	K+SF	K+Ks	SKB+SF	SKB+Ks
TGF- β (pg/mg protein)	39,0 \pm 2,9	43,0 \pm 4,5	58,9 \pm 4,4*	36,1 \pm 2,6 ⁺⁺
8-OHdG (ng/mg DNA)	4,4 \pm 0,4	5,4 \pm 0,2	7,7 \pm 0,7***	5,6 \pm 0,4 ⁺
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz (pg/mg protein)	137,0 \pm 6,6	146,7 \pm 12,2	98,8 \pm 5,8*	137,5 \pm 8,9 ⁺
Hidroksiprolin (ng/mg protein)	7,2 \pm 0,7	6,4 \pm 0,5	7,6 \pm 0,5	5,8 \pm 0,2

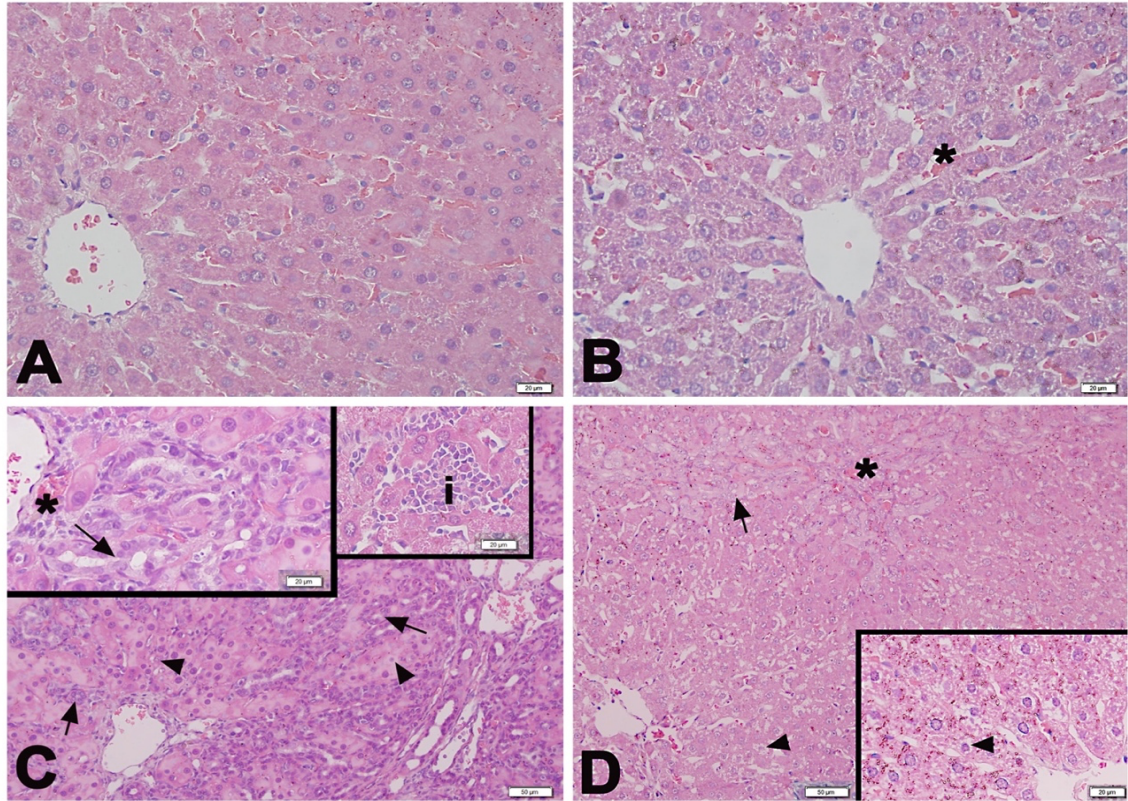


şekil 20. Beyin dokusuna ait TGF- β , 8-OHdG, Na⁺/K⁺-ATPaz ve Hidroksiprolin sonuçları. TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü, 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, Na⁺/K⁺-ATPaz: Sodyum-Potasyum adenozin trifosfataz, K: Kontrol grubu, SKB: Safra kanalı bağlı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA kullanılmıştır. *p<0,05, ***p<0,001; Kontrol grubuna göre, +p<0,05, ++p<0,01; SKB grubuna göre karşılaştırmalar.

6.9. Karaciğer ve Beyin Doku Örneklerinin Histolojik Bulguları:

6.9.1. Karaciğer

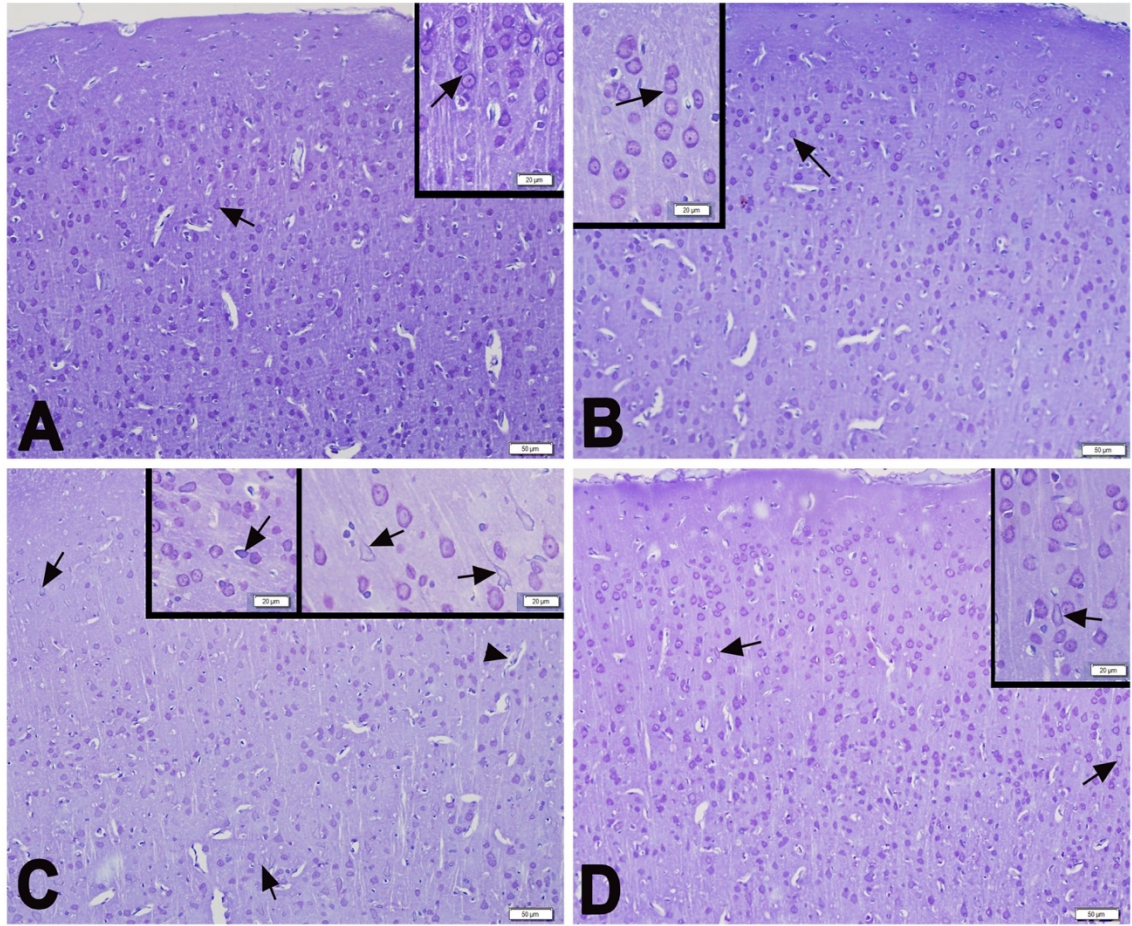
Kontrol grubunun ışık mikroskobu değerlendirilmesinde (Şekil 21A), intakt hepatositler, sinüzoidler ve portal yol ile karaciğer parankiminin düzenli bir morfolojisi gözlemlendi. Kontrol+Küsküt grubunda intakt hepatositler ve portal yol ile karaciğer parankiminin düzenli morfolojisi, hafif sinüzoidal tıkanıklık gözlemlendi (Şekil 21B). SKB grubunda bozulmuş hepatik bağlar, bozulmuş hepatositlerde ciddi artış, inflamatuvar hücre infiltrasyon ve proliferasyonu gözlemlendi (Şekil 21C). SKB+Küsküt grubunda bozulmuş hepatosit sayısında orta derecede azalma, hepatik bağların bozulması, inflamatuvar hücre infiltrasyon ve proliferasyonunda azalma gözlemlendi (Şekil 21D).



Şekil 21. Deney gruplarındaki karaciğer numunelerinin ışık mikrografları. Kontrol grubunda (A) hepatositler, sinüzoidler ve portal yollar ve normal karaciğer parankimleri görülmektedir. Kontrol+Küsküt grubunda (B) hepatositler, portal yollar ve hafif sinüzoidal tıkanıklık (*) ile normal karaciğer parankimi görülmektedir. SKB grubunda (C), karaciğer yollarında düzensizlik, sinüzoidal tıkanıklık (*), bozulmuş hepatosit sayısında artış (ok başı), portal yol içinde hücre proliferasyonu (ok işareti), parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonu (i) görülür. SKB+Küsküt grubunda (D) hafif sinüzoidal tıkanıklık (*), hepatik yolların düzensizliği, bozulmuş hepatositlerde azalma (ok işareti), hücre proliferasyonunda azalma (ok başı) görülür. Hematoksilen ve eozin boyama, Ölçek çubukları: A, B ve C ve D'deki ekler: 20 µm, C ve D: 50 µm

6.9.2. Beyin

Kontrol (Şekil 22A) ve Kontrol+Küsküt (Şekil 22B) gruplarının ışık mikroskobu değerlendirilmesinde, nöronlar ve kılcıl damarlar ile serebral korteksin düzenli bir morfolojisi görüldü. BDL grubunda bozulmuş nöronlarda ciddi artış ve subkapiller ödem gözlemlendi (Şekil 22C). SKB+Küsküt grubunda bozulmuş nöronlarda ve subkapiller ödemde orta derecede azalma gözlemlendi (Şekil 22D).



Şekil 22: Deney gruplarındaki serebral korteks numunelerinin ışık mikrografları. Kontrol (A) ve Kontrol+Küsküt (B) gruplarında nöron (ok işareti) ve kılcıl damarlarla birlikte serebral korteksin düzenli morfolojisi görülmektedir. SKB grubunda (C) bozulmuş nöronlarda (ok işareti) ve subkapiller ödemde (ok başı) ciddi artış görülür. SKB+Küsküt grubunda (D) bozulmuş nöronlarda orta derecede azalma (ok işareti) görülmektedir. Cresyl violet boyama, Ölçek çubukları: 50 µm, iç kısımlar: 20 µm.

7. TARTIŞMA

Karaciğer, safranin oluşumunda, salgılanmasında ve ayrıca toksik maddelerin safra kanalları yoluyla atılmasında önemli bir rol oynayan hayati organdır (Strazzabosco, 1997). Karaciğer fibrozu, ekstrasellüler matriks (ESM) birikimi ile tanımlanan, geri dönüşümlü bir yara iyileştirici yanıt olup karaciğer hasarından sonra gelişir (Hernandez-Gea ve Friedman, 2011). Tedavisinde geç kalındığı takdirde yaşamı tehdit eden, morbidite ve mortalite oranı yüksek olan hiperamonyemi, hepatik ensefalopati ve siroza yol açabilmektedir (Goldbecker ve ark., 2010; Khan ve ark., 2016; Zhangdi ve ark., 2019).

Hepatik ensefalopati, hastalarda; bilişsel, psikiyatrik ve motor bozukluklara neden olan ve sakat bırakan nörolojik bir komplikasyondur (Swaminathan ve ark., 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde HE çok sayıda hastaneye yatışa neden olan hastalıklar arasında sayılmakta ve sağlık sistemi üzerinde muazzam bir yük oluşturmaktadır (Hirode ve ark., 2019; Volk ve ark., 2012). Hepatik ensefalopatili hastalarda önemli bir patojenik faktör hiperamonyemi, yani dolaşımdaki artan amonyak seviyeleridir.(Hu ve ark., 2020). Hiperamonyemi, karaciğer yetmezliğinden ve/veya kan akışının karaciğeri baypas etmesine izin veren porto-sistemik şantların gelişmesi ve karaciğerin detoksifikasyon kapasitesinin azalması sonucu oluşmaktadır (Vilstrup ve ark., 2014). Hepatik ensefalopatili hastalarda bilişsel değişiklikler aslında beyinde artan amonyak konsantrasyonu ile ilgili olup bunu çok sayıda nörotransmitter sistemindeki düzensizliklerin, astrosit şişmesinin ve nihai olarak beyin ödeminin takip etmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (DeMorrow, 2019).

Safra kanalı bağlama tekniği ile kolestaz modelini uygulamadaki amaç karaciğer fibrozunu indüklemektir (Şener ve ark., 2005), bu model - kemirgen hayvanlarda fibroz oluşumu için en sık kullanılan bir yöntemdir (Lee ve ark., 2003; Tag ve ark., 2015). Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisi için tıbbi bitkilerin ve ürünlerin oldukça önemli yerleri vardır (Singh ve ark., 2012). Yapılan detaylı literatür taramasında farklı Küsküt türlerinin antitümör, antimikrobiyal, hepatoprotektif, antikonvülsan, immünostimülatör,

antioksidan, α -glukosidaz inhibitörü, psikofarmakolojik, saç büyümesini teşvik edici, anti-steroidojenik, anti-inflamatuvar, diüretik, analjezik, antipiretik, antidiyabetik, nöroprotektif, antiülser, antispazmodik, hemodinamik, bradikardi, antihipertansif, kardiyotonik ve kas gevşetici gibi etkilere sahip olduğu görülmüştür (Erecevit Sönmez ve ark., 2019;Koca-Caliskan ve ark., 2018b; Noureen ve ark., 2019). Ülkemizde de geleneksel tıpta bazı bitkilerin karaciğer-safra rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu türlerden biri de halk tarafından sarılığın tedavisinde kullanılan Küsküt türleridir (Erecevit Sönmez ve ark., 2019; Koca-Caliskan ve ark., 2018a).

Karaciğer fibroz gelişimini yavaşlatmak veya geri çevirmek için farklı deneysel çalışmalar yapılmıştır; ancak klinik kullanım için etkili bir tedavi bulunmamıştır (Tahan ve ark., 2010). Anti-fibrojenik ajanların kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte geleneksel tıpta kimyasal anti-fibrotik ilaçlar yerine daha az toksik ve yan etkilere neden olan doğal ürünler de kullanılmaktadır. Bu doğal ürünler hala deneysel aşamada olup terapötik girişim olarak sayılmaktadır (Gedik ve ark., 2005). Yaptığımız bu çalışmada, safra kanalı bağlama ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda geleneksel tıpta karaciğer koruyucu olarak kullanılan küsküt otu (*Cuscuta* sp.) ekstresinin karaciğer hasarı üzerindeki olası koruyucu ve önleyici etkilerini incelemeyi amaçladık.

Morris su labirent testi, uzamsal veya yer öğrenimini değerlendirmek için bir yöntem olarak tasarlanmıştır (Vorhees ve Williams, 2016). Yapılan SKB çalışmalarına ait Morris su labirent test bulgularına göre hayvanların bilişsel fonksiyonlarında gerileme bildirilmiştir (Baghbaderani ve ark., 2020; Giménez-Garzó ve ark., 2015). Skopolamin ile yapılan bir çalışmaya göre, küsküt otu skopolamin ile indüklenmiş hafıza hasarı bulgu parametrelerini geri çevirmiş yani iyileştirmiştir (Lin ve ark., 2018). Bu bilgilere paralel olarak çalışmamızda da Morris su labirent test gününde elde ettiğimiz bulgulara göre; SKB grubundaki hayvanların kontrol grubuna göre hafıza performanslarında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiş olup küsküt otu ekstresi uygulanan tedavi grubunun performansı ve hedef kadranda geçirdikleri süre SKB grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Yeni obje tanıma testi, öğrenme ve hafıza fonksiyonları altında yatan mekanizmaları incelemek ve

hafıza üzerinde oluşturulan modelin ve kullanılan ilacın etkilerini gözlemlemek amacıyla deneysel bir yöntem olarak kullanılmaktadır (de Bruin ve Pouzet, 2006). Yapılmış çalışmalara göre, safra kanalı bağlama tekniği ile oluşturulan kolestaz modeline ait hayvan grubunun yeni obje tanıma test bulguları ile kıyaslandığında SKB grubuna ait sonuçlar çalışmamızdaki SKB grubunun bulguları ile pozitif korelasyon göstermiştir (Cho ve ark., 2020; Bowen ve ark., 2022). Bu testte, kolestazın neden olduğu düşünülen, beyin hasarı ve muhtemelen amonyak aracılığı ile hayvanlar yeni obje tanıma testinde başarısızlık göstermiş ve fark skor bulguları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Buna karşılık tedavili grupta ise anlamlı olarak hafıza performans iyileşmesi gözlemlenmiş ve bu fark skoru SKB grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Sıkı bağlantı hücreleri, birbirine bağlanan özelleşmiş endotelial hücrelerden oluşan kan beyin bariyeri (KBB), dolaşım ve merkezi sinir sistemleri arasındaki maddelerin geçişini kısıtlar (Çevikelli Yakut ve ark., 2019). Karaciğer fibrozuna bağlı gelişen hiperamonyemik HE'li sıçanlarda bozulmuş KBB'nin varlığı gösterilmiştir (Goldbecker ve ark., 2010). Karaciğer hasarı olan sıçanların dolaşımında artış gösteren amonyak seviyeleri KBB'nin bütünlüğünü bozmaktadır ve nihai olarak HE'ye neden olabilmektedir (Butterworth, 2003; Lockwood ve ark., 1980). Literatürde, küsküt otu veya bu ota benzer, SKB'ye bağlı gelişen karaciğer hasarının neden olduğu ve HE üzerinde tedavi edici özellik gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın evans blue ile yapılan fizyolojik KBB ölçüm bulgularına baktığımızda, küsküt otu ekstresi ile yapılan tedavinin, hepatoprotektif, antioksidan, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkileri nedeniyle KBB'nin bozulmasını önlediği düşünülmektedir.

Kan alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri, hem klinik hem de klinik olmayan çalışmalarda olası doku hasarının, özellikle karaciğer toksisitesinin hassas belirteçleri olarak iyi bilinmektedir (Ramaiah, 2007). Alanin aminotransferaz ve AST, glukoneogenezde yer alan aminotransferazlar olarak bilinir (Kobayashi ve ark., 2011; Qian ve ark., 2015). Aspartat aminotransferaz, hepatositlerin hem sitozol hem de mitokondrilerinde bulunurken, ALT sadece sitozolde bulunmaktadır

(Horio ve ark., 1988; Jadaho ve ark., 2004; Tomkiewicz ve ark., 2004; Yang ve ark., 2009). Bu enzimler hepatositlerin hasarı sonucu kan içine sızılmaktadırlar (Raval ve ark., 2019). İlaç kullanımı, toksinler, virüsler, iskemi, otoimmün karaciğer hasarı gibi metabolik etkenler karaciğer parankimini etkileyerek AST ve ALT değerlerini yükseltebilir (Limdi ve Hyde, 2003). Kolestaza bağlı gelişen karaciğer hastalığının önemli bir göstergesi olan bilirubin, hemoglobinin son yıkım ürünüdür; serumda direkt ve indirekt olarak bulunmaktadır (Jo ve ark., 2011). Yapılan bilimsel çalışmalara göre direkt bilirubin düzeyi safra yolu tıkanıklıklarından dolayı artış göstermektedir ayrıca safra kanalı bağlanmış grubun ALT, AST ve bilirubin seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Lim ve ark., 2013; Şener ve ark., 2006; Yada ve ark., 2016). Aynı şekilde çalışmamızda da SKB grubuna ait ALT, AST ve bilirubin seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Küsküt otu ekstresinin sıçanlarda oluşturulan hepatotoksisite üzerinde iyileştirici etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmaya göre; küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanan grupta ALT, AST ve bilirubin seviyelerinin, model oluşturulan gruba göre düştüğü gözlemlenmiştir (Koca-Caliskan ve ark., 2018b). Çalışmamızda da aynı şekilde, SKB grubuna ait ALT, AST ve bilirubin seviyeleri kontrol grubu seviyelerine göre yüksek iken; küsküt otu ekstresi ile tedavi edilen grupta bu seviyeler SKB grubuna göre düştüğü gözlemlenmiştir. Bu bulgularımızda literatüre uygunluk göstermiştir.

Sodyum/potasyum adenozin trifosfataz enzimi, tüm hücre membranlarında sodyum ve potasyum dengesini sağlayarak karaciğer hücrelerin yapısında ve fizyolojisinde görev alır (Atalay ve ark., 2018). Yapılan çalışmalara göre, SKB'nin karaciğer dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Muriel, 1995; Muriel ve ark., 1994). Çalışmamızda da SKB grubunun karaciğer dokularına ait incelenen Na^+/K^+ -ATPaz seviyeleri, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Yapılan bir çalışmaya göre küsküt otu ekstresi kullanılarak, renal iskemi/reperfüzyon sonucu böbrek dokularında meydana gelen Na^+/K^+ -ATPaz enzim sentezindeki düşüş iyileştirilmiştir (Shin ve ark., 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz karaciğer doku bulguları benzer sonuçlar göstermiştir — Model grupta Na^+/K^+ -ATPaz seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü

gözlemlenirken küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanmış grupta Na^+/K^+ -ATPaz seviyesinin model gruba göre yükseldiği gözlemlenmiştir.

Karaciğer yetmezliği sırasında oluşan hepatik ensefalopati, multifaktöriyel bir etiyolojiye sahip olup yaşamı tehdit eden ciddi bir komplikasyondur. Bunun yanında Na^+/K^+ -ATPaz enzimi gibi proteinlerin beyin ödeminde ozmotik rolü vardır, sözü geçen bu enzimin varlığı beyindeki iyon dengesi için önemlidir ve burada oluşacak belirgin bir hasar astrositik şişmeye neden olmaktadır (Hertz ve ark., 2015). Toklu ve ark.'larının yaptığı bir çalışmaya göre küsküt otu gibi bir antioksidan olan çörek otu yağının SKB'ye bağlı gelişen sarılığın ve bunu takiben ortaya çıkan HE'ye karşı olası koruyucu etkisi, oksidatif stresi azalttığı, beyin dokusunu oksidatif stresten koruduğu ve HE'yi iyileştirdiği gösterilmiştir. Çalışmaya göre HE'nin oluşum sebebi beyinde Na^+/K^+ -ATPaz enzimin sentezindeki ve aktivitesindeki düşüş olmuştur. Bu enzim aktivitesindeki düşüş iyon dengesini bozduğundan beyin ödeminde sebep olmuştur (Toklu ve ark., 2013). Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Safra kanalı bağlı grubun beyin dokularına ait Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivite bulguları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüş gözlemlenirken, küsküt otu bitkisi ile tedavi uygulanmış grupta Na^+/K^+ -ATPaz seviyeleri model gruba göre artış göstermiştir.

Eksojen serbest radikaller gibi endojen serbest radikaller de, çeşitli yollarla organizmalarda DNA hasarına neden olabilir (Shin ve ark., 2011) ve santral dogma sürecinde aksamalar meydana getirebilir. En çok kullanılan oksidatif hasar belirteci 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) aynı zamanda bir DNA oksidasyon belirtecidir (Atmaca ve Aksoy, 2009; Li ve ark., 2016). Safra kanalı bağlanan hayvanların karaciğer dokusuna ait 8-OHdG seviyelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu çalışmalar mevcuttur (Huang ve ark., 2003; Maeda ve ark., 2008; Matono ve ark., 2010). Bu bilgilere paralel olarak çalışmamızda da SKB grubunun karaciğer dokularına ait 8-OHdG seviyeleri, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Yapılan bilimsel bir çalışmaya göre antioksidan etkili ve küsküt otu gibi anti-karsinojen etkili tıbbi bir bitki olan *Ganoderma lucidum* SKB'ye bağlı karaciğer dokularında meydana gelen

yüksek 8-OHdG enzim seviyelerini iyileştirmiştir (Aydın ve ark., 2010). Aynı şekilde çalışmamızda SKB grubu 8-OHdG seviyelerinde anlamlı bir artış görülmüş ve antioksidan etkili küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanan sıçanlarda ise ilgili hasar belirteci seviyesinde model gruba göre anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir.

Çin'de yapılan bir araştırmaya göre antioksidan özellikli tıbbi bitkilerin karışımından yapılan bir formül kullanılarak beyinde artan 8-OHdG enzim seviyelerini düşürmüş ve ayrıca bilişsel performansı arttırmıştır (Qiong ve ark., 2016). Çalışmamızda ise SKB'ye bağlı meydana gelen beyin dokusunda 8-OHdG seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiş ve küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanan sıçanlarda ise 8-OHdG seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir.

Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), karaciğerin fizyolojik ve patolojik değişimlerinde, ayrıca karaciğer hasarı, iltihabı ve fibrozunda önemli rolü olan bir düzenleyicidir (Fabregat ve ark., 2016). Yapılan çalışmalara göre; TGF- β seviyesi, SKB grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Asakawa ve ark., 2012; Du ve ark., 2012; Sharawy ve ark., 2018). Bu bilgilere paralel olarak çalışmamızda da SKB grubu karaciğer dokularına ait TGF- β seviyeleri, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Küsküt otu ekstresinin uygulanması karaciğer hasarı üzerinde olası tedavi edici etkilerini inceleyen bir çalışmaya göre hepatoprotektif bir ajan olduğu bildirilmiş ve TGF- β düzeylerindeki geri döndürmüştür (Ali ve ark., 2018). Yaptığımız çalışmada da TGF- β seviyesi SKB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca küsküt otu ekstresi ile tedavi edilen grupta ise TGF- β seviyesinde düşüş görülmüştür.

Fare karaciğerinde TGF- β 1 sitokininin çalışıldığı bilimsel bir çalışmaya göre, karaciğer yetmezliğinden dolayı dolaşımdaki artmış TGF- β 1, HE'nin oluşumunda etkili olmuştur. Çalışmaya göre karaciğer yetmezliğinden dolayı, karaciğerdeki TGF- β 1 ekspresyonunun arttığını, dolayısı ile dolaşımdaki artan TGF- β 1' in HE ile ilişkili nöroinflamasyona ve nörolojik bozukluklara neden olduğu düşünülmektedir (McMillin ve ark., 2019). Buradan

anlaşılacağı üzere bir hepatoprotektif olan küsküt otunun hepatik ensefalopati üzerinde de iyileştirici etkisi olduğu düşünülebilir (Saleem ve Naseer, 2014). Ayrıca başka bir çalışmaya göre küsküt otu, anti-fibrotik etkisine bağlı olarak, tiyoasetamid ile indüklenmiş karaciğer yetmezliğinde TGF- β 1 sitokininin artışını baskılamış ve hepatik fibrozisi iyileştirdiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2017). Bu bilgilere paralel olarak SKB grubunun beyin dokularına ait TGF- β seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı artmış ve küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanan sıçanlarda ise ilgili hasar belirteç seviyesi anlamlı anlamlı olarak düşmüştür.

Aktif hepatik stellat hücreleri, miyoblastlara dönüşerek ve hidroksprolin seviyelerini arttırarak kollajen proteinin üretilmesine neden olur ve karaciğerin çalışmasını engelleyen bu kollajen lifleri karaciğer fibrozuna neden olur (Mu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019). Sonuç olarak, hidroksprolin karaciğer hasarının derecesini değerlendirmek için bir belirteç olarak kullanılır. Safra kanalı bağlı sıçan modelinde karaciğer fibrozu üzerinde yapılan çalışmalara göre SKB grubu hidroksprolin seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Lee ve ark., 2007; Nan ve ark., 2010; Tian ve ark., 2017). Küsküt otu ve tiyoasetamid ile indüklenmiş karaciğer rahatsızlığı üzerinde yapılan bir çalışmaya göre küsküt otu karaciğer dokusunda artmış hidroksprolin seviyelerini düşürmüştür (Kim ve ark., 2017). Yaptığımız çalışmada da model grubun karaciğer dokularına ait hidroksprolin seviyeleri kontrol grubununkine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, küsküt otu ekstresi ile tedavi edilen grubun hidroksprolin seviyeleri, model grubununkine göre anlamlı bir düşüş göstermiştir.

Literatürde SKB modeli ile oluşturulan karaciğer hasarı ve buna bağlı gelişen beyin ödemi/hepatik ensefalopatisine ait beyin dokusundaki hidroksprolin seviyelerini çalışan ve ayrıca küsküt otu ekstresi ya da başka küsküt otuna benzer, SKB'ye bağlı beyinde meydana gelen hidroksprolin seviyelerindeki artışı engelleyen veya tersine çeviren tedavi edici bilimsel bir yayın bulunmadığından, bulgularımız referans olarak gösterilebilir. Çalışmamızda model grubun beyin dokularına ait hidroksprolin seviyeleri kontrol

grubuna göre anlamlı bir artış ve küsküt otu ekstresi ile tedavi uygulanan sıçanlarda ise hidrokspirolin seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir.

Yaptığımız histolojik çalışmalara göre Koca-Caliskan ve ark.'ların yaptığı çalışmanın sonucu ile benzerlik göstermiş olup SKB grubunun karaciğer dokusunda belirgin bir hasar gözlemlenmiş olup küsküt otu ile tedavi edilen SKB grubu karaciğer dokusunda bu hasar iyileşme göstermiştir (Koca-Caliskan ve ark., 2018b).

Cuscuta reflexa türünden elde edilen metanol ekstresinin DPPH radikaline karşı 359.48 µg/ml'lik İK₅₀ değeriyle antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Patil ve ark., 2009). Şu anki çalışmamızda *Cuscuta* türü 125.5 µg/ml'lik İK₅₀ değeriyle DPPH radikaline karşı daha iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Aynı zamanda ekstrenin ABTS radikaline ve 5-lipoksijenaz enzimine karşı da iyi bir antioksidan ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Jafari ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada *Cuscuta campestris*, *C. monogyna* ve *C. approximate* türlerinin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları araştırılmış ve bu türlerin sırasıyla 36.96, 49.59 ve 56.67 mg/g olduğu bulunmuştur. Bu çalışmamızda ise küsküt otunun total fenolik bileşik miktarı (38.58 mg/g) *Cuscuta campestris* türünden daha yüksek diğerlerinden ise daha düşük bulunmuştur.

Yapılan çalışmanın bulgularına baktığımızda küsküt otu safra kanalı bağlama tekniği ile oluşturulan karaciğer fibrozu ve buna bağlı gelişen beyin hasarına karşı olası koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Küsküt otu ekstresinin bu koruyucu etkisi, antioksidan, anti-inflamatuvar ve hepatoprotektif etkileriyle açıklanabilir. Bu nedenle küsküt otu ileride klinik çalışmalarla desteklenmesiyle karaciğer fibrozu ve hepatik ensefalopati tedavisinde umut verici bir rolünün olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu çalışma, *Cuscuta* türünün halk tarafından karaciğer hastalıklarına karşı etnobotanik kullanımını bilimsel olarak doğrulamıştır. Bu nedenle küsküt otu ileride klinik çalışmalarla desteklenmesiyle karaciğer fibrozu ve hepatik ensefalopati tedavisinde umut verici bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abdel-Aal RA, Abdel Azim AA, Botros BK. Rivastigmine Reverses Aluminum-Induced Behavioral Changes in Rats. *European Journal of Pharmacology*. 2011;659:169–76.

Abo El Gheit RE, Atef MM, Badawi GA, Elwan WM, Alshenawy HA, Emam MN. Role of Serine Protease Inhibitor, Ulinastatin, in Rat Model of Hepatic Encephalopathy: Aquaporin 4 Molecular Targeting and Therapeutic Implication. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2020.

Agarwal AN, Mais DD. Sensitivity and Specificity of Alzheimer Type II Astrocytes in Hepatic Encephalopathy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2019;143:1256–58.

Agusti A, Hernández-Rabaza V, Balzano T, Taoro-Gonzalez L, Ibañez-Grau A, Cabrera-Pastor A, Fustero S, Llansola M, Montoliu C, Felipo V. Sildenafil Reduces Neuroinflammation in Cerebellum, Restores GABAergic Tone, and Improves Motor in-Coordination in Rats with Hepatic Encephalopathy. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2017;23:386–94.

Ahboucha S, Gamrani H, Baker G. GABAergic Neurosteroids: The ‘Endogenous Benzodiazepines’ of Acute Liver Failure. *Neurochemistry International*. 2012;60:707–14.

Ahmad A, Tandon S, Xuan TD, Nooreen Z. A Review on Phytoconstituents and Biological Activities of *Cuscuta* Species. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017;92:772–95.

Ali M, Khan T, Fatima K, Qua A, Ovais M, Khalil AT, Ullah I, Raza A, Shinwari ZK, Idrees M. Selected Hepatoprotective Herbal Medicines: Evidence from Ethnomedicinal Applications, Animal Models, and Possible Mechanism of Actions. *Phytotherapy*

Research. 2018;32:199–215.

Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile Duct Ligation: Step-by-Step to Cholangiocyte Inflammatory Tumorigenesis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;22:651–61.

Altenhöfer S, Kleikers PWM, Radermacher KA, Scheurer P, Hermans JJR, Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt HHHW. The NOX Toolbox: Validating the Role of NADPH Oxidases in Physiology and Disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012;69:2327–43.

Anthony JE. Ammonia, the GABA Neurotransmitter System, and Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2002;17:275–81.

Arriazu E, De Galarreta MR, Cubero FJ, Varela-Rey M, De Obanos MPP, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N. Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014;21:1078–97.

Asakawa T, Yagi M, Tanaka Y, Asagiri K, Kobayashi H, Egami H, Tanikawa K, Kage M. The Herbal Medicine Inchinko-to Reduces Hepatic Fibrosis in Cholestatic Rats. *Pediatric Surgery International*. 2012;28:379–84.

Aspinall RJ, Weis SM, Barnes L, Lutu-Fuga K, Bylund DJ, Pockros PJ, Cheresch DA. A Src Family Kinase Inhibitor Improves Survival in Experimental Acute Liver Failure Associated with Elevated Cerebral and Circulating Vascular Endothelial Growth Factor Levels. *Liver International*. 2011;31:1222–30.

Atalay S, Soylu B, Aykaç A, Oğünç AV, Çetinel Ş, Ozkan N, Erzik C, Şehirli AÖ. Protective Effects of St. John's Wort in the Hepatic Ischemia/ Reperfusion Injury in Rats. *Turkish Journal of Surgery*. 2018;34:198–204.

Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. 2009;20:79–83.

Aydin S, Aytac E, Uzun H, Altug T, Mansur B, Saygili S, Buyukpinarbasili N, Sariyar M. Effects of *Ganoderma Lucidum* on Obstructive Jaundice-Induced Oxidative Stress. Asian Journal of Surgery. 2010;33:173–80.

Baby J, Jini D. Insight into the Hypoglycaemic Effect of Traditional Indian Herbs Used in the Treatment of Diabetes. Research Journal of Medicinal Plant. 2011;5:352–76.

Baghbaderani S, Hashemi M, Ebrahimi-Ghiri M, Zarrindast MR, Nasehi M, Entezari M. Curcumin Prevents Cognitive Deficits in the Bile Duct Ligated Rats. Psychopharmacology. 2020;237:3529–37.

Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF. Loss of Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Acute Hyperammonemia. Neurochemistry International. 2002;41:155–60.

Bémeur C, Cudalbu C, Dam G, Thrane AS, Cooper AJL, Rose CF. Brain Edema: A Valid Endpoint for Measuring Hepatic Encephalopathy? Metabolic Brain Disease. 2016;31:1249–58.

Bender AS, Norenberg MD. Effects of Ammonia on L-Glutamate Uptake in Cultured Astrocytes. Neurochemical Research. 1996;21:567–73.

Bevins RA, Besheer J. Object Recognition in Rats and Mice: A One-Trial Non-Matching-to-Sample Learning Task to Study ‘Recognition Memory. Nature Protocols. 2006;1:1306–11.

Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P. Interleukin-

1 β -Induced Changes in Blood-Brain Barrier Permeability, Apparent Diffusion Coefficient, and Cerebral Blood Volume in the Rat Brain: A Magnetic Resonance Study. *Journal of Neuroscience*. 2000;20:8153–59.

Blei AT, Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K. Hepatic Encephalopathy - Definition, Nomenclature, Diagnosis, and Quantification: Final Report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 2002;35:716–21.

Bleibel W, Al-Osaimi AMS. Hepatic Encephalopathy. *Saudi Journal of Gastroenterology*. 2012;18:301–9.

Bobermin LD, Quincozes-Santos A, Guerra MC, Leite MC, Souza DO, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLoS ONE*. 2012;7:1–12.

Bodega G, Suárez I, Almonacid L, Ciordia S, Beloso A, López-Fernández LA, Zaballos A, Fernández B. Effect of Ammonia on Ciliary Neurotrophic Factor mRNA and Protein Expression and Its Upstream Signalling Pathway in Cultured Rat Astroglial Cells: Possible Implication of c-Fos, Sp1 and P38MAPK. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007;33:420–30.

Bosoi CR, Parent-Robitaille C, Anderson K, Tremblay M, Rose CF. AST-120 (Spherical Carbon Adsorbent) Lowers Ammonia Levels and Attenuates Brain Edema in Bile Duct-Ligated Rats. *Hepatology*. 2011;53:1995–2002.

Bosoi CR, Rose CF. Brain Edema in Acute Liver Failure and Chronic Liver Disease: Similarities and Differences. *Neurochemistry International*. 2013a;62:446–57.

Bosoi CR, Rose CF. Oxidative Stress: A Systemic Factor Implicated in the Pathogenesis

of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2013b;28:175–78.

Bosoi CR, Rose CF. Elevated Cerebral Lactate: Implications in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2014;29:919–25.

Bosoi CR, Zwingmann C, Marin H, Parent-Robitaille C, Huynh J, Tremblay M, Rose CF. Increased Brain Lactate Is Central to the Development of Brain Edema in Rats with Chronic Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2014;60:554–60.

Bron B, Waldram R, Silk DBA, Williams R. Serum, Cerebrospinal Fluid, and Brain Levels of Bile Acids in Patients with Fulminant Hepatic Failure. *Gut*. 1977;18:692–96.

Brown GC, Borutaite V. There Is No Evidence That Mitochondria Are the Main Source of Reactive Oxygen Species in Mammalian Cells. *Mitochondrion*. 2012;12:1–4.

Butterworth RF. Images of the Brain in Chronic Liver Failure. *Journal of Hepatology*. 2001;35:598–604.

Butterworth RF. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: New Insights from Neuroimaging and Molecular Studies. *Journal of Hepatology*. 2003;39:278–85.

Butterworth RF. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs*. 2019;79:17–21.

Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental Models of Hepatic Encephalopathy: ISHEN Guidelines. *Liver International*. 2009; 29(6):783–88.

Cai SY, Boyer JL. The Role of Inflammation in the Mechanisms of Bile Acid-Induced Liver Damage. *Dig Dis*. 2017;35:232–34.

Cali C, Tauffenberger A, Magistretti P. The Strategic Location of Glycogen and Lactate: From Body Energy Reserve to Brain Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:1–7.

Casas-Grajales S, Muriel P. The Liver, Oxidative Stress, and Antioxidants. Elsevier Inc. 2017;583-604.

Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, Mlili NE, Boix J, Agustí A, Felipe V. Glutamatergic and Gabaergic Neurotransmission and Neuronal Circuits in Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2009;24:69–80.

Cederbaum AI. Cytochrome P450 and Oxidative Stress in the Liver. Elsevier Inc. 2017;401-419.

Cesetti T, Ciccolini F, Yuting L. GABA Not Only a Neurotransmitter: Osmotic Regulation by GABA AR Signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2012; 6:1–14.

Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Ammonia and Proinflammatory Cytokines Modify Expression of Genes Coding for Astrocytic Proteins Implicated in Brain Edema in Acute Liver Failure. *Metabolic Brain Disease*. 2010;25:17–21.

Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling in Liver Disease and Therapy. *Liver Res*. 2017;1:3–9.

Cho I, Koo BN, Kam EH, Lee SK, Oh H, Kim SY. Bile duct ligation of C57BL/6 mice as a model of hepatic encephalopathy. *Anesth Pain Med (Seoul)*. 2020;15:19-27.

Choudhury S, Borah A. Activation of NMDA Receptor by Elevated Homocysteine in Chronic Liver Disease Contributes to Encephalopathy. *Medical Hypotheses*. 2015;85:64–67.

Chung C, Gottstein J, Blei AT. Indomethacin Prevents the Development of Experimental Ammonia-Induced Brain Edema in Rats after Portacaval Anastomosis. *Hepatology*. 2001;34:249–54.

Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative Stress as a Crucial Factor in Liver Diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:8082–91.

Cordoba J. Hepatic Encephalopathy: From the Pathogenesis to the New Treatments. *ISRN Hepatology*. 2014;2014:1–16.

Crosas-Molist E, Fabregat I. Role of NADPH Oxidases in the Redox Biology of Liver Fibrosis. *Redox Biology*. 2015;6:106–11.

Cudalbu C, Taylor-Robinson SD. Brain Edema in Chronic Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019;9:362–82.

Czarnecka AM, Milewski K, Albrecht J, Zielińska M. The Status of Bile Acids and Farnesoid x Receptor in Brain and Liver of Rats with Thioacetamide-Induced Acute Liver Failure. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:1–12.

Çevikelli Yakut ZA, Ertaş B, Koyuncuoğlu T, Yeğen B, Şener G. Nicorandil Preserves Blood-Brain Barrier and Improves Memory Impairment in Hypertensive Rats. *Journal of Research in Pharmacy*. 2019;23:1140–48.

Damink SWMO, Jalan R, Dejong CHC. Interorgan Ammonia Trafficking in Liver Disease. *Metabolic Brain Disease*. 2009;24:169–81.

De Bruin N, Pouzet B. Beneficial Effects of Galantamine on Performance in the Object Recognition Task in Swiss Mice: Deficits Induced by Scopolamine and by Prolonging the Retention Interval. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2006;85:253–60.

DeLoach CJ, Lewis PA. Domestication of Plants in the Old World - The Origin and Spread of Domesticated Plants in South-West Asia, Europe, and the Mediterranean Basin Book. 2004;121-142.

DeMorrow S. Bile Acids in Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019;9:117–24.

DeMorrow S, Liere V, Sandhu G. Recent Advances in Hepatic Encephalopathy. 2017;6:1–14.

Díaz-Gómez D, Jover M, Del-Campo JA, Galindo A, Romero-Gómez M. Experimental Models for Hepatic Encephalopathy. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2011;103:536–41.

Dominic AR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5:7–20.

Du JX, Yu Sun M, Du GL, Li FH, Liu C, Mu YP, Chen GF, Long AH, Bian YQ, Liu J, Liu CH, Hu YY, Xu LM, Liu P. Ingredients of Huangqi Decoction Slow Biliary Fibrosis Progression by Inhibiting the Activation of the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12:1–11.

Jafari E, Bahmanzadegan A, Ghanbarian G, Rowshan V. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content from Aerial Parts of Three *Cuscuta* Species. *Analytical Chemistry Letters*. 2015;5:377-384,

Erecevit Sönmez P, Kirbağ PS, İnci Ş. Antifungal and Antibacterial Effect of Dodder (*Cuscuta Campestris*) Used for Hepatitis Treatment of Mothers and Newborn Infants in Province Mardin in Turkey. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*.

2019;29:722–30.

Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, ten Dijke P. TGF- β Signalling and Liver Disease. *FEBS Journal*. 2016;283:2219–32.

Felipo V. Hepatic Encephalopathy: Effects of Liver Failure on Brain Function. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14:851–58.

Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of Ammonia. *Progress in Neurobiology*. 2002;67:259–79.

Ferenci P. Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology Report*. 2017;5:138–47.

Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The Role of Cytokines in the Neuropathology of Stroke and Neurotrauma. *NeuroImmunoModulation*. 1998;5:143–59.

Fix OK. Acute Liver Failure: Peritransplant Management and Outcomes. *Clinical Liver Disease*. 2013;2:165–68.

Giuseppe E, Nobile N, Gigli S, Seguella L, Pesce M, d'Alessandro A, Bruzzese E, Capoccia E, Steardo L, Cuomo R, Sarnelli G. Rifaximin Improves Clostridium Difficile Toxin A-Induced Toxicity in Caco-2 Cells by the PXR-Dependent TLR4/MyD88/NF-KB Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;7:1–8.

Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Björk L, Trajkovski V. Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) during Maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48:1485–90.

Gedik N, Kabasakal L, Şehirli Ö, Ercan F, Sirvanci S, Keyer-Uysal M, Şener G. Long-

Term Administration of Aqueous Garlic Extract (AGE) Alleviates Liver Fibrosis and Oxidative Damage Induced by Biliary Obstruction in Rats. *Life Sciences* 2005;76:2593–2606.

Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of Three Research Models of Portal Hypertension in Mice: Macroscopic, Histological and Portal Pressure Evaluation. *International Journal of Experimental Pathology*. 2008;89:251–63.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. 2010;107:1058–70.

Giménez-Garzó C, Salhi D, Urios A, Ruíz-Sauri A, Carda C, Montoliu C, Felipo V. Rats with Mild Bile Duct Ligation Show Hepatic Encephalopathy with Cognitive and Motor Impairment in the Absence of Cirrhosis: Effects of Alcohol Ingestion. *Neurochemical Research*. 2015;40:230–40.

Goldbecker A, Buchert R, Berding G, Bokemeyer M, Lichtinghagen R, Wilke F, Ahl B, Weissenborn K. Blood-Brain Barrier Permeability for Ammonia in Patients with Different Grades of Liver Fibrosis Is Not Different from Healthy Controls. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30:1384–93.

Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. Gene Expression Profiling in the Cerebral Cortex of Patients with Cirrhosis with and without Hepatic Encephalopathy. *Hepatology*. 2013;57:2436–47.

Görg B, Qvarckhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. Oxidative Stress Markers in the Brain of Patients with Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. *Hepatology*. 2010;52:256–65.

Guengerich FP. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in*

Toxicology. 2008;21:70–83.

Hakvoort TBM, He Y, Kulik W, Vermeulen JLM, Duijst S, Ruijter JM, Runge JH, Deutz NEP, Koehler SE, Lamers WH. Pivotal Role of Glutamine Synthetase in Ammonia Detoxification. *Hepatology*. 2017;65:281–93.

Hawkins RD. NO Honey , I Don't Remember. *Minireview*. 1996;16:465–67.

Hazell AS, Butterworth RF. Hepatic Encephalopathy: An Update of Pathophysiologic Mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999;222:99–112.

Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Munoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V. Chronic Hyperammonemia Impairs the Glutamate-Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway in Cerebellar Neurons in Culture and in the Rat *in Vivo*. *European Journal of Neuroscience*. 1998;10:3201–9.

Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:425–56.

Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, Gonzalez-Usano A, Agusti A, Balzano T, Llansola M, Felipo V. Neuroinflammation Increases GABAergic Tone and Impairs Cognitive and Motor Function in Hyperammonemia by Increasing GAT-3 Membrane Expression. Reversal by Sulforaphane by Promoting M2 Polarization of Microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13:1–13.

Hernández-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-González L, Malaguarnera M, Agustí A, Llansola M, Felipo V. Hyperammonemia Induces Glial Activation, Neuroinflammation and Alters Neurotransmitter Receptors in Hippocampus, Impairing Spatial Learning: Reversal by Sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13:1–11.

Hertz L, Peng L, Song D. Ammonia, Like K⁺, Stimulates the Na⁺, K⁺, 2 Cl⁻

Cotransporter NKCC1 and the Na⁺,K⁺-ATPase and Interacts with Endogenous Ouabain in Astrocytes. *Neurochemical Research*. 2015;40:241–57.

Hines RM, Davies PA, Moss SJ, Maguire J. Functional Regulation of GABA_A Receptors in Nervous System Pathologies. *Bone*. 2012;22:1–12.

Hirode G, Vittinghoff, E, Wong RJ. Increasing Burden of Hepatic Encephalopathy Among Hospitalized Adults: An Analysis of the 2010–2014 National Inpatient Sample. *Digestive Diseases and Sciences*. 2019.

Horio Y, Tanaka T, Taketoshi M, Uno T, Wada H. Rat Cytosolic Aspartate Aminotransferase: Regulation of Its mRNA and Contribution to Gluconeogenesis. *Journal of Biochemistry*. 1988;103:805–8.

Hu C, Huang K, Zhao L, Zhang F, Wu Z, Li L. Serum Ammonia Is a Strong Prognostic Factor for Patients with Acute-on-Chronic Liver Failure. *Scientific Reports*. 2020;10:1–13.

Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-Stress-Related Changes in the Livers of Bile-Duct-Ligated Rats. *Journal of Biomedical Science*. 2003;10:170–78.

Jadaho SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, Gong DW. Murine Alanine Aminotransferase: cDNA Cloning, Functional Expression, and Differential Gene Regulation in Mouse Fatty Liver. *Hepatology*. 2004;39:1297–1302.

Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury: Adhesion Molecules and Cytotoxicity of Neutrophils. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1996;139:213–26.

Jain L, Sharma BC, Srivastava S, Puri SK, Sharma P, Sarin S. Serum Endotoxin,

Inflammatory Mediators, and Magnetic Resonance Spectroscopy before and after Treatment in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28:1187–93.

Jakaria Md, Park SY, Ezazul Haque MD, Karthivashan G, Kim IS, Ganesan P, Choi DK. Neurotoxic Agent-Induced Injury in Neurodegenerative Disease Model: Focus on Involvement of Glutamate Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;11:1–20.

Jan A, Anthony JE. Hepatic Encephalopathy: Molecular Mechanisms Underlying the Clinical Syndrome. *Journal of the Neurological Sciences*. 1999;170:138–46.

Jan A, Norenberg MD. Glutamine: A Trojan Horse in Ammonia Neurotoxicity. *Hepatology*. 2006;44:788–94.

Jayakumar AR, Bethea JR, Tong XY, Gomez J, Norenberg MD. NF-KB in The Mechanism of Brain Edema in Acute Liver Failure: Studies in Transgenic Mice. *Neurobiol Dis*. 2011;41:498–507.

Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B, Reddy PVB, Norenberg MD. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283:33874–82.

Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy CRK, Norenberg MD. Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Mediate Ammonia-Induced Cell Swelling and Glutamate Uptake Inhibition in Cultured Astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 2006;26:4774–84.

Jayakumar AR, Rama Rao KVS, Tong X, Norenberg MD. Calcium in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling *A.R.J Neurochem*. 2009;109:252–57.

Jayakumar AR, Tong XY, Ospel J, Norenberg MD. Role of Cerebral Endothelial Cells in

the Astrocyte Swelling and Brain Edema Associated with Acute Hepatic Encephalopathy. *Neuroscience*. 2012;218:305–16.

Jayakumar AR, Valdes V, Tong XY, Shamaladevi N, Gonzalez W, Norenberg MD. Sulfonylurea Receptor 1 Contributes to the Astrocyte Swelling and Brain Edema in Acute Liver Failure. *Translational Stroke Research*. 2014;5:28–37.

Jayakumar AR, Valdes V, Norenberg MD. The Na-K-Cl Cotransporter in the Brain Edema of Acute Liver Failure. *Journal of Hepatology*. 2011;54:272–78.

Jayakumar AR, Rama Rao KVS, Norenberg MD. Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5:21–28.

Jerca L, Jerca O, Mancaş G, Constantinescu I, Lupuşoru R. Mechanism of Action and Biochemical Effects of Nitric Oxide. *The Journal of Preventive Medicine*. 2002;10:35–45.

Jha SK. Cerebral Edema and Its Management. *Medical Journal Armed Forces India*. 2003;59(4):326–31.

Jia W, Liu J, Hu R, Hu A, Tang W, Li L, Li J. Xiaochaihutang Improves the Cortical Astrocyte Edema in Thioacetamide-Induced Rat Acute Hepatic Encephalopathy by Activating NRF2 Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:1–10.

Jo J, Yun JE, Lee H, Kimm H, Jee SH. Total, Direct, and Indirect Serum Bilirubin Concentrations and Metabolic Syndrome among the Korean Population. *Endocrine*. 2011;39:182–89.

Jones EA, Basile AS. Does Ammonia Contribute to Increased GABA-Ergic

Neurotransmission in Liver Failure? Metabolic Brain Disease. 1998;13:351–60.

Jover R, De Madaria E, Felipo V, Rodrigo R, Candela A, Compañ A. Animal Models in the Study of Episodic Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. Metabolic Brain Disease. 2005;20:399–408.

Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M. Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats with Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. Hepatology. 2006;43:1257–66.

Kaya M, Ahishali B. Assessment of Permeability in Barrier Type of Endothelium in Brain Using Tracers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, and Horseradish Peroxidase. Permeability Barrier: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 2011;763:369–82.

Khan A, Ayub M, Khan WM. Hyperammonemia Is Associated with Increasing Severity of Both Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. International Journal of Hepatology. 2016;1-5

Kim JS, Koppula S, Yum MJ, Shin GM, Chae YJ, Hong SM, Lee JD, Song M. Anti-Fibrotic Effects of *Cuscuta Chinensis* with *in vitro* Hepatic Stellate Cells and a Thioacetamide-Induced Experimental Rat Model. Pharmaceutical Biology. 2017;55:1909–19.

Kobayashi A, Yokoyama H, Kataoka J, Ishida T, Kuno H, Sugai S, Sakakibara H, S Kayoko. Effects of Spaced Feeding on Gene Expression of Hepatic Transaminase and Gluconeogenic Enzymes in Rats. Journal of Toxicological Sciences. 2011;36:325–37.

Koca-Caliskan U, Yilmaz I, Taslidere A, Yalcin FN, Aka C, Sekeroglu N. *Cuscuta*

Arvensis Beyr ‘Dodder’: *In Vivo* Hepatoprotective Effects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Medicinal Food*. 2018a;21:625–31.

Koca-Caliskan U, Yilmaz I, Taslidere A, Yalcin FN, Aka C, Sekeroglu N. *Cuscuta Arvensis* Beyr ‘Dodder’: *In Vivo* Hepatoprotective Effects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Medicinal Food*. 2018b;21:625–31.

Konopacka A, Konopacki FA, Albrecht J. Protein Kinase G Is Involved in Ammonia-Induced Swelling of Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 2009;109:246–51.

Kornerup LS, Gluud LL, Vilstrup H, Dam G. Update on the Therapeutic Management of Hepatic Encephalopathy. *Current Gastroenterology Reports*. 2018;20:18–23.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged Bile Duct Obstruction: A New Experimental Model for Cirrhosis in the Rat. *British Journal of Experimental Pathology*. 1984;65:305–11.

Law JM. Book Review: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *Veterinary Pathology*. 2005;42:521–521.

Lee BS, Kim NJ, Jeong HY, Lee HY, Kang DY, Noh SM. Changes in Serum Cytokine Concentration: A Morphological Study of Liver Cirrhosis Induced by Common Bile Duct Ligation in Rats. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2003;18:6–12.

Lee TY, Chang HH, Chen JH, Hsueh ML, Kuo JJ. Herb Medicine Yin-Chen-Hao-Tang Ameliorates Hepatic Fibrosis in Bile Duct Ligation Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109:318–24.

Leke R, Bak LK, Iversen P, Sørensen M, Keiding S, Vilstrup H, Ott P, Portela LV, Schousboe A, Waagepetersen HS. Synthesis of Neurotransmitter GABA via the Neuronal

Tricarboxylic Acid Cycle Is Elevated in Rats with Liver Cirrhosis Consistent with a High GABAergic Tone in Chronic Hepatic Encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*. 2011;117:824–32.

Lemberg A, Fernández MA. Hepatic Encephalopathy, Ammonia, Glutamate, Glutamine and Oxidative Stress. *Annals of Hepatology*. 2009;8:95–102.

Levitt DG, Levitt MD. A Model of Blood-Ammonia Homeostasis Based on a Quantitative Analysis of Nitrogen Metabolism in the Multiple Organs Involved in the Production, Catabolism, and Excretion of Ammonia in Humans. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2018;11:193–215.

Li P, Ramm GA, Macdonald GA. Value of the 8-OxodG/DG Ratio in Chronic Liver Inflammation of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Redox Biology*. 2016;8:259–70.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:26087–124.

Lian G, Gnanaprakasam JNR, Wang T, Wu R, Chen X, Liu L, Shen Y, Yang M, Yang J, C Ying, V Vasilis, Cassel TA, Green DR, Liu Y, Fan TWM, Wang R. Glutathione de Novo Synthesis but Not Recycling Process Coordinates with Glutamine Catabolism to Control Redox Homeostasis and Directs Murine T Cell Differentiation. *ELife*. 2018;7:1–28.

Lim JH, Kim TW, Song IB, Park SJ, Kim MS, Cho ES, Jung JY, Son HY, Kim JW, Yun HI. Protective Effect of the Roots Extract of *Platycodon Grandiflorum* on Bile Duct Ligation-Induced Hepatic Fibrosis in Rats. *Human and Experimental Toxicology*. 2013;32:1197–1205.

Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of Abnormal Liver Function Tests. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79:307–12.

Lin MK, Lee MS, Huang HC, Cheng TJ, Cheng YD, Wu CR. *Cuscuta Chinensis* and *Cuscuta Campestris* Attenuate Scopolamine-Induced Memory Deficit and Oxidative Damage in Mice. *Molecules*. 2018;23:1-18.

Liu J, Lkhagva E, Chung HJ, Kim HJ, Hong ST. The Pharmabiotic Approach to Treat Hyperammonemia. *Nutrients*. 2018;10:1-18.

Llansola M, Montoliu C, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Gomez-Gimenez B, Malaguarnera M, Dadsetan S, Belghiti M, Garcia-Garcia R, Balzano T, Taoro L, Felipo V. Interplay between Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission Alterations in Cognitive and Motor Impairment in Minimal Hepatic Encephalopathy. *Neurochemistry International*. 2015;88:15–19.

Llansola M, Montoliu C, Cauli O, Hernández-Rabaza V, Agustí A, Cabrera-Pastor A, Giménez-Garzó C, González-Usano A, Felipo V. Chronic Hyperammonemia, Glutamatergic Neurotransmission and Neurological Alterations. *Metabolic Brain Disease*. 2015;28:151–54.

Lockwood AH, Finn RD, Campbell JA, Richman TB. Factors That Affect the Uptake of Ammonia by the Brain: The Blood-Brain PH Gradient. *Brain Research*. 1980;181:259–66.

Lockwood AH, Yap EWY, Wong WH. Cerebral Ammonia Metabolism in Patients with Severe Liver Disease and Minimal Hepatic Encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1991;11:337–41.

Lombardi G, Mannaioni G, Leonardi P, Cherici G, Carlfi V, Moroni F. Ammonium Acetate Inhibits Ionotropic Receptors and Differentially Affects Metabotropic Receptors

for Glutamate. *J Neural Transm.* 1994;97:187–96.

Maeda K, Koda M, Matono T, Sugihara T, Yamamoto S, Ueki M, Murawaki Y, Nobuyuki Y, Nishiyama S. Preventive Effects of ME3738 on Hepatic Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Hepatology Research.* 2008;38:727–35.

Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the Brain: From Metabolic End-Product to Signalling Molecule. *Nature Reviews Neuroscience.* 2018;19:235–49.

Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells.* 2019;8:184.

Mair M, Blaas L, Österreicher CH, Casanova E, Eferl R. JAK-STAT Signaling in Hepatic Fibrosis. *Frontiers in Bioscience.* 2011;16:2794–2811.

Marcaida G, Miñana MD, Burgal M, Grisolia S, Felipo V. Ammonia Prevents Activation of NMDA Receptors by Glutamate in Rat Cerebellar Neuronal Cultures. *European Journal of Neuroscience.* 1995;7:2389–96.

Mardini H, Smith FE, Record CO, Blamire AM. Magnetic Resonance Quantification of Water and Metabolites in the Brain of Cirrhotics Following Induced Hyperammonaemia. *Journal of Hepatology.* 2011;54:1154–60.

Marley R. Lipoic Acid Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in Anesthetized Rats with Biliary Cirrhosis. *Hepatology.* 1999;29:1358–63.

Martin H, Voss K, Hufnagl P, Wack K, Wassilew G. Morphometric and Densitometric Investigations of Protoplasmic Astrocytes and Neurons in Human Hepatic Encephalopathy. *Experimental Pathology.* 1987;32:241–50.

Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine Synthetase: Glial Localization in Brain. *Science*. 1977;195:1356–58.

Mason S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:1–15.

Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral Blood Flow and the Development of Ammonia-Induced Brain Edema in Rats after Portacaval Anastomosis. *Hepatology*. 1999; 30:876–80.

Matono T, Koda M, Tokunaga S, Sugihara T, Ueki M, Murawaki Y. The Effects of the Selective Mineralocorticoid Receptor Antagonist Eplerenone on Hepatic Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation in Rat. *International Journal of Molecular Medicine*. 2010;25:875–82.

McMillin M, DeMorrow S. Effects of Bile Acids on Neurological Function and Disease. *FASEB Journal*. 2016;30:3658–68.

McMillin M, Grant S, Frampton SG, Petrescu AD, Williams E, Jefferson B, Thomas A, Brahmaroutu A, Demorrow S. Elevated Circulating TGF β 1 during Acute Liver Failure Activates TGF β R2 on Cortical Neurons and Exacerbates Neuroinflammation and Hepatic Encephalopathy in Mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16:1–15.

Mertens KL, Kalsbeek A, Soeters MR, Eggink HM. Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:1-16.

Michalak A, Knecht K, Butterworth RF. Hepatic Encephalopathy in Acute Liver Failure: Role of the Glutamate System. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997;420:35-44.

Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of Brain Edema and Investigation into Anti-Edema Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:9949–75.

Minana MD, Llansola M, Hermenegildo C, Cucarella C, Montoliu C, Kosenko E, Grisolfi S, Felipo V. Glutamate and muscarinic receptors in the molecular mechanisms of acute ammonia toxicity and of its prevention. *Adv Exp Med Biol*. 1997;420:45–56.

Molinero N, Ruiz L, Sánchez B, Margolles A, Delgado S. Intestinal Bacteria Interplay with Bile and Cholesterol Metabolism: Implications on Host Physiology. *Frontiers in Physiology*. 2019;10:1–10.

Monfort P, Muñoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V. Effects of Hyperammonemia and Liver Failure on Glutamatergic Neurotransmission. *Metabolic Brain Disease*. 2002;17:237–50.

Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Túnez I, Gascon F, Muñoz MC, Gómez M, Pera C. Melatonin versus Vitamin E as Protective Treatment against Oxidative Stress after Extra-Hepatic Bile Duct Ligation in Rats. *Journal of Pineal Research*. 2001;31:138–44.

Montoliu C, Cauli O, Urios A, Elmlili N, Serra MA, Giner-Duran R, González-Lopez O, Del Olmo JA, Wassel A, Rodrigo JM, Felipo V. 3-Nitro-Tyrosine As a Peripheral Biomarker of Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients With Liver Cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology*. 2011;106:1629–37.

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C. The Release and Neosynthesis of Glutamic Acid Are Increased in Experimental Models of Hepatic Encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*. 1983;40:850–54.

Mu M, Zuo S, Wu RM, Deng KS, Lu S, Zhu JJ, Zou GL, Yang J, Cheng ML, Zhao XK. Ferulic Acid Attenuates Liver Fibrosis and Hepatic Stellate Cell Activation via Inhibition

of TGF- β /Smad Signaling Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;12:4107–15.

Muriel P. Interferon- α Preserves Erythrocyte and Hepatocyte Atpase Activities from Liver Damage Induced by Prolonged Bile Duct Ligation in the Rat. *Journal of Applied Toxicology*. 1995;15:449–53.

Muriel P. Role of Free Radicals in Liver Diseases. *Hepatology International*. 2009;3:526–36.

Muriel P, Suarez OR, Gonzalez P, Zuñiga L. Protective Effect of S-Adenosyl-l-Methionine on Liver Damage Induced by Biliary Obstruction in Rats: A Histological, Ultrastructural and Biochemical Approach. *Journal of Hepatology*. 1994;21:95–102.

Nan JX, Park EJ, Kim YC, Ko G, Sohn DH. *Scutellaria Baicalensis* Inhibits Liver Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation or Carbon Tetrachloride in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;54:555–63.

Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SMH, Dannenberg AJ, Tahan SR, Waxman DJ. Markedly Enhanced Cytochrome P450 2E1 Induction and Lipid Peroxidation Is Associated with Severe Liver Injury in Fish Oil—Ethanol-Fed Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1994;18:1280–85.

Neff G. Pharmacoeconomics of Hepatic Encephalopathy. *Pharmacotherapy*. 2010;30:28–32.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Implication of Free Radical Mechanisms in Ethanol-Induced Cellular Injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992;12:219–40.

Norenberg MD, Bender AS. Astrocyte Swelling in Liver Failure: Role of Glutamine and

Benzodiazepines. *Acta Neurochirurgica*. 1994;60:24–27.

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KVS, Panickar KS. New Concepts in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Metabolic Brain Disease*. 2007;22:219–34.

Norenberg MD, Rama Rao KVS, Jayakumar AR. Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Metabolic Brain Disease*. 2005;20:303–18.

Norenberg MD, Rama Rao KVS, Jayakumar AR. Signaling Factors in the Mechanism of Ammonia Neurotoxicity. *Metabolic Brain Disease*. 2009;24:103–17.

Norenberg MD. Astrocytic-Ammonia Interactions in Hepatic Encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*. 1996;16:245–53.

Noureen S, Noreen S, Ghumman SA, Batool F, Bukhari SNA. The Genus *Cuscuta Convolvaceae*: An Updated Review on Indigenous Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019;22:1225–52.

Ochoa-Sanchez R, Rose CF. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2018;8:262–71.

Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Relationship between Tumor Necrosis Factor-Alpha and Ammonia in Patients with Hepatic Encephalopathy Due to Chronic Liver Failure. *Annals of Medicine*. 2005;37:603–12.

Ohara K, Aoyama M, Fujita M, Sobue K, Asai K. Prolonged Exposure to Ammonia Increases Extracellular Glutamate in Cultured Rat Astrocytes. *Neuroscience Letters*. 2009;462:109–12.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2008;87:315–424.

Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Cremer M, Schleicher A, Kircheis G, Reifenberger G, Kostopoulos G, Häussinger D, Zilles K. Neurotransmitter Receptor Imbalances in Motor Cortex and Basal Ganglia in Hepatic Encephalopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2009;24:291–306.

Panickar KS, Jayakumar AR, Rama Rao KVS, Norenberg MD. Ammonia-Induced Activation of P53 in Cultured Astrocytes: Role in Cell Swelling and Glutamate Uptake. *Neurochemistry International*. 2009;55:98–105.

Patel A, Wade JB, Thacker LR, White MB, Unser A, Heuman DM, Bajaj JS. Brain Reserve Modulates Health-Related Quality of Life in Patients With Cirrhosis Independent of Covert Hepatic Encephalopathy and MELD Score. *Gastroenterology*. 2014;146:932.

Patil A, Patil V, Chaudhari K, Chaudhari, R. In vitro free radicals scavenging activity of stems of *Cuscuta Reflexa*. *Journal of Pharmacy Research*. 2009;2:58-61.

Patidar KR, Bajaj JS. Covert and Overt Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015;13:2048–61.

Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A, Warnes TW. Ursodeoxycholic Acid in Primary Biliary Cirrhosis Improves Glutathione Status but Fails to Reduce Lipid Peroxidation. *Redox Report*. 2006;11:117–23.

Phosrithong N, Nuchtavorn N. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activites of Clerodendrum Leaf Extracts Collected in Thailand. *European Journal of Integrative Medicine*. 2016;8:281–85.

Poveda MJ, Bernabeu A, Concepción L, Roa E, De Madaria E, Zapater P, Pérez-Mateo M, Jover R. Brain Edema Dynamics in Patients with Overt Hepatic Encephalopathy. A Magnetic Resonance Imaging Study. *NeuroImage*. 2010;52:481–87.

Qian K, Zhong S, Xie K, Yu D, Yang R, Gong DW. Hepatic ALT Isoenzymes Are Elevated in Gluconeogenic Conditions Including Diabetes and Suppressed by Insulin at the Protein Level Kun. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015;31:562–71.

Qiong W, Yong-liang Z, Ying-huib L, Shan-guang C, Jiang-huid G, Yi-xia C, Ninga J, Xin-minb L. The memory enhancement effect of Kai Xin San on cognitive deficit induced by simulated weightlessness in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;187:9-16.

Quinn M, McMillin M, Galindo C, Frampton G, Pae HY, DeMorrow S. Bile Acids Permeabilize the Blood Brain Barrier after Bile Duct Ligation in Rats via Rac1-Dependent Mechanisms. *Digestive and Liver Disease*. 2014;46:527–34.

Rabinstein AA. Treatment of Brain Edema in Acute Liver Failure. *Current Treatment Options in Neurology*. 2010;12:129–41.

Raghavendra Rao VL, Murthy CRK. Hyperammonemic Alterations in the Uptake and Release of Glutamate and Aspartate by Rat Cerebellar Preparations. *Neuroscience Letters*. 1991;130:49–52.

Rai R, Ahuja CK, Agrawal S, Kalra N, Duseja A, Khandelwal N, Chawla Y, Dhiman RK. Reversal of Low-Grade Cerebral Edema after Lactulose/Rifaximin Therapy in Patients with Cirrhosis and Minimal Hepatic Encephalopathy. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2015;6:111-8.

Rama Rao KVS, Kakulavarapu V, Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine in the

Pathogenesis of Acute Hepatic Encephalopathy. *Neurochemistry International*. 2012;61:575–80.

Rama Rao KVS, Kakulavarapu V, Jayakumar AR, Norenberg MD. Brain Edema in Acute Liver Failure: Mechanisms and Concepts. *Metabolic Brain Disease*. 2014;29:927–36.

Rama Rao KVS, Kakulavarapu V, Jayakumar AR, Tong X, Alvarez VM, Norenberg MD. Marked Potentiation of Cell Swelling by Cytokines in Ammonia-Sensitized Cultured Astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*. 2010;7:66.

Rama Rao KVS, Kakulavarapu V, Norenberg MD. Glutamine in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: The Trojan Horse Hypothesis Revisited. *Neurochemical Research*. 2014;39:593–98.

Ramaiah SK. A Toxicologist Guide to the Diagnostic Interpretation of Hepatic Biochemical Parameters. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45:1551–57.

Ramos-Tovar E, Muriel P. Free Radicals, Antioxidants, Nuclear Factor-E2-Related Factor-2 and Liver Damage. *Journal of Applied Toxicology*. 2020a;40:151–68.

Ramos-Tovar E, Muriel P. Molecular Mechanisms That Link Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in the Liver. *Antioxidants*. 2020b;9:1–21.

Rama Rao KVS, Jayakumar AR, Tong X, Curtis KM, Norenberg MD. Brain Aquaporin-4 in Experimental Acute Liver Failure. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69:869–79.

Raval N, Kalyane D, Maheshwari R, Tekade RK. Surface Modifications of Biomaterials and Their Implication on Biocompatibility. Elsevier Inc. 2019;639-674.

Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo

JM, Felipo V. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*. 2010;139:675–84.

Rodrigo R, Felipo V. Brain Regional Alterations in the Modulation of the Glutamate-Nitric Oxide-CGMP Pathway in Liver Cirrhosis. Role of Hyperammonemia and Cell Types Involved. *Neurochemistry International*. 2006;48:472–77.

Romero-Gómez M, Boza F, García-Valdecasas MS, García E, Aguilar-Reina J. Subclinical Hepatic Encephalopathy Predicts the Development of Overt Hepatic Encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology*. 2001;96:2718–23.

Rose CF. Ammonia-Lowering Strategies for the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2012a;92:321–31.

Rose CF. Ammonia-Lowering Strategies for the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2012b;92:321–31.

Rothman DL, De Feyter HM, Maciejewski PK, Behar KL. Is There *in Vivo* Evidence for Amino Acid Shuttles Carrying Ammonia from Neurons to Astrocytes. *Neurochemical Research*. 2012;37:2597–2612.

Saleem M, Naseer F. Medicinal Plants in the Protection and Treatment of Liver Diseases. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2014;9:511–26.

Sari AO. Ege ve Güney Marmara Bölgelerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler. *Anadolu*. 2014;20:1–21.

Savlan I, Liakina V, Valantinas J. Concise Review of Current Concepts on Nomenclature and Pathophysiology of Hepatic Encephalopathy. *Medicina*. 2014;50:75–81.

Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia Induces MK-801-Sensitive Nitration and Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Rat Astrocytes. *The FASEB Journal*. 2002;16:739–41.

Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Advances Neurobiology*. 2014;11:13–30.

Sepehrinezhad A, Zarifkar A, Namvar G, Shahbazi A, Williams R. Astrocyte Swelling in Hepatic Encephalopathy: Molecular Perspective of Cytotoxic Edema. *Metabolic Brain Disease*. 2020;35:559–78.

Sharawy MH, Abdel-Rahman N, Megahed N, El-Awady MS. Paclitaxel Alleviates Liver Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation in Rats: Role of TGF-B1, IL-10 and c-Myc. *Life Sciences*. 2018;211:245–51.

Shawcross DL, Wendon JA. The Neurological Manifestations of Acute Liver Failure. *Neurochemistry International*. 2012;60:662–71.

Sheen JM, Chen YC, Hsu MH, Tain YL, Yu HR, Huang LT. Combined Intraperitoneal and Intrathecal Etanercept Reduce Increased Brain Tumor Necrosis Factor-Alpha and Asymmetric Dimethylarginine Levels and Rescues Spatial Deficits in Young Rats after Bile Duct Ligation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;10:1–15.

Shi Z, Zhang W, Lu Y, Lu Y, Xu L, Fang Q, Wu M, Jia M, Wang Y, Dong L, Yan X, Yang S, Yuan F. Aquaporin 4-Mediated Glutamate-Induced Astrocyte Swelling Is Partially Mediated through Metabotropic Glutamate Receptor 5 Activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11:1–12.

Shin S, Lee YJ, Kim EJ, Lee AS, Kang DG, Ho Sub Lee HS. Effect of *Cuscuta Chinensis* on Renal Function in Ischemia/Reperfusion- Induced Acute Renal Failure Rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39:889–902.

Siew ED, Fissell WH, Tripp CM, Blume JD, Wilson MD, Clark AJ, Vincz AJ, Ely EW, Pandharipande PP, Girard TD. Acute Kidney Injury as a Risk Factor for Delirium and Coma during Critical Illness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017;195:1597–1607.

Singh U, Singh S, Kochhar A. Therapeutic Potential of Antidiabetic Nutraceuticals. *Phytopharmacology*. 2012;2:144–69.

Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, Moriyama M, Reddy PVB, Norenberg MD. NF κ B in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Culture. *Journal of Neurochemistry*. 2008;106:2302–11.

Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF. Glial Fibrillary Acidic Protein in Hepatic Encephalopathy. An Immunohistochemical Study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981;40:55.

Soria FC, Beltrán MLM, Soto MEF, Vega MIP, Zárate CB, Ruiz LH. Expression of NMDA Receptor Subunits in Rat Prefrontal Cortex with CCL4-Induced Hepatic Damage after a Treatment with *Rosmarinus Officinalis* L. *Neurología*. 2012;27:261–67.

Stewart CA, Smith GE. Minimal Hepatic Encephalopathy. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*. 2007;4:677–85.

Stokum JA, Kurland DB, Gerzanich V, Simard JM. Mechanisms of Astrocyte-Mediated Cerebral Edema. *Neurochem Res*. 2015;40:317–28.

Strazzabosco M. Transport Systems in Cholangiocytes: Their Role in Bile Formation and

Cholestasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1997;70:427–34.

Swaminathan M, Ellul M, Cross T. Hepatic Encephalopathy: Current Challenges and Future Prospects. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*. 2018;10:1–11.

Szerb JC, Butterworth RF. Effect of Ammonium Ions on Synaptic Transmission in the Mammalian Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*. 1992;39:135–53.

Şen A, Yıldırım A, Bitis L, Doğan A. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Capitula, Leaf and Stem Extracts of *Tanacetum Cilicicum* (Boiss.) Grierson. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2019;6:211–22.

Şener G, Kabasakal L, Şehirli Ö, Ercan F, Gedik N. 2-Mercaptoethane Sulfonate (MESNA) Protects against Biliary Obstruction-Induced Oxidative Damage in Rats. *Hepatology Research*. 2006;35:140–46.

Şener G, Kabasakal L, Yüksel M, Gedik N, Alican I. Hepatic Fibrosis in Biliary-Obstructed Rats Is Prevented by Ginkgo Biloba Treatment. *World Journal of Gastroenterology*. 2005;11:5444–49.

Taegtmeyer AB, Haschke M, Tchambaz L, Buylaert M, Tschöpl M, Beuers U, Drewe J, Krähenbühl S. A Study of the Relationship between Serum Bile Acids and Propranolol Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Patients with Liver Cirrhosis and in Healthy Controls. *PLoS ONE*. 2014;9:1-11.

Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, Weiskirchen R. Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;96:1–11.

Tahan G, Akin H, Aydogan F, Ramadan SS, Yapicier O, Tarcin O, Uzun H, Tahan V,

Zengin K. Melatonin Ameliorates Liver Fibrosis Induced by Bile-Duct Ligation in Rats. *Canadian Journal of Surgery*. 2010;53:313–18.

Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The Effects of N-Acetylcysteine on Bile Duct Ligation-Induced Liver Fibrosis in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007;52:3348–54.

Takahashi K, Kameda H, Kataoka M, Sanjou K, Harata N, Akaike N. Ammonia Potentiates GABAA Response in Dissociated Rat Cortical Neurons. *Neuroscience Letters*. 1993;151:51–54.

Tang G, Yang GY. Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17:1–11.

Toklu HZ, Inac TA, Şehirli AÖ, Şener G. The Protective Effect of *Nigella Sativa* Oil in the Brain of the Biliary Obstructed Rats. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2013;17:46–51.

Tominaga S, Watanabe A, Tsuji T. Synergistic Effect of Bile Acid, Endotoxin, and Ammonia on Brain Edema. *Metabolic Brain Disease*. 1991;6:93–105.

Tomkiewicz C, Muzeau F, Edgar AD, Barouki R, Aggerbeck M. Opposite Regulation of the Rat and Human Cytosolic Aspartate Aminotransferase Genes by Fibrates. *Biochemical Pharmacology*. 2004;67:213–25.

Trautwein C, Koch A. Mechanisms of Acute Liver Failure. *Newyork*:2014;273-388

Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and Brain Trauma. *Neuroscience*. 2004;129:1019–27.

Ushioda R, Nagata K. Redox-Mediated Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019;11:1-15.

Vakili A, Mojarrad S, Akhavan MM, Rashidy-Pour A. Pentoxifylline Attenuates TNF- α Protein Levels and Brain Edema Following Temporary Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Brain Research*. 2011;1377:119–25.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160:1–40.

Veterans CRG. Oxidative Stress and Hepatic Stellate Cells: A Paradoxical Relationship. *Trends Cell Mol Biol*. 2012;7:1–10.

Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study Of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60:715–35.

Visek WJ. Ammonia Metabolism, Urea Cycle Capacity and Their Biochemical Assessment. *Nutrition Reviews*. 1979;37:273–82.

Volk ML, Tocco RS, Bazick J, Rakoski MO, Lok AS. Hospital Re-Admissions among Patients with Decompensated Cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:247–52.

Vorhees CV, Williams MT. Morris Water Maze: Procedures for Assessing Spatial and Related Forms of Learning and Memory. *Nat Protoc*. 2016;1:848–58.

Wang R, Song F, Li S, Wu B, Gu Y, Yuan Y. Salvianolic Acid A Attenuates CCl₄-Induced Liver Fibrosis by Regulating the PI3K/AKT/MTOR, Bcl-2/Bax and Caspase-

3/Cleaved Caspase-3 Signaling Pathways. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;13:1889–1900.

Watanabe A, Takei N, Higashi T, Shiota T, Nakatsukasa H, Fujiwara M, Sakata T, Nagashima H. Glutamic Acid and Glutamine Levels in Serum and Cerebrospinal Fluid in Hepatic Encephalopathy. *Biochemical Medicine*. 1984;32:225–31.

Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B. Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2005;20:359–67.

Wells RG. The Portal Fibroblast—Not Just a Poor Man’s Stellate Cell Rebecca. *Gastroenterology*. 2014;147:41–47.

Wells RG, Schwabe R. Origin and Function of Myofibroblasts in the Liver. *Seminars in Liver Disease*. 2015;35:97–106.

Wigmore SJ, Walsh TS, Lee A, Ross JA. Pro-Inflammatory Cytokine Release and Mediation of the Acute Phase Protein Response in Fulminant Hepatic Failure. *Intensive Care Medicine*. 1998;24:224–29.

Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, Harry D, Stadlbauer V, Zou Z, Williams R, Davies C, Moore KP, Jalan R. Endotoxemia Produces Coma and Brain Swelling in Bile Duct Ligated Rats. *Hepatology*. 2007;45:1517–26.

Xiaopeng T, Zhao C, Guo J, Xie S, Yin F, Huo X, Zhang X. Carvedilol Attenuates the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation. *BioMed Research International*. 2017;2017:1-10.

Yada K, Ishibashi H, Mori H, Morine Y, Zhu C, Feng R, Kono T, Shimada M. The Kampo

Medicine 'Daikenchuto (TU-100)' Prevents Bacterial Translocation and Hepatic Fibrosis in a Rat Model of Biliary Atresia. *Surgery*. 2016;159:1600–1611.

Yang B, Sun T, Chen Y, Xiang H, Xiong J, Bao S. The Role of Gut Microbiota in Mice With Bile Duct Ligation-Evoked Cholestatic Liver Disease-Related Cognitive Dysfunction. *Front. Microbiol.* 2022;13:1-10.

Yanping Z, Chang SKC, Gu Y, Qian SY. Antioxidant Activity and Phenolic Compositions of Lentil (*Lens Culinaris* Var. Morton) Extract and Its Fractions. *J Agric Food Chem.* 2011;59:2268–76.

Ze YR, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW. Alanine Aminotransferase Isoenzymes: Molecular Cloning and Quantitative Analysis of Tissue Expression in Rats and Serum Elevation in Liver Toxicity. *Hepatology*. 2009;49:598–607.

Zemtsova I, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schrör K, Häussinger D. Microglia Activation in Hepatic Encephalopathy in Rats and Humans. *Hepatology*. 2011;54:204–15.

Zhangdi HJ, Su SB, Wang F, Liang ZY, Yan YD, Qin SY, Jiang HX. Crosstalk Network among Multiple Inflammatory Mediators in Liver Fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25:4835–49.

Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, Jean Claude Trinchet JC, Beaugrand M, Guillet JG, Guettier C. Clinical and Biological Relevance of Hepatocyte Apoptosis in Alcoholic Hepatitis. *Journal of Hepatology*. 2001; 34:254–60.