

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK SİGARA KULLANIMININ AKCİĞERDE NEDEN  
OLDUĞU APOPTOZ ÜZERİNE KANTARON  
EKSTRESİNİN KORUYUCU ROLÜ**

**Uzm. Ecz. Sibel SİLAHTAROĞLU**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK**

**ADANA-2019**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK SİGARA KULLANIMININ AKCİĞERDE NEDEN  
OLDUĞU APOPTOZ ÜZERİNE KANTARON  
EKSTRESİNİN KORUYUCU ROLÜ**

**Uzm. Ecz. Sibel SİLAHTAROĞLU**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK20155006  
no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**ADANA-2019**

## KABUL ve ONAY


Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“Kronik Sigara Kullanımının Akciğerde Neden Olduğu Apoptoz Üzerine Kantaron Ekstresinin Koruyucu  
Rolü”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tarihi:** 28 / 05 / 2019


### TEZ SINAV JÜRİSİ

  
Prof. Dr. Ergin ŞINGIRIK  
Çukurova Üniversitesi Tıp F.  
**Başkan**

  
Prof. Dr. Yusuf KARATAŞ  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
**Üye**

  
Doç. Dr. Sirem BÜYÜKNACAR  
Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
**Üye**

  
Dr. Öğr. Üyesi Nalan TIFTİK  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
**Üye**

  
Doç. Dr. Hakan KURT  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi  
**Üye**

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve  
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

# ETİK BEYANI

## T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim. ...28....05..../2019....

İMZA

Adı Soyadı

Kayıtlı olunan Program  
Tezin Konusu  
Ekstresinin Koruyucu Rolü

: Çukurova Üni. Tıp Fak. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora P  
: Kronik Sigara Kullanımının Akciğerde Neden Olduğu Apoptoz Üzerine Kant

Tezin Türü

: Yüksek Lisans :  Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı  
Danışmanın İletişim Bilgileri  
Telefon  
E-Posta

: Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK  
:533 764 34 64  
: esingirik@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 532 545 04 95  
E-Posta : [s.silahtaroglu@hotmail.com](mailto:s.silahtaroglu@hotmail.com)  
Adresi : Güvenciler mah. 1911 sok.  
Çalikoğlu apt. no:25/A  
Yenişehir MERSİN

*\*Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

## TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca eğitimime kesintisiz ve tam destek sağlayan, bilimsel yaklaşımı ve yönlendirmeleri ile her zaman yoluma ışık tutan sabrı ve insani değerlere olan sarsılmaz bağlılığı ile esas faktörün insan olduğuna inancımı pekiştiren değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK'e saygılarımı ve içten teşekkürlerimi sunmak isterim. Tez deneylerimi yürütmekte içten yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Mahir Kaplan'a desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Ayrıca Farmakoloji Bölümü'nün değerli öğretim üyelerine de katkı ve emeklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Tüm doktora sürecim boyunca değerli yardımlarını ve ilgilerini hep hissettiğim Farmakoloji Bölümü'nün değerli personellerine teşekkür ederim.

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu tarafından, TDK20155006 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	ii
<b>ETİK BEYANI</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÖZET</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. Akciğerler .....	5
2.1.1. Segmenter anatomi .....	6
2.1.2. Bronş ağacının yapısı .....	7
2.1.3. Asinüs, alveolar yapı, interstisyum .....	9
2.1.4. Akciğerlerin damarları .....	10
2.1.5. Akciğerlerin innervasyonu .....	10
2.1.6. Ventilasyon-perfüzyon ilişkisi .....	11
2.1.7. Difüzyon .....	11
2.2. Sigara Dumanı .....	11
2.2.1. Sigaranın İçeriği .....	11
2.2.1.1. Karbonmonoksit .....	13
2.2.1.2. Azot Oksitler .....	13
2.2.1.3. Aldehit ve Ketonlar .....	13
2.2.1.4. Nitröz Aminler .....	14
2.2.1.5. Hidrojen Siyanür .....	14
2.2.1.6. Katran .....	14
2.2.1.7. Aromatik hidrokarbonlar .....	14
2.2.1.8. Nikotin .....	14

2.2.1.9. Diğer maddeler .....	15
2.2.2. Sigaranın Vücut Üzerine Genel Etkileri .....	16
2.2.2.1. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri .....	16
2.2.2.2. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri .....	18
2.2.2.2.1. Patofizyolojik etkiler-Sigara kullanımı ve ateroskleroz	19
2.2.2.2.2. Fizyolojik etkiler.....	19
2.2.2.2.3. Hematolojik Etkiler.....	20
2.2.2.2.4. Metabolik Etkiler .....	21
2.2.2.3. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri.....	21
2.2.2.4. Bebek ve Çocuk Sağlığı Üzerine Etkileri.....	21
2.2.2.5. Kadın Sağlığına Etkileri .....	22
2.2.2.6. Kemik Yoğunluğu ve Kırık Riski.....	22
2.2.2.7. Diğer Sağlık Sorunları .....	22
2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem .....	23
2.4. Apoptoz.....	26
2.4.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları.....	27
2.4.1.1. Apoptozun Başlatılması.....	28
2.4.1.1.1. Apoptoz Yolakları.....	28
2.4.1.1.1.1. İntersik Yolak .....	28
2.4.1.1.1.2. Ekstrinsik Yolak .....	29
2.4.1.1.1.2. İntersik Endoplazmik Retikulum Yolağı....	30
2.4.1.1.2. Apoptozun Modülatörleri .....	31
2.4.1.1.2.1. Bcl-2 Gen Ailesi .....	32
2.4.1.1.2.2. Bax Geni ve Proteini.....	34
2.4.1.1.2.3. p53 .....	36
2.4.1.1.2.4. c-Myc.....	36
2.4.1.1.2.5. Nükleer Transkripsiyon Faktörü NF- $\kappa$ B .....	37
2.4.1.2. Hücre içi Proteazların Aktivasyonu.....	37
2.4.1.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler .....	40
2.4.1.3.1. Biyokimyasal Değişiklikler .....	40
2.4.1.3.2. Morfolojik Değişiklikler .....	40
2.4.1.4. Fagositoz.....	42

2.5. Hypericum perforatum L. ....	42
2.5.1. <i>H. perforatum</i> ' un biyolojik aktif bileşenleri:.....	44
2.5.1.1. Naftodiantronlar.....	44
2.5.1.2. Floroglusinoller.....	46
2.5.1.3. Flavonoidler.....	47
2.5.1.4. Biflavonlar.....	48
2.5.1.5. Fenilpropanlar.....	49
2.5.1.6. Proantosiyanidinler.....	49
2.5.1.7. Uçucu yağlar.....	50
2.5.1.8. Diğer kimyasal bileşenler.....	50
2.5.2. <i>H. perforatum</i> üzerinde yapılmış biyoaktivite çalışmaları.....	50
2.5.2.1. Antidepresan etki.....	50
2.5.2.1.1. İn vivo çalışmalar.....	50
2.5.2.1.2. Klinik Çalışmalar.....	54
2.5.2.2. Yara iyileştirici etki.....	58
2.5.2.3. Antibakteriyel etki.....	63
2.5.2.4. Antifungal etki.....	65
2.5.2.5. Antiviral etki.....	65
2.5.2.6. Antioksidan etki.....	68
2.5.2.7. Antiinflamatuvar etki.....	71
2.5.2.8. Apoptozu modüle edici etki.....	73
2.5.2.9. Antikanser etki.....	77
2.5.2.10. Fotosensitivite etki.....	79
2.5.2.11. Diğer etkiler.....	80
2.5.3. Advers etkiler.....	82
2.5.4. Gebelik ve laktasyon.....	82
2.5.5. İlaç etkileşimleri.....	83
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>85</b>
3.1. Sigara Duman Düzenegi.....	85
3.2. <i>H. perforatum</i> Ekstresinin Hazırlanması:.....	86
3.3. Kullanılan kimyasal ajanlar.....	87
3.4. ELISA deneyleri.....	87

3.4.1. Homojenizasyon .....	87
3.4.2. Protein miktar tayini .....	87
3.4.3. ELISA Testi .....	88
3.4.3.1. ELISA Bax Miktar Tayini .....	88
3.4.3.2. ELISA Bcl-2 Miktar Tayini.....	88
3.4.3.3. ELISA kaspaz-3 Miktar Tayini.....	88
3.5. Sonuçların değerlendirilmesi .....	89
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>90</b>
4.1. ELISA deneyleri .....	90
4.1.1. Bax protein miktar tayini .....	90
4.1.2. Bcl-2 protein miktar tayini.....	90
4.1.3. Kaspaz-3 enzim miktar tayini.....	91
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>93</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	<b>97</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>98</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>115</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.1. Hypericum perforatum L.(Hypericaceae) (20).....	3
Şekil 2.1. Solunum sistemi bölümleri (33).....	5
Şekil 2.2. Akciğerlerin dış yandan görünüşü (33).....	6
Şekil 2.3. Akciğerlerin segmenter anatomisi (33).....	7
Şekil 2.4. Bronş ağacının yapısı (33).....	8
Şekil 2.5. Alveol yapısı (33).....	9
Şekil 2.6. Oksidatif stres ve antioksidan sistem (78).....	26
Şekil 2.7. Apoptotik süreç (82).....	28
Şekil 2.8. İ ntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (91).....	30
Şekil 2.9. İ ntrinsik mitokondriyal, intrinsik ER ve ekstrinsik apoptotik yollar (96).....	31
Şekil 2.10. Bcl-2 ailesi (91).....	33
Şekil 2.11. Bax'ın yapısı (101).....	35
Şekil 2.12. Kaspaz aktivasyonu (105).....	38
Şekil 2.13. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler (82).....	42
Şekil 2.14. Hiperisin ve psödohiperisin (125).....	45
Şekil 2.15. Hiperforin ve adhiperforin (130).....	46
Şekil 2.16. Kersetin ve heterozitleri (140).....	48
Şekil 2.17. Amentoflavon (144).....	49
Şekil 2.18. Klorojenik asit (145).....	49
Şekil 3.1. Duman Uygulama Düzenegi.....	86
Şekil 4.1. Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde Bax proteini üzerine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05). .....	90
Şekil 4.2. Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde Bcl-2 proteini üzerine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05).....	91
Şekil 4.3. Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde kaspaz-3 enzimi üzerine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05).....	91

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 2.1. Sigara dumanındaki bazı maddeler (34) .....	12
Çizelge 2.2. Apoptoz ve Genler (17). .....	32
Çizelge 2.3. H. perforatum ana bileşenlerinin bilinen biyolojik özellikleri (123) .....	44
Çizelge 4.1. Deney gruplarına göre Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 miktarları (pg/ml).....	92



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotropik hormon
<b>AKR</b>	: Akciğer karsinom
<b>AP1</b>	: Aktivatör protein 1
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>Apaf-1</b>	: Apoptoz proteaz activator protein 1
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>Bcl-2</b>	: B- hücre lenfoma 2
<b>Bad</b>	: Bcl-2 hücre ölümü agonisti
<b>Bak</b>	: Bcl-2 antagonist/ katil
<b>Bax</b>	: Bcl-2 ilişkili protein X
<b>BH</b>	: Bcl-2 homoloji
<b>Bid</b>	: BH3 ile etkileşen ölüm agonisti
<b>Bik</b>	: Bcl-2 ile etkileşen katil
<b>Bim</b>	: Bcl-2 like protein 11
<b>Bok</b>	: Bcl-2 ilişkili ovarian katil
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Kalsiyum iyonu
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	: Sitolik Ca <sup>2+</sup> konsantrasyonu
<b>C57BL/6</b>	: Lewis Lung Karsinomunun ilk keşfedildiği fare soyu
<b>CC16</b>	: Clara hücre 16
<b>Ced-9</b>	: Hücre ölüm anomalite geni-9
<b><i>C. elegans</i></b>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CD8</b>	: Cluster of differentiation 8
<b>CFU</b>	: Koloni oluşturan birim
<b>CHOP</b>	: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
<b>Cl</b>	: Klor
<b>cm<sup>2</sup></b>	: Santimetrekare
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>COX2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>CXCL</b>	: Kemokin (C-X-C motif) ligand
<b>DAD</b>	: Diyod serili cihazlar

<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DSM</b>	: Diagnostic and statistical manual of mental disorders
<b>dUTP</b>	: Deoksiüridin trifosfat
<b>EID<sub>50</sub></b>	: Embriyo infeksiyöz dozun %50' si
<b>ELISA</b>	: Enzyme linked immüno sorbent assay
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	: Demir iyonu
<b>FLICE</b>	: FADD-homolog ICE/CED-3 benzer proteaz
<b>Fmlp</b>	: N- formil-metionil-lösil-fenilalanin
<b>g</b>	: Gram
<b>GH</b>	: Growth (Büyüme) Hormonu
<b>GSSG</b>	: Glutasyon disülfid
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>H<sup>+</sup></b>	: Hidrojen iyonu
<b>H1N1</b>	: Pandemik influenza A virüsü
<b>HIV</b>	: Human immunodeficiency virüs
<b>HPLC</b>	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>Hrd1</b>	: HMG-CoA redüktaz yıkım proteini-1
<b>Hrk</b>	: Harakiri
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
<b>ICAM1</b>	: Hücreler arası adhezyon molekülü-1
<b>ID<sub>50</sub></b>	: İnfeksiyöz dozun %50' si
<b>IgE</b>	: İmmünglobulin E
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>INR</b>	: Protrombin zamanı (uluslararası normalleştirilmiş oran)
<b>i.p.</b>	: İntraperitoneal
<b>IRE1</b>	: İnositol-requiring enzyme 1
<b>J</b>	: joule
<b>JNK</b>	: c-Jun N- terminal kinaz
<b>K</b>	: Potasyum
<b>Kb</b>	: Kilobayt

<b>kD</b>	: KiloDalton
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>L</b>	: Litre
<b>LC-MS</b>	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
<b>LOH</b>	: Heterozigosite kaybı
<b>MAO</b>	: Monoamin oksidaz
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>m<sup>2</sup></b>	: Metrekare
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm<sup>3</sup></b>	: Milimetreküp
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	: Magnezyum iyonu
<b>mg</b>	: Miligram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>Mel</b>	: Myeloid hücre lösemisi
<b>MDM2</b>	: Murine double minute 2
<b>MIC</b>	: Minimum inhibitor konsantrasyon
<b>MOMP</b>	: Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum iyonu
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
<b>NFKB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>OMM</b>	: Dış mitokondriyal zar
<b>P</b>	: İstatiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (probability)
<b>PARP</b>	: PoliADP riboz polimeraz
<b>PERK</b>	: Protein kinaz RNA-benzer endoplazmik reticulum kinaz
<b>pH</b>	: Potansiyel hidrojen
<b>pg</b>	: Pikogram

<b>PUMA</b>	: p53 upregulated modulator of apoptosis
<b>REM</b>	: Rapid eye movement
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RPM</b>	: Round per minute
<b>SSRI</b>	: Selektif serotonin re-uptake (geri alım) inhibitörü
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>UK</b>	: United Kingdom
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü



## ÖZET

### Kronik Sigara Kullanımının Akciğerde Neden Olduğu Apoptoz Üzerine Kantaron Ekstresinin Koruyucu Rolü

Sigara dumanı maruziyeti birçok dokuda çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Bu tehlikeli durumlarda pek çok apoptotik süreç rol oynamaktadır. Ancak hasarın mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Yaptığımız çalışmada, fare akciğerlerinde sigara dumanı maruziyetinin neden olduğu apoptotik mekanizmaları araştırmayı ve *Hypericum perforatum* ekstresinin potansiyel koruyucu etkilerini değerlendirmeyi amaçladık. Deneysel çalışmada fareler (Swiss albino, erkek, 8 haftalık) kontrol (sigara dumanına maruz bırakılmayan; n=8), sigara dumanına maruz bırakılan grup (n=8) ve *H. perforatum* ekstresi grubu (sigara dumanı maruziyeti ile; n=8; gavaj yoluyla) olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Sigara dumanı uygulaması iki ay boyunca haftada yedi gün devam etti. İki ay sonunda, fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü ve akciğerleri izole edildi. Akciğer dokuları, kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 isimli apoptoz belirleyicilerinin seviyelerini belirlemek amacıyla ELİSA yöntemi kullanılarak çalışıldı. Sigara dumanına maruz bırakılan farelerin akciğerlerinde kaspaz-3 ekspresyonu ve Bax protein seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı ve Bcl-2 seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. Bu bulguların *H. perforatum* uygulaması ile tersine çevrildiği belirlendi. Yaptığımız çalışmada sigara dumanı maruziyetinin apoptoza neden olduğunu ve bunun *H. perforatum* ekstresi tarafından bloke edildiğini gözlemledik. Çalışma, sigara için insanlarda daha fazla gözlenen akciğer hastalıklarının altında yatan patolojik mekanizmaların anlaşılması açısından dikkat çekmektedir. Bu yüzden çalışmamız akciğer fonksiyonlarında apoptozun potansiyel etkisi ve *H. perforatum*' un koruyucu rolünün araştırıldığı ileriki çalışmalar için değerli bilgiler sağlamaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Apoptoz, Fare Akciğer, *Hypericum Perforatum*, Koruyucu Etkiler, Sigara Dumanı

## ABSTRACT

### Protective Effects of St. John's Wort Extract on Apoptosis in Lung by Chronic Cigarette Smoke

Exposure to cigarette smoke causes a variety of damages to human tissues. Many apoptotic processes play important roles in these hazards. Mechanisms of these damages have not been clearly identified yet. In our study we aimed to investigate the underlying apoptotic mechanisms of the cigarette smoke exposure on mice lung tissues and evaluate potential protective effects of *Hypericum perforatum* extract. In experimental study, mice (Swiss albino, male, age: 8 weeks) were divided in three groups as control (without cigarette smoke exposure; n=8), cigarette smoke group (n=8) and *H. perforatum* extract group (with cigarette smoke exposure; n=8; by gavage). The cigarette smoke application continued 7 days in a week during two months. In the end of two months, the mice were killed by cervical dislocation and their lungs were isolated. Lung tissues were studied with ELISA method to determine the levels of determinants of apoptosis namely caspase-3, Bax and Bcl-2. Smoke treatment increased caspase-3 expression and Bax protein levels significantly and decreased Bcl-2 levels in mice lungs. These findings were detected to be reversed with *H. perforatum* extract pretreatment. In our study; we showed that cigarette smoke exposure causes apoptosis and this was shown to be blocked by *H. perforatum* extract. The study might has a contribution for understanding the underlying pathological mechanisms of lung diseases which were observed more in human with cigarette smokers. Therefore this study provides valuable informations for further studies which should investigate both the potential effect of apoptosis in lung function and protective role of *H. perforatum*.

**Key Words:** Apoptosis, Cigarette Smoke, *Hypericum Perfaratum*, Mice Lung, Protective Effects

# 1. GİRİŞ

Akciğerler gaz değiş tokuşunun gerekleştii esansiyel organımızdır. Bu organ oksidatif fosforilasyon için gerekli oksijen absorpsiyonu ve pH regölasyonu için gerekli karbondioksit salımını sağlar. Benzer şekilde toksik gaz değişimi de bu sistem içerisinde gerçekleşir (1).

Sigara içiminin inflamasyondan kansere uzanan çeşitli kronik pulmoner ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (2). Sigaranın en önemli hastalık nedeni olduğu DünyaSağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tanımlanmaktadır. Dünyada neredeyse 5 milyon insan her yıl sigaraya bağlı olarak hayatını kaybetmektedir (3).

Sigara dumanı 4700' ün üzerinde teşhis edilmiş bileşenlerin yer aldığı kompleks bir karışımdır (2). Nikotin, 4-(N-metil-N-nitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazılarının zehirli ve karsinogenik olduğu bilinmektedir (4).

Sigara içilirken vücutta yüksek miktarda serbest radikal ve reaktif oksijen türevleri ortaya çıkmaktadır. Sigara dumanı içerisindeki serbest radikallerin sigara içmenin advers etkilerinin sebebi olduğu pekçok çalışma ile gösterilmiştir. Sigara dumanı lipit peroksidasyonu, protein tiyollerin oksidasyonu ve plazmadaki protein karbonillerin değişikliğine sebep olmaktadır (2). Sayısız birçok makalede sigaranın insan doku ve organlarının hemen hepsinde olumsuz etkilere yol açtığı bilinmektedir (5-9). Epidemiyolojik alışmalar, sigara kullanımının trombozis, ateroskleroz gelişimi, miyokard infarktüsü, vasküler graft başarısızlığı ve koroner arter hastalıklarından ölüme sebebiyet vermesi ile birlikte hipertansiyon ve endotelial disfonksiyonun önemli nedenlerinden olduğunu göstermiştir (10-13).

Sigara kullanımı kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) riskini artırır. A vitamininin azalmasına neden olarak akciğer parankim hücrelerinin yıkımına ve elastikiyetinin azalmasına bağlı bir hastalık olan amfizemin gelişimine neden olur (8). Sigara kullanımı serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi artırır. Artan oksidatif stres nitrik oksit (NO) inaktivasyonu yaparak endotelial disfonksiyona yol açar ve normal koroner damarların kan akımının azalmasına neden olur (9).

Sigara dumanındaki benzopirenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ligand olarak arilhidrokarbon reseptörlerine bağlanarak sitokrom P450 (CYP450) enzimlerinin ekspresyonunu artırır. Bu enzimler çoklu ilaç rezistans ilişkili proteinler ve protoonkogenlerin aktivasyonuna yol açarak potansiyel klonalkanser kök hücrelerinin çoğalmasına ve tümör büyümesine yolaçar (2).

Sigara dumanının arttırdığı oksidatif stres DNA fragmentasyonununa neden olur. Bu da proapoptotik kaspaz-3 enzimi ve Bax proteininin aktivitesini artırıp antiapoptotik Bcl-2 aktivitesini azaltarak apoptoz yolağını aktive eder (14,15).

Yunanca apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinden köken alan apoptoz, ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup, hasarlı veya enfekte hücrelerin diğer hücrelere zarar vermeden kendi kendilerine yok olması olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle diğer bir deyimle “hücre intiharı” olarak nitelendirilebilmektedir (16,17).

Apoptoz; hücre büzüşmesi, kromatin kondensasyonu, intranükleozomal DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize kompleks bir olaylar bütünüdür. Bir sistein proteaz sınıfı olan kaspazların memeli hücrelerinde apoptotik sürecin ana belirleyicisi olduğu düşünülmektedir. Kaspaz ailesinin en yaygın çalışılan üyesi olan kaspaz-3’ ün pekçok proteinin proteolitik ayrılmasından kısmen veya tamamen sorumlu olduğu bilinmektedir (18).

Tanımlanmış 20 farklı üyesi bulunan Bcl-2/Bax gen ailesinin bazı üyeleri apoptoz sürecini başlatırken (apoptotik genler), bazıları bu süreci inhibe etmektedir (antiapoptotik genler) (17).

Apoptotik sinyal alındıktan sonra Bax proteinleri mitokondri zarında değişikliklere yol açar. Böylece sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör gibi mitokondri zarı içindeki faktörler stoplazmaya geçer. Sitoplazmada bulunan Apaf-1’e bağlanan sitokrom c, prokaspazları harekete geçirerek kaspaz aktivasyonunu başlatır (17).

Sigara dumanının ve devamında gerçekleşen apoptozun oluşturduğu bu olumsuz etkilere karşın çalışmamızda kullandığımız bitkinin ( *Hypericum perforatum* Linn.) çeşitli yararları vardır. Türkiye’ de halk arasında “kantaron” ve İngilizce’ de “St. John’ s wort” olarak bilinen *Hypericum perforatum* L., Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Amerika’ dayetişen Hypericaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir (19) (şekil 1.1)(20).



Şekil 1.1. *Hypericum perforatum* L.(Hypericaceae)(20)

Bitki yüzyıllar boyunca tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Hafif- orta dereceli depresyon (21), yara iyileşmesi (akut ve zedelenmiş yaralar) (22), birinci derece yanıklar (22), miyalji (kas ağrısı) (22), mevsimsel duygulanım bozukluğu (23), obsesif kompulsif bozukluk (24), premenstrüel sendrom (25), menapoz (26), pediyatrik noktürnal inkontinens tedavisinde (27) ve analjezik, trankilizan, antihelmintik, ülser iyileştirici ajan (28) olarak kullanılmaktadır.

Bitkinin bileşiminde bulunan naftodiantronlardan hiperisin ve psödohiperisin ile kersetin, hiperin gibi farklı flavonoidler; floroglusinol, uçucu yağlar ve ksantonların antidepresan, antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bitkinin farklı ekstrelerinin de antiviral ve gram pozitif bakterilere karşı

antibakteriyel ajanlar olarak etkili olduğu ve yara iyileştirme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (29).

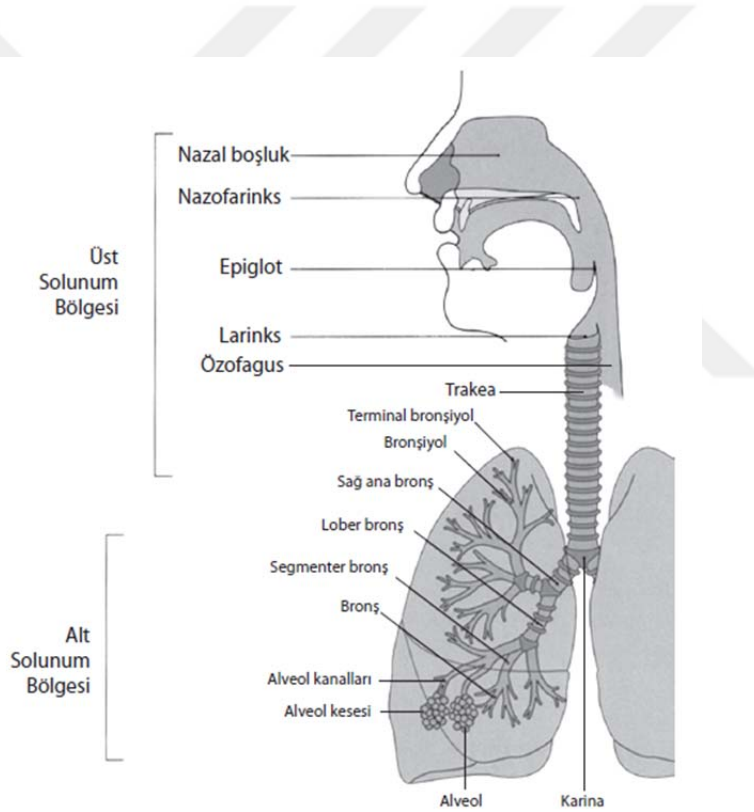
Ayrıca kantaronun biyoaktif maddelerinin apoptoz yolağını düzenlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (30,31). Bu nedenle yaptığımız çalışmada sigara dumanı maruziyetinin fare akciğer dokusunda aktive ettiği apoptotik yolak üzerine, apoptoz düzenleyici rolü olduğu bilinen kantaron ekstresinin nasıl bir etki oluşturacağı ve bu etkinin moleküler mekanizması araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

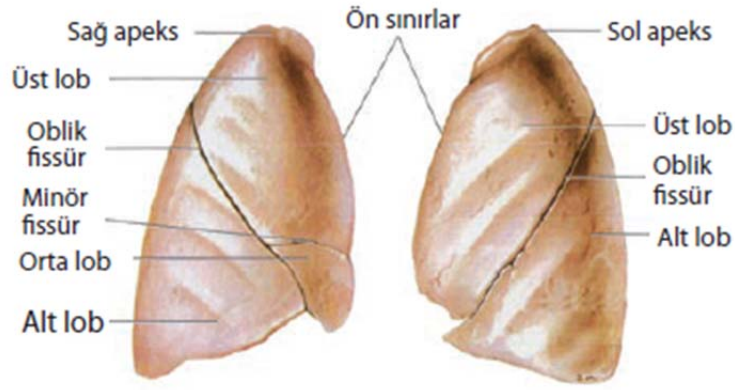
### 2.1. Akciğerler

Solunum sistemi, solunum yoluyla alınan oksijenin kanda metabolizasyon sonucunda oluşan karbondioksitle değiş tokuşunu sağlayan sistemdir. Solunum sistemi farklı iki bölümden ibarettir. Bunlar, üst solunum yolu ve alt solunum yoludur (Şekil 2.1). Alt solunum yolu trakeanın alt bölümü, ana bronş ve akciğerlerden oluşmaktadır. Alt solunum yolu içerisindeki yapılar göğüs boşluğu (toraks) içinde yer alır. Akciğerde bulunan respiratuvar bronşiol, duktus alveolaris ve alveol keseleri gaz alışverişinin yapıldığı solunum alanlarıdır (1,32,33).



Şekil 2.1. Solunum sistemi bölümleri (33)

Akciğerler göğüs kafesinde bulunan mediasten boşluğunun iki yanında yer alır. Mediastinal yapılara hiluslar ile bağlanmışlardır. Hiluslarda akciğere giren ve akciğerden çıkan yapılar; bronşlar, arterler, venler, sinir pleksusları, lenf damarları, lenf bezleri ve pulmoner ligament bulunmaktadır (şekil 2.2). Hilus dışında tüm akciğer yüzeyleri viseral plevra ile kaplı halde serbest olarak bulunur (33).

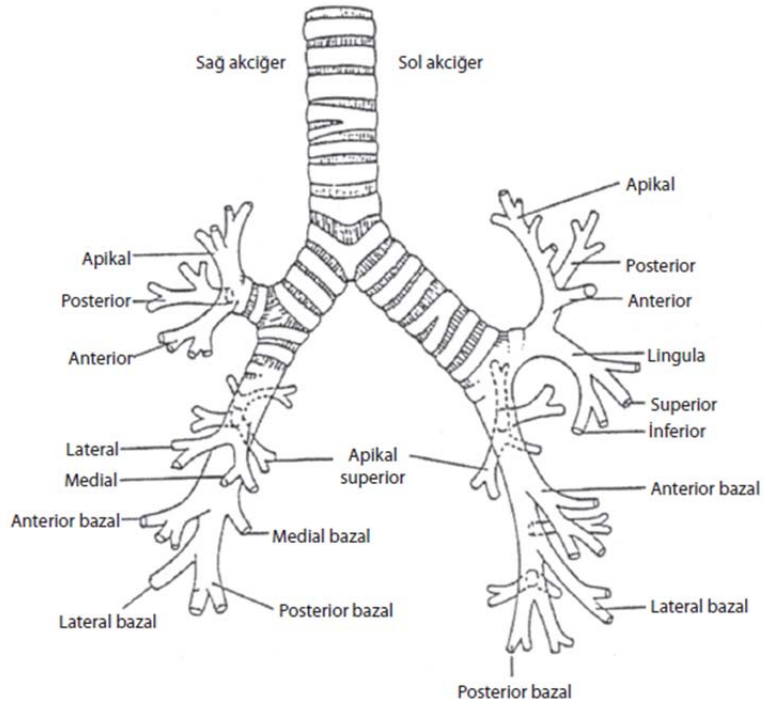


Şekil 2.2. Akciğerlerin dış yandan görünüşü (33)

Akciğerler dış kısımdan merkeze doğru uzanan ve fissür adı verilen yarıklar ile loblara ayrılmıştır. Visceral plevra, akciğerleri ve fissür yüzeylerini örterek lobların birbirinden bütünüyle ayrılmalarını sağlar. Sağ akciğerde oblik (major) ve horizontal (minör) fissürler ile ayrılmış süperior (üst), middle (orta) ve inferior (alt) olmak üzere üç lob, sol akciğerde oblik fissür ile ayrılmış süperior (üst) ve inferior (alt) olmak üzere iki lob bulunur. Sağda horizontal fissür üst lobu orta lobtan, oblik fissür üst ve orta lobu alt lobtan ayırır. Sol akciğerde orta lobun karşılığı olan lingula üst loba aittir. Oblik fissür sol akciğerde üst ve alt lob arasında bulunup, bunları birbirinden ayırır (şekil 2.2). Bazı kişilerde horizontal ve oblik fissürlerin dışında aksesuar fissürler de bulunmaktadır. Azygoz fissürü aksesuar fissürlerin en sık görülenidir (33).

### 2.1.1. Segmenter anatomi

Akciğer lobları bronşların dallanması ile oluşan segmentlere ayrılmıştır. Segmentler tepesi akciğerin merkez (hilus) bölgesinde bulunan ve tabanı akciğerin dış kısmına doğru uzanan, kendi bronşu, atardamarı ve toplardamarı olan piramid biçiminde yapılardır. Segmentler 1-2 santimetre çaplı lobüllerden oluşmuştur. Lobüller ince bir bağ dokusu septasıyla birbirlerinden kısmen ayrılabilen en küçük anatomik birimlerdir. Segmentlerin sayıları ve dağılımları sağ ve sol akciğerde farklılık göstermektedir. Sağ akciğerde on, sol akciğerde sekiz segment bulunur (şekil 2.3). Sol üst lobda bulunan apikal ve posterior segmentler ortak bir bronşa açılırken, kalbe komşu akciğer bölgesinde ayrı bir medial bazal segment bulunmamaktadır (33).



**Şekil 2.3.** Akciğerlerin segmenter anatomisi (33)

Sağ akciğer üst lobunda apikal, anterior ve posterior, orta lobunda lateral ve medial, alt lobunda süperior (apikal), anterior, lateral ve posterior segmentler bulunmaktadır. Segmentlerde bulunan bronşlar, buldukları segmentin adıyla anılmaktadır. Segmentlerin anatomik ve fonksiyonel olarak ayrı birimler olması hastalık durumunda cerrahi olarak çıkarılabilmelerine olanak sağlar (33).

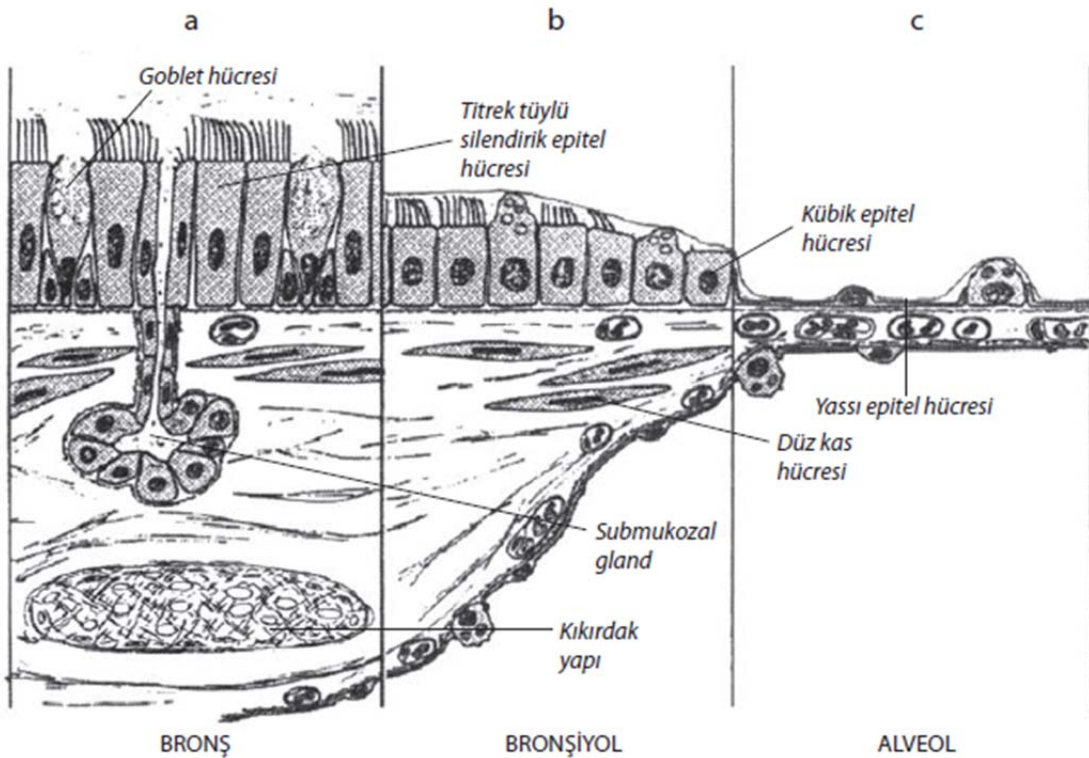
### 2.1.2. Bronş ağacının yapısı

Kıkırdaklar ana bronşların akciğer içi bölümlerinde ve alt lob bronşları etrafında halka şeklini almış olup; periferde düzensiz yapraklar halini alarak, subsegment bronşlarında kaybolur. Bronşlar titrek tüylü yüksek silindirik epitel ile kaplıdır. Lamina propria altında bol miktarda müköz ve seröz submukozal salgı bezleri ve Goblet hücreleri yer alır (şekil 2.4a) (33).

Bronşiyollere doğru gidildikçe, mukoza epiteli ile kıkırdaklar arasında yer alan düz kaslar giderek kalınlaşır, nazofarinksten itibaren solunum yolu mukozasında yer alan Goblet hücreleri giderek azalır ve küçük bronşiyollerden itibaren kaybolur (şekil 2.4b). Bronşiyol duvarında mukoza yüzeyinde yoğun olarak bulunan lenfoid hücrelerin

oluşturduğu mukozayla ilişkili lenfoid doku (BALT), lokal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır (33).

Çapları 1 milimetrenin altında olan bronşiyollerin duvarlarında kıkırdak ve submukozal bez yapısı olmayıp; düz kas tabakası oldukça gelişmiştir. Özellikle astımda bu bölgedeki düz kasların kasılması havayolu obstrüksiyonuna neden olur. Büyük bronşiyoller; titrektüylü silindirik epitel ile kaplanmış durumda iken, terminal bronşiyoller titrektüylü olmayan küboid tipteki epitel hücreleri ile kaplıdır (şekil 2.4c). Terminal bronşiyollerin duvarında Clara hücreleri bol miktarda yer alır. Bu hücreler özellikle ekspiryumda bronşiyal lümenin daralmasını önleyen sürfaktan benzeri madde ve fonksiyonu tam olarak belirlenemeyen özel bir protein (CC16) salgırlar. Ayrıca iyon (Cl<sup>-</sup>) transportunda da etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Respiratuvar bronşiyollerin duvar yapısı terminal bronşiyollere benzer. Bu alanda Goblet hücreleri tamamen kaybolup, Clara hücreleri görülmeye devam eder. Bu düzeyden itibaren gaz alışverişi başlar (33).

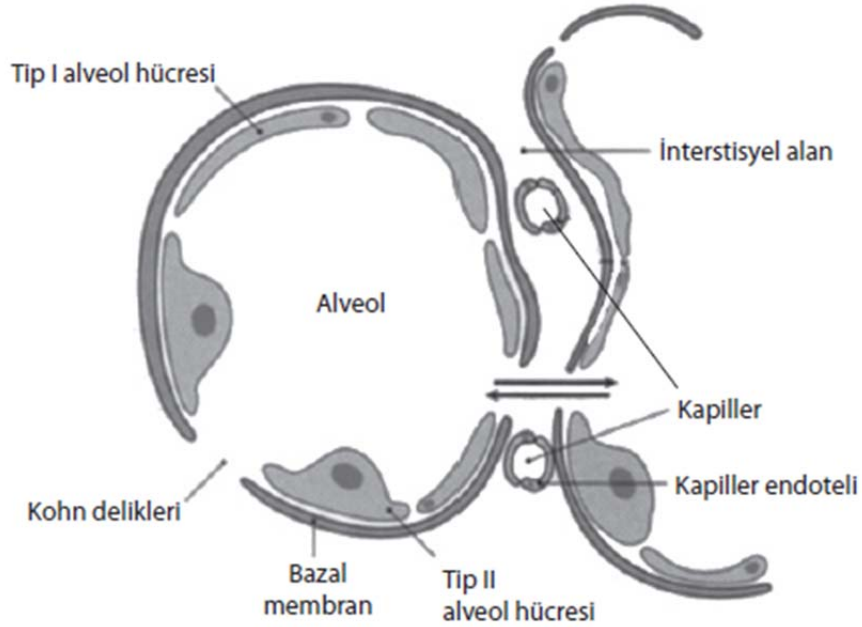


Şekil 2.4. Bronş ağacının yapısı (33)

### 2.1.3. Asinüs, alveolar yapı, interstisyum

Her bir terminal bronşiyolün distalinde asinüs adı verilen terminal solunum üniteleri yer alır. Asinüs ardışık üç dallanma gösteren respiratuvar bronşiyolleri, alveol kanallarını (ductus alveolaris) ve alveol keselerini içerir. Alveol kanalları, duvarlarında düz kas bulunan en uç havayollarıdır. Respiratuvar bronşiyollerden itibaren havayolu duvarlarında bulunan alveollerin sayısı giderek artar; alveol kanallarının yüzeyleri tamamen alveollerle kaplanmıştır. Alveoler kanallar iki veya üç alveol kesesine açılırlar. Doğumda ortalama 50 milyon kadar olan alveol sayısı, erişkinde her bir akciğer için yaklaşık 300 milyona ulaşır. Büyüme-gelişme sırasında alveollerin sayısında ve toplam alveol yüzey alanında genişleme olur. Erişkin bir insanda alveol yüzey alanı yaklaşık 80 m<sup>2</sup> lik bir kapasiteye sahiptir (33).

Alveol yüzeyinin yaklaşık %90-95' i Tip-I yassı epitel hücreleri ile kaplıdır (şekil 2.5). Bu hücreler bazal membran üzerinde örtücü özelliindedir. Alveol yüzeyinin geniş ve alveol-kapiller membranın 0.4 mikron kalınlığında oluşu gaz difüzyonuna olanak sağlar (33).



Sümfaktan, alveol epitelinde iç yüzeyde bulunur ve alveollerdeki hava boşaldığında yüzey gerilimini azaltarak atelektazi oluşumunu önler. Sümfaktanlar aynı

zamanda alveol ve interstisyum arasında sıvı alışverişinin gerçekleşmesini sağlar. Bu etki alveoler ödem gelişimini zorlaştırır (33).

Alveollerde epitelyum hücreleri dışında fagositer makrofajlar ve çeşitli mediyatörler salgılayan mast hücreleri bulunur. Alveoler makrofajlar alveol içine ulaşmış toz partiküllerin ve enfeksiyon etkenlerinin fagositozu yanında, dejenere sürfaktanın alveollerden uzaklaştırılmasını sağlarlar (33).

#### **2.1.4. Akciğerlerin damarları**

Akciğerler pulmoner arterlerle sağ ventrikülden gelen venöz kanı alarak oksijenlenmek üzere kapiller bölgeye taşırken, sistemik dolaşımdan da kendi beslenmesi için gerekli olan arteriyel kanı alır. Akciğer kanlanmasının büyük bölümünü pulmoner arterler karşılar. Bronşiyal arterler inen aorta ve üst interkostal arterlerden kanlanırlar. Bronşlar, bronşiyoller, akciğer içi arter ve venlerin duvarları bronşiyal arterler yolu ile beslenirler. Bronşiyal arterler ayrıca sinirleri, akciğer içi lenf düğümlerini ve bağ dokusu septalarını kanlandırır. Sistemik dolaşımdan kaynaklandıkları için pulmoner arterlere göre daha yüksek basınç gösterirler. Bu nedenle hemoptizilerde önemli role sahiptirler. Bronşiyal venler büyük bronşların ve hiler yapıların venöz drenajını sağlarlar (33).

#### **2.1.5. Akciğerlerin innervasyonu**

Akciğerler parasempatik sinirlerini *nervus vagus*' tan, sempatik sinirlerini ise 2-4. torasik sempatik ganglionlardan gelen dallardan alır. Bu iki sisteme ait dallar, hilusun önünde ve arkasında pleksus yaparlar. Bu pleksustan köken alan lifler arter ve bronşlara eşlik ederek akciğer içinde bir ağ oluşturur. Aferent vagus lifleri, öksürük refleksi ve akciğerlerin inspiyumda gerilmeleriyle ortaya çıkan Hering- Breuer refleksleri ile ilgilidir. Eferent vagus liflerinin stimülasyonu düz kas spazmına, mukus bronş bezlerinden sekresyon artışına ve vazodilatasyona neden olurlar. Eferent sempatik lifler ise inhibitör etki gösterirler. Bronşların ve viseral plevranın temas duyusu aferent sempatik lifler tarafından sağlanmaktadır (33).

### **2.1.6. Ventilasyon-perfüzyon ilişkisi**

Efektif gaz değişimi ventilasyon perfüzyonun meydana geldiği gaz değişim üniteleri ile ilişkilidir. Bu etkin gaz değişimi tüm akciğerdeki eşit dağılım gösteren ventilasyon ve perfüzyon ile meydana gelir. Ancak gerçekte, bu olay normal bir akciğerde eşit meydana gelmez. Çünkü, kan akımı akciğerin değişik bölgelerindeki hidrostatik ve yerçekimi güçlerinden etkilenecek eşit dağılmaz. Aynı şekilde ventilasyon da akciğerin çeşitli bölgelerinde farklılık gösterir(32,33).

### **2.1.7. Difüzyon**

Solunum olayında difüzyon başlıca O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>' nin alveol pulmoner kapiller arasındaki geçişini tanımlar. Bu gazların her birinin difüzyon hızı aynı gazın tek başına ortamda oluşturduğu basınçile doğru orantılıdır. Gazların alveolden kana geçebilmek için alveol duvarı, kapiler duvar, plazma ve eritrosit membranlarını kat etmeleri gerekir. Bu bölgelerin herhangi birinde meydana gelecek bozukluk, difüzyonun o bölgede gerçekleşmesini engeller. Ancak rezervi çok yüksek olan akciğerde gelişecek bölgesel difüzyon bozuklukları klinik duruma hemen yansımaz. (32,33).

## **2.2. Sigara Dumanı**

### **2.2.1. Sigaranın İçeriği**

Sigara dumanı içerisinde farmakolojik olarak etkin4000'den fazla bileşenbulunmaktadır. Bu maddeler antijenik, sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik olarak değerlendirilmektedir. (Çizelge2.1) (34). Sigara dumanı; gaz ve partikül fazı olmak üzere iki faza ayrılmaktadır. Sözkonusu iki fazı tanımlamada Cambridge glass-fiber filtresi kullanılmıştır. Partikül fazı cam fiber filtredengeçen sigara dumanının filtrede kalan kısmı iken, filtreden geçen kısım ise gaz fazı olarak tanımlanmaktadır (35).Partikül fazında, aromatik hidrokarbonlar gibi karsinojenik maddelerin oluşturduğu katran ve çapları 0,1-1 mikron arasında olan çeşitli partiküllerbulunurken, gaz fazında ise birtakım kimyasallar, azot ve hava yer almaktadır (35,36).

Çizelge 2.1. Sigara dumanındaki bazı maddeler(34)

<b>Partikül Fazı</b>	<b>Başlıca etki</b>	<b>Gaz Fazı</b>	<b>Başlıca etki</b>
<b>Tar (katran)</b>	Mutajenik Karsinojenik	<b>Karbonmonoksit</b>	Oksijenin hemoglobine bağlanmasını bozar
<b>Nikotin</b>	Doza bağımlı uyarıcı veya parasempatik kolinerjik reseptörler üzerine depresör	<b>Nitrojen Oksitler</b>	İrritan Proinflamatuar Silyotoksik
<b>Aromatik hidrokarbonlar</b>	Mutajenik Karsinojenik	<b>Aldehitler</b>	İrritan Proinflamatuar Silyotoksik
<b>Fenol</b>	İrritan Mutajenik Karsinojenik	<b>Hidrosiyanik asit</b>	İrritan Proinflamatuar Silyotoksik
<b>Krizol</b>	İrritan Mutajenik Karsinojenik	<b>Akrolein</b>	İrritan Proinflamatuar Silyotoksik
<b>Naftilamin</b>	Mutajenik karsinojenik	<b>Amonyak</b>	İrritan Proinflamatuar Silyotoksik
<b>Benzo(a)piren</b>	Mutajenik Karsinojenik	<b>Nitrözaminler</b>	Mutajenik Karsinojenik
<b>Katekol</b>	Mutajenik Karsinojenik	<b>Hidrazin</b>	Mutajenik Karsinojenik
<b>İndol</b>	Tümör hızlanması	<b>Vinil klorid</b>	Mutajenik Karsinojenik

Sigara içildiğinde ağızdan çekilen duman, ana duman (mainstream) olarak adlandırılırken, sigaranın yanan kısmından yayılan duman ise yan duman (sidestream) olarak adlandırılmaktadır. Çevresel etkilerin yaklaşık %85'i yan duman nedeniyle ortaya çıkmaktadır ve yandumanın toksik gaz içeriği ana dumana göre çok yüksektir(37).

Sigara komponentlerinin hangi hastalıklarla ilişkili olduğu kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu maddelerin farmakolojik özelliklerinden yola çıkılarak elde edilmiş bazı veriler bulunmaktadır. Sigara dumanının heterosiklik hidrokarbonlar, inorganik bileşikler, aldehidler, N-nitrozaminler, radyoaktif elementler, poliaromatik hidrokarbonlar ve uçucu karsinojenler olmak üzere 43 adet karsinojen bileşik içerdiği belirtilmektedir (38-40).

#### **2.2.1.1. Karbonmonoksit**

İnsan sağlığına en zararlı bileşiklerden biri olan karbonmonoksit (CO) sigara dumanının gaz fazında yer almaktadır ve sigara dumanında %3-5 oranında bulunmaktadır. Kanda oksijenin taşınmasını sağlayan hemoglobine, oksijenin 200 katı bir afinite ile bağlanır ve az miktarda karbonmonoksit bile oksijenin dokulara yetersiz dağılmasına neden olur. Hemoglobine bağlanan karbonmonoksiti ifade eden HbCO değerinin %60'ın üzerine çıkması durumunda kişinin hayatta kalması mümkün olmamaktadır. CO sebep olduğu hipoksi nedeniyle kalp kaslarına doğrudan zarar vermektedir (38,41).

#### **2.2.1.2. Azot Oksitler**

Toksik ve aynı zamanda renksiz bir gaz olan NO oksidasyona uğrayarak azot dioksite (NO<sub>2</sub>) dönüşür. NO<sub>2</sub> azot monoksit varlığında nitröz aside dönüşür. Nitröz asitler aminlerle karşılaştığında N-nitröz aminlere dönüşürler ki bu nitröz aminler karsinojendir (38).

#### **2.2.1.3. Aldehit ve Ketonlar**

Sigara dumanında yüksek konsantrasyonlarda bulunan asetaldehitin nikotin ile birlikte kronik kalp hastalıkları ve sinüs taşikardisinin nedeni olabileceği öne sürülmektedir (38).

#### **2.2.1.4. Nitröz Aminler**

Nitröz aminlerin en çok karaciğer, özafagus, solunum sistemi, kolon ve böbrek üzerine kanserojen etkisi söz konusudur (41).

#### **2.2.1.5. Hidrojen Siyanür**

Sigara dumanındaki toksik maddelerden biri olan hidrojen siyanür (HCN) filtreler ile sınırlı uzaklaştırılma kapasitesine sahiptir. HCN derişimi filtresiz sigarada 28-39µg iken, bu değer selülozasetat filtrelerde 24-30 µg, bu filtreye karbon filtre ilave edildiğinde 14µg olarak ölçülmüştür (36).

#### **2.2.1.6. Katran**

Sigara dumanında tümöre neden olduğu tespit edilmiş veya olası karsinojen olan bileşenler polinükleer aromatik hidrokarbonlar ile N-heterosiklik hidrokarbonlardır. Sigara dumanındaki katranın asidik fraksiyonlarının tümör oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (36).

#### **2.2.1.7. Aromatik hidrokarbonlar**

Fare derisi boyama testleri sonucunda; polisiklik aromatik hidrokarbonlardan benzopirenin (3, 4-benzipiren; 3, 4-benzopiren; benzpiren; benzopiren) sigara dumanında bulunan esas karsinojenik maddelerden biri olduğu tespit edilmiştir. Sigara dumanında bulunan benzopirenler, oksidan moleküllerin metabolizmasında rol alan mikrozomal epoksit hidrolaz enzimini arttırarak oksidanmoleküllerin gerektiği kadar ortadan kaldırılmaması sonucu oksidatif hasara neden olmaktadır (42).

#### **2.2.1.8. Nikotin**

İçeriklerinde azot atomu bulunduran alkaloidler bazik doğal bileşiklerdir. 1828'de Rossett ve Reiman tarafından ilk defa tütün yapraklarından elde edilen nikotin (*Nicotiana Tabaccum*), tütün alkaloidlerinin %90'ını oluşturmaktadır. Tütünün gerçek nikotin içeriği % 0,25 olmakla birlikte sigara tütünü % 1-2 nikotin içermektedir (43).

Sigara dumanında bulunan nikotin; katrantanecikleri üzerinden ayrıldığında, hızla akciğer tarafından absorbe edilmektedir. Sigara dumanı inhale edildikten 8 saniye sonra içindeki nikotin beyine ulaşmakta olup, nikotinin plazmadaki en yüksek değeri

25 ila 50 ng/ml'dir (36). Nikotinin yarılanma ömrü kısadır ve absorbe edildikten sonra hızlıca metabolize edilerek, daha uzun yarılanma ömrüne sahip olan kotinine dönüşmektedir. Tütünün bağımlılık oluşmasına yolaçan komponenti nikotin, nikotinic reseptörlere çok yüksek afinite göstermektedir. Nikotinic reseptörler çok çeşitli yapılarda bulunması sebebiyle bu madde, karmaşık farmakolojik etkiler göstermektedir(44). Nikotin, kolinerjik yapıları başlangıçta stimüle ederken sürekli depolarizasyon ve reseptör duyarsızlaşması sonucu bu yapıları felç etmektedir. Düşük dozda, otonomik gangliyonlarda ve adrenal medullada stimülasyon yapmakta ve impuls aşırımını kolaylaştırırken, fizyolojik dozlarda ise nabız artışına, periferik ve koroner vazokonstriksiyona neden olması ve pıhtılaşma üzerine olan etkileri sebebiyle iskemik kalp hastalığı patojenezinde rol almaktadır (45). Ayrıca mukosilyer klerens üzerinde düşük dozda stimulan, yüksek dozda depresan etki göstermektedir (42).

#### **2.2.1.9. Diğer maddeler**

Sigaranın içinde bulunan ağır metallere birisi olan ve toksik etkilere sahip kadmiyumun (Cd) % 70'i sigara içilmesi esnasında sigara dumanına geçmektedir(36).Vücutta bulunan savunma mekanizmaları Cd'nin alveolarmembranlarda oluşturduğu etkiyle baş edememekte ve Cd kalıcı hasarlar oluşturmaktadır.Cd oldukça uçucudur ve toplam sigara Cd içeriğinin çok yüksek bir yüzdesi, sigaradaki diğer birçok toksik metalden daha etkili bir şekilde ana dumana geçmektedir (46).

Cd' nin bir proinflatuar sitokin indükleyicisi ve karsinojen etkisi nedeni ile akciğer ve böbrekler gibi pek çok organ dokularında hastalıklara neden olan bir madde olduğunu öne süren kanıtlar vardır. International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından Grup 1 insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır. Cd' ye maruz kalınması ile böbrek ve prostat kanseri arasında pozitif bir ilişki olduğu kararına varmıştır (46). Cd' nin uzun süreli maruziyeti bu metalin karaciğerde birikmesine neden olmaktadır. Cd hepatositlerin apoptozunu indüklemektedir (47). Bu sebeple sigara dumanının uzun süre solunması karaciğer dokusunda yapı bozukluğuna neden olmaktadır.

Sigaranın endotelde oluşturduğu hasarın başlıca sorumlusu duman ile birlikte inhale edilen metal iyonlarıdır. Bu metal iyonları (demir, bakır) serbest radikal

üretimine sebep olarak oksidatif hasarından olmaktadır. Bu oksidatif hasar, hücre içinde kalsiyum artışına neden olarak kalsiyumla aktifleşen proteazları harekete geçirmekte ve endotel hasarını arttırmaktadır(48-51).

### **2.2.2. Sigaranın Vücut Üzerine Genel Etkileri**

Sigara direkt ölümle sonlanmayan yaklaşık 50 kadar kronik hastalıkla ilişkilendirilmekte olup, akciğer kanseri, KOAH ve periferik aterosklerozun ana nedeni olarak gösterilmektedir. Kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarının ise başlıca sebepleri arasındadır. Ayrıca, tüm kronik akciğer hastalıklarının %80'inden, kalp hastalığı ve kansere bağlı ölümlerin de üçte birinden sorumlu olarak bulunmuştur (52).

Yapılan çalışmalarda sigaranın, hem kadın hem de erkeklerde ani ölüm riskini arttırdığı, günde 20 sigaradan fazla sigara içen bireylerdeki ani ölüm oranının, içmeyenlere göre 5 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir(36). Ayrıca, sigara içenlerin morbidite oranı da içmeyenlere oranla daha yüksektir. Sigara içenler, yüksek morbidite oranları sebebi ile içip bırakanlara veya hiç içmemişlere göre günlük aktiviteden daha fazla yoksun kalmakta; daha fazla iş gücü kaybına maruz kalmaktadırlar. Sigara içmeye ergenlik çağına başlayıp, uzun süre sürekli sigara içen bireylerin yarısı sigaradan hayatını kaybetmekte ve bu ölümlerin yarısı da orta yaşlardagörülmektedir (52).

#### **2.2.2.1. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri**

Sigara, KOAH gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Amerika'da ve diğer gelişmiş ülkelerde KOAH gelişiminden %80-90 oranında sigara sorumlu tutulmaktadır. Tüm sigara kullanıcılarının %50'sinde kronik bronşit, %15-20'sinde ise KOAH geliştiği bildirilmektedir(53,54). KOAH gelişiminde, partikül ve gaz fazındaki maddelerin etkisi ile proteolitik enzimlerin aktive olması, immün mekanizmaların bozulması ve mukosilyer klerensin inhibisyonu etkili olmaktadır (55). Sigara, alt solunum yollarında peribronşiyal inflamasyon ve fibrozis, epitel yapı ve fonksiyonunda değişiklikler, vasküler intimal kalınlaşma ve alveoler harabiyet gibi patofizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. (52).

Genel olarak sigara içenlerin 1. saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm (FEV1) değerleri daha düşük, FEV1 azalma hızı daha fazla olmaktadır. Bu iki etki de doza bağlı olarak gelişmektedir ve kadında erkeğe göre daha fazla görülmektedir. Sigara içmeyen

ve herhangi bir akciğer hastalığı olmayan sağlıklı bireylerde, 35 yaşından itibaren, FEV1 değeri her yıl yaklaşık 25-30 ml düşüş gösterirken, sigara içenlerde ise bu değer yaklaşık 60ml olabilmektedir. Bazı sigara kullanan bireylerde ise bu kayıp 150ml' ye kadar ulaşabilmektedir (56). Akciğer fonksiyonlarındaki hızlı kaybı önlemenin önemli yolunun sigaranın bırakılması olduğu gösterilmiştir (36).

Sigara, A vitamininin azalmasına neden olarak akciğer parankim hücrelerinin yıkımına ve elastikiyetinin azalmasına bağlı bir hastalık olan amfizemin gelişmesine neden olur (8).

Üç hafta boyunca sigara dumanı maruziyetinden sonra yüksek derecede duyarlı AKR farelerin akciğerleri ile hafif derecede duyarlı C57BL/6 farelerin akciğerlerindeki fokal adhezyon kinaz (FAK) aktivasyonu karşılaştırılmıştır. Üç haftalık sigara dumanı maruziyeti AKR farelerde hafif amfizeme neden olmuş ve akciğer endotelial hücre apoptozunu arttırmıştır. Ancak C57BL/6 farelerde değişim olmamıştır. Bu sonuçlarla ilişkili olarak, AKR farelerinin akciğerlerinde FAK aktivitesi azalırken, C57BL/6 farelerde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca FAK inhibisyonu akciğer endotelial hücre apoptozuna neden olurken FAK' ın artmış ekspresyonu sigara dumanı indüklü akciğer endotelial hücre apoptozunu önlemiştir (57).

2017 yılında yapılan bir çalışmada deoksiribonükleaz 1 (DNAaz)' in akciğerlerde sigara dumanı maruziyetinin patojenik etkilerini azaltmada potansiyel bir terapötik ajan olup olmadığı araştırılmıştır. Sigara dumanı amfizem patojenesinde anahtar rol oynayan proteazların aşırı üretimi ile proteaz dengesizliğine sebep olmaktadır. Bu etkiden sorumlu mekanizmalar tam olarak belirlenmemiştir. Bu çalışma ile in vivo ve in vitro ortamda sigara dumanının patojenik proteazlar, nötrofil elastaz ve matris metalloproteinazlar 9 ve 12' nin ko-ekspresyonu ile ekstraselüler nötrofil ve makrofajların ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Sigara dumanına verilen bu cevap makrofaj sayısını ve akciğer proteolizisini anlamlı şekilde azaltan DNAaz 1 ile belirgin olarak azalmıştır (58).

Yapılan çalışmalarda, sigara dumanına maruziyetin astım hastalığında önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir. Sigaranın, sistenil lökotrien sentezini arttırdığı ve bunun da astım ve kardiyak iskemi ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (59).

Sigara dumanı akciğer ve diğer organlarda kanser gelişimi için büyük bir risk faktörüdür. Sigara dumanı maruziyeti semikinon ve *p*-benzosemikinon gibi suda

çözünebilir oksidanların dolaşım sistemine geçmesiyle proteinlerde, lipidlerde ve DNA' da oksidatif hasara sebep olur. Artan oksidatif stress hücreyi kanser gelişimine götürür (60).

2013 yılında yapılan bir çalışmada direk olarak sigara dumanına maruziyetin iki tip fibroblastta kaspaz- 3'ü aktive edip etmediği araştırılmıştır. Bunun için fetal akciğer fibroblastı ve yetişkin periodontal ligament fibroblastı izole edilmiştir. Hüceler 60 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda sigara dumanına maruz bırakılmıştır. Fetal akciğer fibroblast hücrelerinde sigara dumanı ekstresinin kaspaz- 3 aktivitesini belirgin derecede arttırdığı ve hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Periodontal ligamentlerde aktivite veya canlılıkta herhangi bir değişim olmamıştır. Hamilelik sırasında sigara içme fetal akciğer gelişim programını değiştirebilmekte ve doğumda akciğer maturasyonunu hızlandırmak için gerekli kritik hücresel mekanizmaların düzenini bozmaktadır. Nitekim çalışmada sigara dumanı fetal rat akciğerinde apoptozda anahtar nokta olan kaspaz 3'ü aktive etmiştir (14).

Sigara dumanı ekstresinin alveolar tip-2 hücreler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada altta yatan mekanizmalar araştırılmıştır. Sigara dumanı ekstresi tip-2 epitel hücrelerinde endoplazmik retikuluma özgü proapoptotik faktör CHOP ve kaspaz-12 ekspresyonu ile JNK proliferasyonunu arttırmıştır. Ekstre endoplazmik retikulum stress sinyalizasyonunu aktive etmiş ve PERK, eIF2 $\alpha$  ve IRE1 fosforilasyonunu arttırmıştır. Daha da ötesi, sigara dumanı ekstresi tip-2 epitel hücrelerde endoplazmik retikulum ilişkili degradasyonda anahtar faktör olan Hrd1 ekspresyonunu azaltmıştır. Hrd1' in yok edilmesi apoptozu iki kattan fazla arttırmaktadır. Aşırı üretimi ise sigara dumanı indüklü tip-2 epitel hücrelerinde apoptozu azaltmıştır (61).

#### **2.2.2.2. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri**

Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir risk faktörüdür. Çalışmalar, sigara kullanımının trombozis, ateroskleroz gelişimi, miyokard enfarktüsü, vasküler graft başarısızlığı ve koroner arter hastalıkları ile birlikte hipertansiyon ve endotelial disfonksiyonun önemli nedenlerinden olduğunu göstermektedir (10-13). Sigara kullanımının aterosklerotik olayları kötüleştiren ve kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditeyi arttıran fizyolojik, patolojik ve metabolik faktörlerle ilişkili olduğunu kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır. Günde 25 ve daha fazla sigara

içenlerde, içmeyenlere göre koroner kalp hastalığına bağlı mortalitenin 2-3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir(36).

Birçok prospektif çalışmada hem kadın hem erkek sigara kullanan bireylerin miyokard enfarktüsü, tekrarlayıcı kalp atakları, koroner arter hastalığına (KAH) bağlı ani ölüm risklerinin daha fazla olduğu gösterilmektedir. KAH'a bağlı ölüm riski, günde içilen sigara sayısı, inhalasyon derinliği, sigaraya başlamayaşı ve içilen yıl sayısı ile ilişkilendirilmektedir(52).

Sigara akut ve kronik olarak miyokarda değişikliklere neden olmaktadır. Akut olarak, myokardınoksijen ihtiyacını artırıp veya myokarda oksijen sunumunu azaltarak miyokard iskemisine yol açabilmektedir. Sigara ayrıca başta ventriküler fibrilasyon olmak üzere disritmilere ve ani ölümlere sebep olabilmektedir. Kronik olarakise, tekrarlayan endotel hasarına yol açarak koroner ateroskleroza neden olmakta; düz kas proliferasyonunu stimüle ederek trombosit adherensini artırmaktadır (52).

Birçok çalışmada sigaranın hem kadın, hem erkekte inmelere yol açtığı gösterilmiştir. Sigara içenlerdeki inme riskinin içmeyenlere oranla 2 kat fazla olduğu ve bu riskin doza bağlı ve gençlerde daha belirgin olduğu bildirilmektedir (52).

#### **2.2.2.2.1. Patofizyolojik etkiler-Sigara kullanımı ve ateroskleroz**

Sigara dumanında 4000' den fazla olduğu tahmin edilen kimyasal bileşenin birçok kardiyovasküler etkisi söz konusudur(36). Bu maddelerin,ateroskleroz gelişimine ve progresyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Sigaranın vasküler endotelde hasar meydana getirdiği ve bu hasarın ateroskleroz gelişiminde başlıca sebep olduğu gösterilmiştir(62,63). Sigara dumanının etkisinde kalan arteriyel endotelde çeşitli morfolojik değişikliklerin meydana geldiği bildirilmektedir (64). Son araştırmalarda da endotel hücre hasarı ile aterosklerotik hastalıkların direk ilişkili olduğu öne sürülmüş ve endotelial geçirgenlikteki artışın aterosklerotik hastalıkların gelişiminde öncü rol oynadığı gösterilmiştir (65-67).

#### **2.2.2.2.2. Fizyolojik etkiler**

Sigara dumanı inhalasyonunun ve nikotin maruziyetinin,kanıtlanmış hemodinamik etkileri bulunmaktadır. Akut fizyolojik etkiler son inhalasyondan yaklaşık 15 dakika sonra başlar. Başlıca etkiler; sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile

ilişkili olarak kalp hızı, kan basıncı, kardiyak outputta artış ve bunların sonucu olarak miyokardiyal oksijen ihtiyacının artması olarak görülmektedir (36).

Bu fizyolojik değişikliklerin başlıca etkeninin nikotin olduğu düşünülmektedir. Nikotin adrenal medulla ve diğer kromofin dokulardan epinefrin, hipotalamus ve adrenerjik sinapslardanda norepinefrin salınımını uyarmaktadır. Böylece periferik direnç ve arteryel basıncı arttırmaktadır. Kalp hızı da, katekolamin salınımı ve direkt kronotropik etkiler ile artmaktadır (36).

CO, sigara dumanının %3–6' sını oluşturmaktadır. Karbon monoksit hemoglobine yüksek afinite ile bağlanmakta ve karboksihemoglobin seviyelerini arttırmaktadır. Böylece kanın oksijen taşıma kapasitesini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda CO maruziyetinin düşük seviyelerde bile miyokardiyal iskemiye daha da kötü hale getirdiği gösterilmektedir (36).

#### **2.2.2.2.3. Hematolojik Etkiler**

Tromboz oluşumunun, kardiyovasküler hastalıklara zemin hazırlayan başlıca neden olduğu bilinmektedir. Koroner arter trombozu ile ilişkili olan hematolojik faktörler; değişmiş prostaglandin üretimi, platelet aktivasyonu, fibrinojen ve plazminojen düzeyleri ve hemoglobinin azalmış oksijen taşıma kapasitesi olarak sıralanabilir. Platelet aktivasyonunun, tromboz oluşumunun başlatılmasında ve platelet kaynaklı faktörlerin ateroskleroz gelişimindeki rolüne bağlı olarak vasküler sendromlarda primer rol oynadığı düşünülmektedir.

Sigara kullanımı akut dönemde platelet agregasyonunu artırırken, kronik süreçte platelet aktivitesini ve yaşam süresini etkilemektedir (68,36). Çalışmalar sigara dumanının, endotelde prostasiklin üretimini azalttığını göstermiştir ve bu durum in vivo olarak artmış tromboz oluşumunu açıklayabilir. Sigara maruziyetine bağlı olarak platelet ömrü kısalmaktadır ve bunun platelet aktivasyonunun indirekt göstergesi olduğu düşünülmektedir (36).

Prostasiklin platelet agregasyonun potansiyel bir inhibitörüdür. Sigara akut ve kronik olarak siklooksijenaz inhibisyonu yaparak prostasiklin inhibisyonuna ve trombosit agregasyon riskinde artışa sebep olmaktadır. Ayrıca, sigara maruziyeti plateletlerden, düz kas hücre proliferasyonunu ve miyositlerin intimaya migrasyonunu artıran faktörlerin salınımına sebep olmaktadır. Tromboz oluşumunda rol oynayan diğer

hematolojik faktörler de sigara ile ilişkilendirilmektedir. Sigara kullanımı ile birlikte plazma viskozitesi ve fibrinojen düzeyleri artmakta, kırmızı hücre elastikiyeti ve plazminojen düzeyleri azalmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki bu değişiklikler vasküler sistem hastalıklarının gelişimini hızlandırmaktadır(36).

#### **2.2.2.2.4. Metabolik Etkiler**

Sigara kullanımı, ateroskleroza artıran lipoprotein dağılımında gerçekleşen değişimler ve diğer metabolik faktörler ile ilişkilendirilmektedir. Sempatik sinir sisteminin nikotin ile uyarılması sonucu plazma serbest yağ asitleri ve çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) artmakta, kolesterol ve trigliserit metabolizmasında rolü olan lipoprotein lipaz da etkilenerek lipoprotein metabolizmasında indirekt olarak etkilenmektedir (36). Sigara yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyesini de düşürerek bu lipoprotein antiaterojenik etkinliğini azaltmaktadır(69,70). Ayrıca, sigara kullanımının artmış obezite riski ile ilişkisi bulunmaktadır (71). Bu metabolik etkiler, sigaranın kardiyovasküler etkileri ile de doğrudan ilişkilidir(36).

#### **2.2.2.3. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri**

Sigara içme ağız, özofagus, pankreas kanserleri ve kolorektal kanserler için risk faktörüdür. Pankreas kanseri sigara içenlerde içmeyenlere göre 2 kat daha sık görülmektedir. Mide, duodenum ülserleri ve Crohn Hastalığı gelişme riski sigara içimi ile artış gösterir. Sigara içmeyi bırakan hastalarda bu hastalıkların prognozu, bırakmayanlarla kıyaslandığında düzelmektedir ( 52).

#### **2.2.2.4. Bebek ve Çocuk Sağlığı Üzerine Etkileri**

Gebelik sürecinde sigara kullanımının erken doğumların %14' üne ve tüm bebek ölümlerinin %10' una neden olduğu, bebeklerin ortalama 200-250 gr daha hafif doğduğu bildirilmektedir. Ayrıca, nikotin anne sütüne geçmektedir ve bu durum sigara kullanan annelerin bebeklerini daha kısa süre emzirmesine sebep olmaktadır(52).

Gebelikte sigara kullanımı, bebek ve çocuklarda görülen astımla da ilişkilendirilmektedir (52). Sigara dumanına maruziyet ve astım ilişkisinin, 0-5 yaşları arasında 4331 çocuk ile değerlendirildiği bir çalışmada, günde en az yarım paket sigara

içen annelerin çocuklarında 2.1 kat daha fazla astım görülme riskinin olduğu; ilk yaşta ise bu riskin 2.6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Sigara ve atopi ilişkisi de gösterilmiş olup; anneleri sigara içen çocuklarda cilt testlerinde allerji daha sık saptanmış; ebeveynleri sigara içen erkek çocukların kan IgE ve eozinofil düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (52).

Son çalışmalarda gebelikte sigara kullanımının rezidüel gelişimsel sonuçları olduğu da gösterilmiştir. Akciğer fonksiyonlarında görülen eksiklikler, erken infant döneminde hırıltılı solunum, çocuklukta somatik büyüme geriliği, standardize testlerde zekada ve davranışlarda bazı bozukluklarduman maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir (52).

#### **2.2.2.5. Kadın Sağlığına Etkileri**

Sigara kullanan kadınlarda infertilite oranının kullanmayanlara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (52). Gebelik sürecinde sigara içen kadınlarda spontan düşük ve plasenta previa, plansental ayrılma ve membranların erken yırtılması gibi gebelik komplikasyonlarının görülme ihtimalinin daha sık olduğu gözlemlenmektedir (52).

Sigaraya bağlı intrauterin büyüme geriliği önemli bir sağlık sorunu olup; birçok nedene bağlı olarak perinatal mortalite artışına sebep olmaktadır. Ayrıca, sigara içen kadınlarda amenore, adet düzensizliği ve dismenore risklerinin daha fazla olduğu bilinmektedir ve sigara kullanan kadınlarda menopoza; ortalama olarak 1-2 yıl daha erken başlayabilmektedir (52).

#### **2.2.2.6. Kemik Yoğunluğu ve Kırık Riski**

Menopozda kemik yoğunluğunun, sigara içen kadınlarda hiç içmemişlere oranla daha düşük olduğu; kalça kırığı riskinin ise sigara içenlerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (52).

#### **2.2.2.7. Diğer Sağlık Sorunları**

Sigara kullanımı, erken yaşta yüz bölgesinde kırışıklıklar oluşması, kadınlarda osteoporoz, erkeklerde seksüel disfonksiyon ile ilişkilendirilmektedir. Graves Hastalığı, katarakt, maküler dejenerasyon, dejeneratif disk hastalığı, anksiyete ve uyku

bozuklukları ve depresyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Romatizmal hastalıklarda da sigara kullanımında akciğer tutulumu riski daha fazla olmaktadır (52).

Sigara, yol açtığı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların etkisini değiştirebilmektedir. Sigara dumanında bulunan bazı maddeler karaciğer enzimlerini indükleyerek ilaçların metabolizmasını hızlandırıp etkinliğini azaltırlar. Örneğin, KOAH'da kullanılabilecek olan yarılanma ömrü sigara kullananlarda %50 kısalmaktadır. Antiaritmikler, steroidler, antikoagülanlar, insülin gibi ilaçların metabolizmaları da sigara kullanımından etkilenmektedir. Bu nedenle kronik hastalıkların tedavileri sigara kullanımı ile zorlaşmaktadır (52).

Yüksek doz intragastrik nikotin uygulamasının mukozal prostaglandin E2 sentezini azaltırken fosfolipaz A<sub>2</sub> ve total fosfolipid seviyesini değiştirmediği bildirilmektedir (72).

Sigara dumanı reaktif oksijen ürünlerini artırarak mitokondrinin işlevlerini bozmaktadır. Bununla birlikte ısı şok proteinleri ve bazı inflamatuvar ajanların gen transkripsiyonlarının artmasına neden olmaktadır (73). Ayrıca artan oksidatif stres Rho Ave FAK aktivitesini azaltarak endotel hücrelerinin fonksiyonunu bozmaktadır (74). Artan oksidatif stres ve antioksidan sistemlerin bozulmasıyla reaktif oksijen ürünleri, NO inaktivasyonu sonucu endotel disfonksiyona neden olmaktadır. Oluşan reaktif oksijen ürünleri eNOS/NO yolağını bloke ederek endotel hücrelerinin fonksiyonunu bozmaktadır (75). Sigara dumanı vazoproliferatif ajanlar olan endotelin ve vasküler endotel büyüme faktörü gibi mediyatörlerin artmasına yol açmaktadır (76).

### **2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem**

Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan, hücre metabolizmasındaki tepkimeler sırasında ortaya çıkan, kısa ömürlü, kararsız ve oldukça reaktif atom veya moleküllerdir (77). Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT); hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), hipokloröz asit ( $\text{HOCl}$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), “singlet” oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), nitrik oksit radikali ( $\text{NO}\cdot$ ) gibi serbest radikaller ve süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ ) ile hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve nitroz asit ( $\text{HNO}_2$ ) gibi serbest olmayan radikaller, oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluşturur(78). Normal aerobik solunum, uyarılmış polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve peroksizomlar, hücreler tarafından üretilen

oksidanların çoğunun temel iç (endojenöz) kaynaklarıdır. Dış (ekzojenöz) kaynaklar ise sigara, iyonize radyasyon, organik çözücüler ve böcek zehirlerini içermektedir (79). Fizyolojik şartlarda hücrede mitokondriyal solunum, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için kullanılan serbest radikaller, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına yol açarlar (16). Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna neden olur. Oksidasyon sadece lipitlere etki etmez. ROT ve RNT, mutasyonlara yol açan DNA hasarına sebep olabilir. Bunlar büyük hücresel birimlerin hasarına neden olabilirler. Kanserin birçok formunun, kardiyovasküler hastalıklar, malarya, sonradan kazanılmış bağışıklık bozukluğu sendromu (AIDS), felç ve yaşlanma gibi 100' den fazla durum ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (79).

Hücre, serbest radikaller ve ilgili reaktanların oluşturduğu hasardan kendini korumak ve ROT' u hızlı ve etkili bir şekilde uzaklaştırmak için bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Serbest radikalleri nötralize ederek uzaklaştıran bu savunma sistemine antioksidan savunma sistemi denir. Vücudun endojen kaynaklı antioksidan savunma sistemi transferrin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit, albumin gibi antioksidan proteinler ile vücudun asıl antioksidan savunma sistemini oluşturan süperoksitdismutaz (SOD), katalaz(CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik antioksidanlardan oluşmuştur. Ekzojen kaynaklı antioksidan sistem ise C vitamini, E vitamini,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten gibi maddeleri içermektedir (77,78). Hücre içinde gerçekleşen en önemli savunma mekanizması glutatyon (GSH) sistemidir. Bir tripeptit olan GSH' ın ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) ROS süpürücüsü olmasının yanı sıra hücre içi redoks döngüsünün düzenlenmesinde de fonksiyonu vardır. Sistem GSH, GSH-Px ve GR içerir. GSH-Px,  $H_2O_2$ ' yi ve diğer peroksidazları indirgeyerek GSH' ı okside disülfid formu olan GSSG' a çevirir. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile GSH' a indirgenir. Hücrenin yeniden GSH oluşturma yeteneği, oksidatif stresin yönetiminde bu hücrenin verimi açısından önemli bir faktör olabilir (78,80).

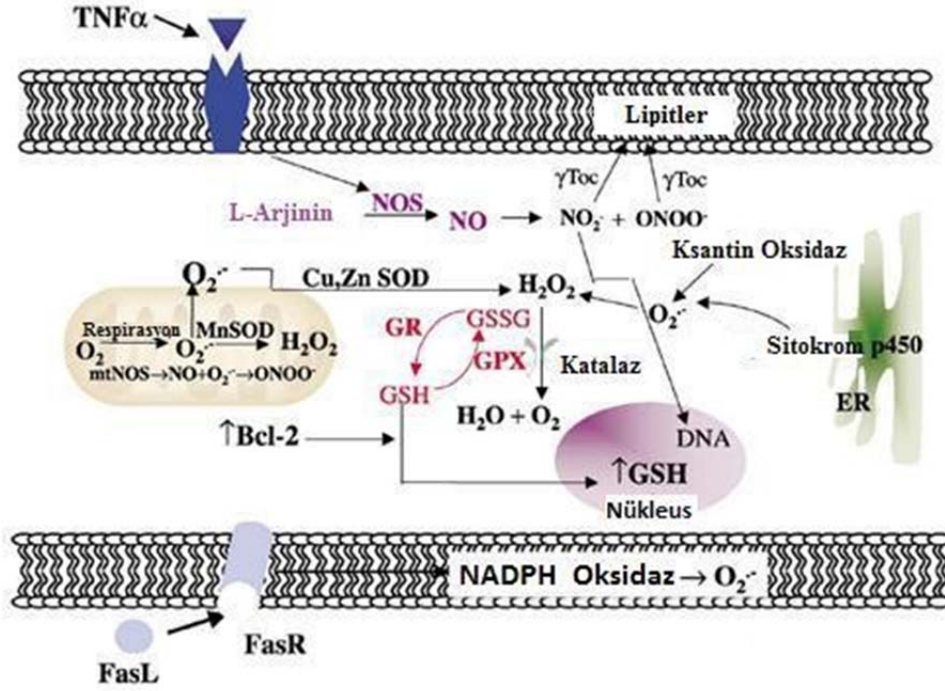
$O_2^-$  aerobik metabolizma sonucu  $O_2$ ' nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur ve oksidan hasar sonucu artan SOD enziminin katalizlemesi ile yüksek derecede toksik olan  $H_2O_2$ ' ye indirgenir (16).  $H_2O_2$  hücredeki temel ROT' dur. Düşük düzeyleri apoptoza neden olurken, yüksek düzeyleri ise nekroz veya kaspaz bağımsız apoptoza

neden olur.  $H_2O_2$ , ya CAT veya GSH-Px enzimleri ile toksik olmayan su ve moleküler oksijene dönüştürülür ya da ferröz demir gibi geçiş metallere varlığında kendiliğinden oluşan bir reaksiyon ile lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerle etkileşerek onları hasara uğratan oldukça toksik  $\cdot OH$  radikale dönüşür (78,80).

Antioksidan/oksidan etkileri bilinen NO' nun mekanizması tam olarak bilinmemektedir.  $O_2^{\cdot -}$  radikali ile NO aynı yerde ve aynı oranda bulduklarında, güçlü bir oksidan molekül olan ONOO $^-$  oluşumu aracılığıyla lipit peroksidasyonuna neden olur. Bunun yanı sıra aşırı miktardaki NO düzeyleri ise ortamda bulunan  $O_2^{\cdot -}$  ve lipit peroksit radikallerini etkisizleştirir ve SOD' u etkin hale getirir ve NADPH oksidaz veya sitokrom P450 gibi  $O_2^{\cdot -}$  kaynaklarını inhibe ederek oksidatif strese karşı koruma da sağlayabilir (16).

NF- $\kappa$ B, p53 ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin de yine reaktif oksijen radikalleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir. Öldürücü düzeyin altındaki ROS üretimi sinyal ileti yollarına müdahale eder. ROS' lardan özellikle  $H_2O_2$  anjiotensin, inflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok farklı fizyolojik uyarı için ikincil mesajcı olarak görev yaparlar (16).

Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkan ve doku hasarına neden olan bir durumdur (77). Artmış hücrel oksidatif stres hücre içi redoks dengesini değiştirir ve birçok reaksiyonu tetikler. Oksidatif stres; gen transkripsiyonu, sinyal ileti yollarının başlatılması ve DNA hasarının tamiri gibi farklı birçok biyolojik yanıtın oluşumunu uyarır. Oksidatif stres altında mitokondriyal fonksiyonların durdurulduğu durumlar sonucu oluşan bu uyarılar ile hücre ya nekroz ya apoptoz veya yaşlanmaya doğru gider ya da canlılığını korur ve çoğalır (16). Bu hücrel cevapların boyutu hücrel genetik alt yapıya, spesifik ROS' lara, oksidatif stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişir (Şekil 2.6) (16).



Şekil 2.6. Oksidatif stres ve antioksidan sistem (78)

Oksidatif stresin astım, diabetes mellitus, romatoid artrit, hipertansiyon, hepatit, ateroskleroz, miyokard infarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile kanser ve AIDS gibi pek çok hastalığın patojenezinde rol aldığı düşünülmektedir (16).

## 2.4. Apoptoz

Her hücrenin doğup, çoğalıp (proliferasyon), farklılaşıp (diferansiasyon)ölmesi (apoptoz) bir denge halinde sürdürülmektedir. Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden ölmesi anlamına gelmektedir (81). Eski Yunancada apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle meydana gelmiş ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir kelimedir (82). Doku homeostazı yani yeniden yapım ve yıkımın bir denge halinde olması, apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlı olarak devam etmektedir (17).

Canlılarda apoptoz; embriyojenez, gelişme, homeostaz, yenilenme ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunmasında ve organların patofizyolojisinde kritik önem taşımaktadır (83). Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü bulunmaktadır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bazıları sadece birkaç saat yaşamaktadır. Deri, gastrointestinal sistem ve immun sistem gibi pek çok dokuda devamlılık, apoptoz ve hücre yenilenmesine bağlıdır (81).

Hücre ölümüne dair ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle elde edilmiş ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. Apoptoz tanımı ise ilk kez İskoçyalı Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış olup, canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (16). Apoptozun gelişim biyolojisinde, normal doku yıkımlarında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi hızla artmıştır (83).

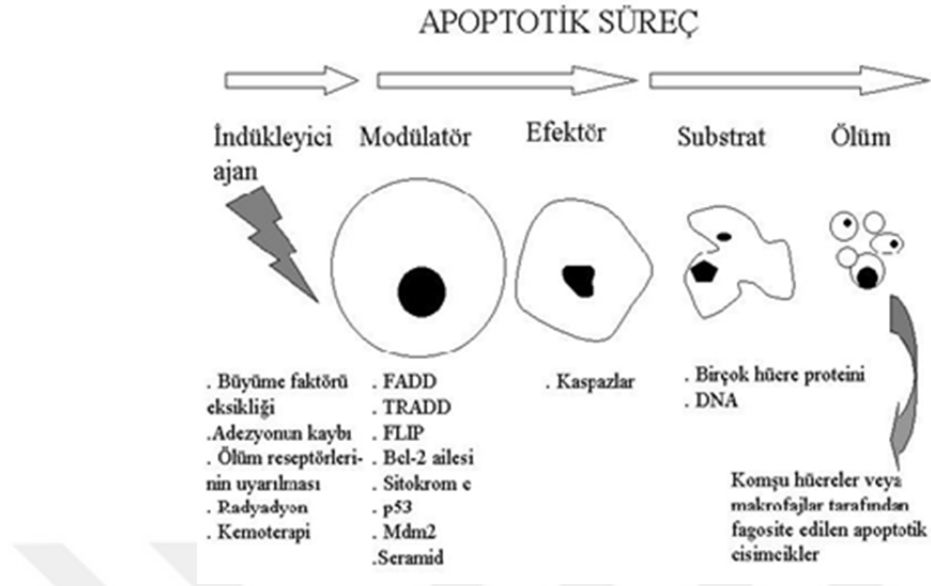
İnsan vücudundaher saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptoza uğrarken, yerine yenileri inşa edilmektedir. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptoz) arasındaki dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patojenezisinde rol oynamaktadır. Apoptozun gereksiz yere oluşması ya da hızlanması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS'de görülen lenfositöyetersizliğine, insüline bağımlı tip diyabete, hepatit C enfeksiyonuna, miyokard infarktüsüne, ateroskleroza neden olurken; apoptozun azalması ise maligniteye ve otoimmün hastalıklara neden olabilmektedir (82).

#### **2.4.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları**

Apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyretmektedir. (şekil 2.7) (82).

Bu aşamalar;

- I.** Apoptozun başlatılması
- II.** Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- III.** Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
- IV.** Fagositoz, olarak özetlenebilir.



Şekil 2.7. Apoptotik süreç(82)

### 2.4.1.1. Apoptozun Başlatılması

#### 2.4.1.1.1. Apoptoz Yolakları

Otonomik veya programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozda birbirini takip eden süreçlerin hangileri olduğu tam olarak bilinmemektedir. Mekanizması tam olarak bilinmese de apoptoz, çeşitli hücre içi veya hücre dışı sinyallerle başlamaktadır (84,85). Apoptoz mekanizması için, memeli hücrelerinde tanımlanmış olan iki yolak bilinmektedir. Bunlardan birincisi hücre zarında bulunan reseptör aracılı sinyal yolağı, diğeri ise mitokondriden salınan sitokrom c' nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yolağıdır. Bu yolaklardan ölüm reseptörleri ilişkili olana “ekstrinsik yolak” denir. Kaspaz aktivasyonu için gerekli kaspaz aktivatör proteinlerinin sitozole salınmasından sorumlu olan, mitokondrinin de katıldığı diğeri yolak ise “intrinsik yolak” olarak bilinir (86,87,88).

Bunların dışında literatürlerde fazla tanımlanmayan ve nasıl oluştuğu tam olarak bilinmeyen Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptoz mekanizması da bulunmaktadır (89).

#### 2.4.1.1.1.1. İntrensik Yolak

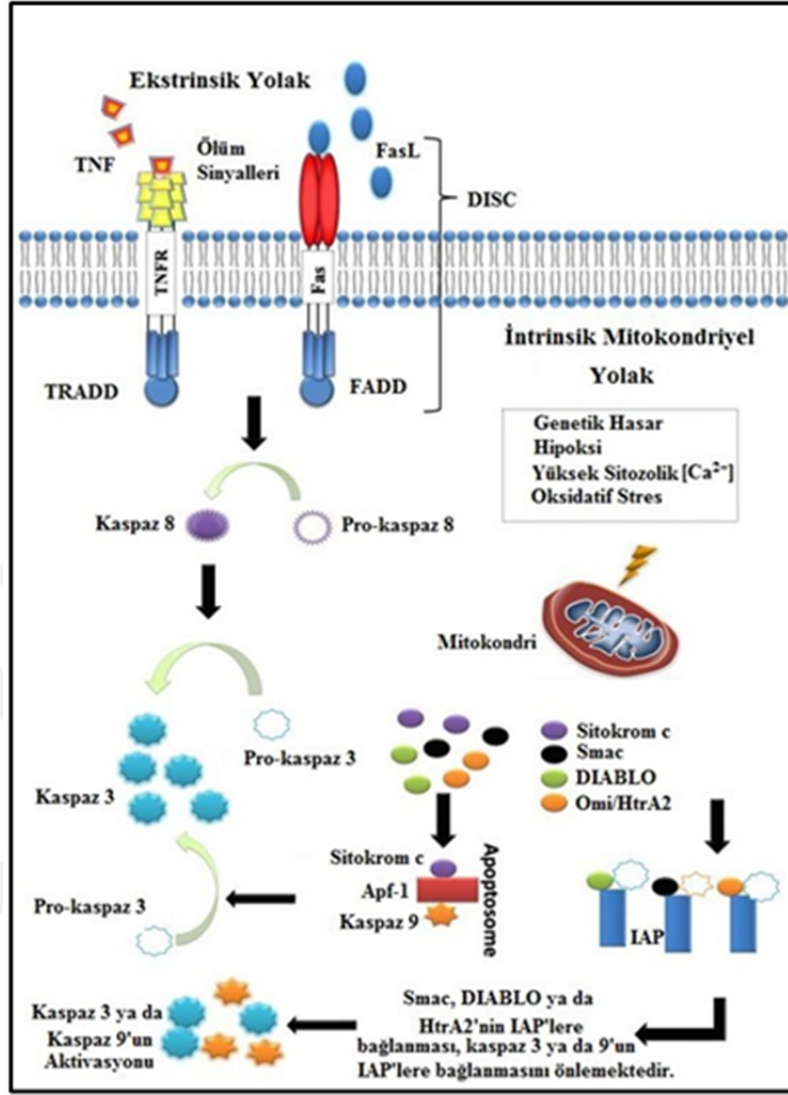
İsminden de anlaşılacağı üzere intrinsik yolak, hücre içinde başlatılmaktadır. Geri döndürülemez genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek derişimlerdeki sitozolik

Ca<sup>2+</sup> şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, intrinsik mitokondriyal yolağın başlamasının tetikleyicilerinden birkaçıdır. Bu yolak, uyaranlardan bağımsız olarak, artmış mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom c gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınımının bir neticesidir (90). Bu yolak asıl olarak, ismini Bcl-2 geninden alan, Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir (91).

Apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü (Smac), düşük pI ile apoptoz protein inhibitörü(IAP) bağlama proteini (DIABLO) ve Omi/Yüksek Sıcaklık İhtiyaç Proteini A (Omi A, HtrA2)'yı da içeren diğer apoptotik faktörler, mitokondrinin zarlar arası bölgesinden sitoplazmaya salınmaktadır. Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, sitokrom c, apoptoz proteaz aktivatör proteini 1 (Apaf-1) ve kaspaz 9'dan oluşan, apoptozom denilen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive etmektedir (92). Smac/DIABLO ya da Omi/HtrA2 ise IAP' ye bağlanarak kaspaz aktivasyonunu arttırmakta ve bu da sonrasında IAP'lerin kaspaz 3 ya da 9 ile etkileşiminin kaybına neden olmaktadır (92,93).

#### **2.4.1.1.1.2. Ekstrinsik Yolak**

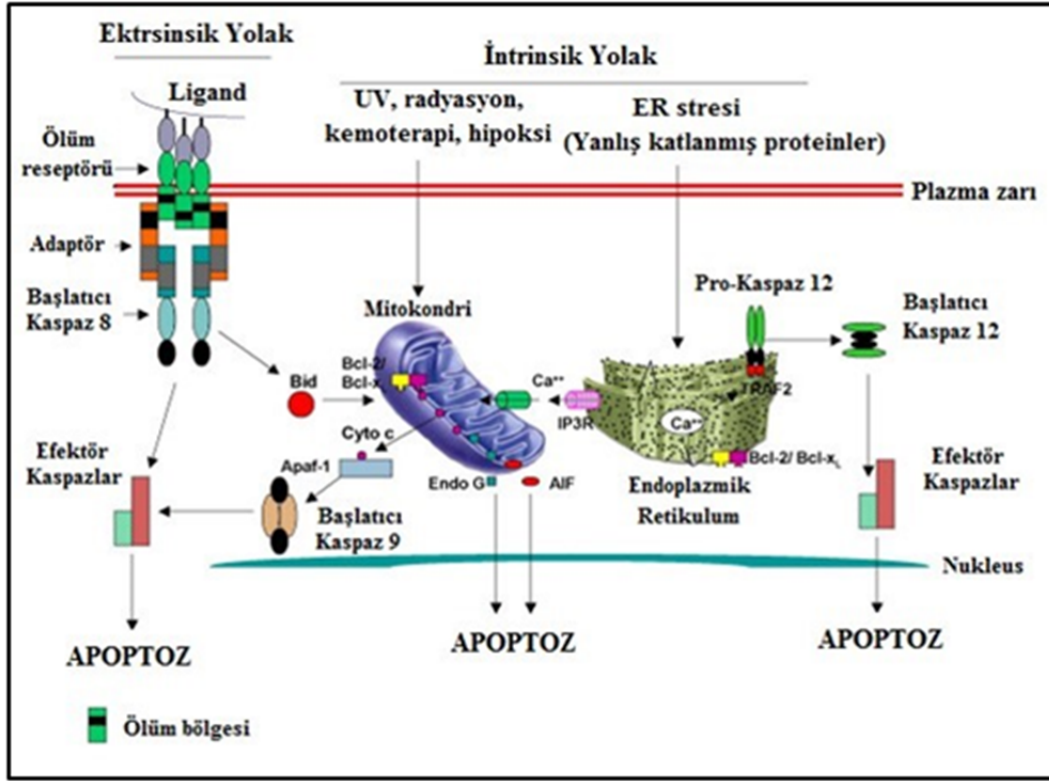
Bu yolak, ölüm ligandlarının ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlamaktadır. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olsa da en çok bilinen ölüm reseptörleri Tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve ilişkili bir protein olan Fas (CD95)'dir ve bunların ligandları sırasıyla TNF ve Fas ligandı olarak isimlendirilmektedir (94). Bu ölüm reseptörlerinin TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD)'nin yanı sıra kaspaz 8 gibi adaptör proteinleri çalıştıran hücre içi ölüm bölgeleri de vardır (93). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör protein için bağlanma bölgesinin oluşması ile sonuçlanmakta ve bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölümü-indükleyen sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinmektedir (89). DISC, daha sonra pro-kaspaz 8'in birikmesi ve aktivasyonunu başlatmaktadır. Aktif kaspaz 8, diğer infaz edici kaspazları keserek apoptozu tetiklemektedir (Şekil 2.8) (90).



Şekil 2.8.İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (91).

#### 2.4.1.1.1.2. İntrinsik Endoplazmik Retikulum Yolağı

İntrinsik ER yolağı, üçüncü ve en az bilinen yolağıdır. Bu yolağın kaspaz 12-bağımlı olduğuna ve mitokondri-bağımlı olmadığına inanılmaktadır (95). ER; hipoksi, serbest radikaller, glukoz açlığı gibi hücresel stresler tarafından hasara uğratıldığında, hücre içinde katlanmış proteinlerin açılması ve azalmış protein sentezi görülmektedir. TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) olarak bilinen düzenleyici bir protein, pro-kaspaz 12'den ayrılmakta ve bu da daha sonra pro-kaspaz 12'nin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (89). Şekil 2.9' da her üç apoptoz yolağını da gösteren bir şema sunulmuştur (96).



Şekil 2.9.İntrensik mitokondriyal, intrinsik ER ve ekstrinsik apoptotik yollar(96).

#### 2.4.1.1.2. Apoptozun Modölatörleri

Apoptoz çokçeşitli modölatörler tarafından düzenlenmektedir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediyatörler hücre tipine özgüllük gösterirken, bazıları da apoptotik uyarının türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Bir hücrenin yaşamı, bu hücrenin uygun hücre dışı sinyal almasına bağlıdır. Bu sinyallerin yokluğunda, hücrenin apoptoza gittiği düşünülmektedir (83).

Apoptoz sinyalinin iletimini kontrol eden, baskılayan veya aktive eden bir çok gen bulunmaktadır (çizelge2.2) (17). Apoptozun erken evresinde görülen bazı regölatörler hücreyi ölüme hazırlamakta ve ölümlü efektörlerini aktive etmektedir. Bunlar patojenler tarafından eksprese edilen proteinler (örn; Bcl- 2 ve ilgili proteinler) ve kinazlardır (stres ile aktive edilmiş protein kinazlar) (83).

**Çizelge 2.2.** Apoptoz ve Genler (17).

Apoptozu baskılayan genler	Apoptozu indükleyen genler
Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 c-abl geni ras onkogeni çözünebilir fas p35 A20	Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1 c-myc p53, p21 fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) LOH (MTS1/CDK41)

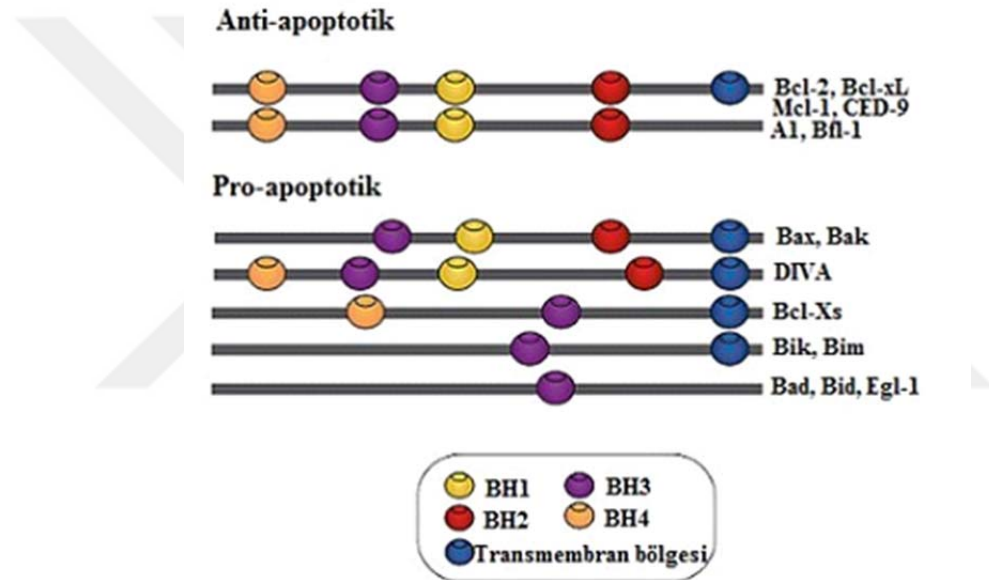
#### 2.4.1.1.2.1. Bcl-2 Gen Ailesi

İlk kez insan foliküler lenfomasında bulunan Bcl-2 geni, kromozomal translokasyondan kaynaklanan bir gen ürünü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yaşamsal bir faktör olarak rol aldığı keşfedilmiş ve bir onkogen olduğu düşünülmüştür. Bu genin apoptozla direk ilişkisi *C. elegans*' ta apoptoz baskılayıcısı olan Ced-9' un insandaki homologu olması ile açıklanır (16). Son çalışmalarda Bcl-2' nin; büyüme faktörü yoksunluğu, radyasyona maruz kalma, c-myc veya anti kanser ilaçlar gibi birçok uyarı ile tetiklenmesi sonucu memelilerde apoptozu baskıladığı bildirilmiştir (97). 230 kb bir protoonkogen olan Bcl-2, mitokondrial membranda yer alan 24-26 kb' lik bir proteini kodlar. Bu proteinin GTP bağlayıcı bir protein olduğu ve henüz tam anlaşılmayan bir mekanizma ile apoptozu engellediği bilinmektedir (16). Bütün Bcl-2 gen ailesi üyeleri mitokondrinin dış zarında homo- veya heterodimerler halinde bulunurlar ve por oluşumu ve iyon kanallarının şekillenmesini sağlarlar (88,89).

Apoptozun intrinsik yolağı Bcl-2 ailesinin üyeleri ile düzenlenmektedir. İnsanlarda şu ana kadar Bcl-2 gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır (88). Bcl-2 ailesinin bütün üyeleri yapılarında bulunan Bcl-2 homoloji bölgelerinden (BH1-BH4) en az birini taşır. Bcl-2 ailesinin proteinleri yapısal ve işlevsel özelliklerine göre 3 alt gruba ayrılırlar. Grup I antiapoptotik aktiviteye sahipken grup II ve grup III ise proapoptotik aktiviteye sahiptir (şekil 10)(89,91). Bu iki zıt etkili grupyapılarında bulunan hidrofobik

cep ve amfipatik  $\alpha$ -heliks bölgelerine bağlı olarak işleyişini sürdürmektedirler. BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturmakta, amfipatik  $\alpha$ -heliks ise BH3 bölgesinde yer almaktadır. Proapoptotik ya da antiapoptotik üyeler birbirlerine hidrofobik cep üzerinde bulunan BH3 bölgesinden bağlanmaktadır. Bu bağlanma apoptozun başlaması için BH3 bölgesinin gerekli olduğunu göstermektedir (98).

Bcl-2 üzerinde yapılan çalışmalar, neredeyse bütün Bcl-2 ailesi üyelerinin, evrimsel düzeyde korunmuş bir  $\alpha$ -heliks Bcl-2 homolojisi (BH) bölgesine sahip olduğunu, fonksiyonel ve/veya yapısal benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. (Şekil 2.10) (91).



Şekil 2.10. Bcl-2 ailesi(91)

Grup I antiapoptotik Bcl-2 ailesi;apoptozu inhibe eden proteinler olup, transmembran domain ile birlikte, BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerini içermektedirler. Bu grupta Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w ve Mcl-1 yer almaktadır (98).

Grup II proapoptotik Bcl-2 ailesi;apoptozu uyarıcı özellik gösteren proteinlerdir. Bu grupta bulunan Bax, Bak, Bok/Mtd yapılarında BH4 hariç diğer bölgeleri içermektedirler (88,98).

Grup III BH3 only-Bcl-2 ailesi;sadece BH3 bölgesi içerip proapoptotik etki göstererek apoptozu stimüle edici etki göstermektedirler. Bu grupta, Bad, Bid, Bim,

Bik, Hrk, Bcl-X<sub>S</sub> Noxa, Bcl-G, Nip3, Bmf ve PUMA bulunmaktadır. Bu proteinlerden Bid, Noxa, Bmf ve PUMA' da transmembran bölge gösterilmemiştir (88,98).

Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri hücreyi birçok farklı uyarıdan korur ve hücrenin yaşamı için önemli bir yere sahiptir. İlginç bir şekilde bazı durumlarda Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> kaspazlar tarafından kırılmaya uğrarlar ve kırılma ile bu proteinler prosurvival özelliğini kaybederek sitokrom c' nin mitokondriden salınımını indükleyen proapoptotik özelliğe sahip olur (98).

Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> ve Bax sentetik lipid membranlarında iyon kanallarının oluşumuna sebep olurlar. Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> çekirdek, ER ve mitokondrial zar da bulunur. Mitokondrideki Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> sitokrom c, Apaf ve AIF gibi moleküllerin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya geçmesini önler. Sitokrom c ve AIF sitoplazmaya geçtikten sonra direkt kaspazları aktive ederler. AIF' nin salınımı, zar geçirgenliği ve zar potansiyelinin düşmesi gibi mitokondriyal bozuklukların oluşmasına bağlıdır(99).

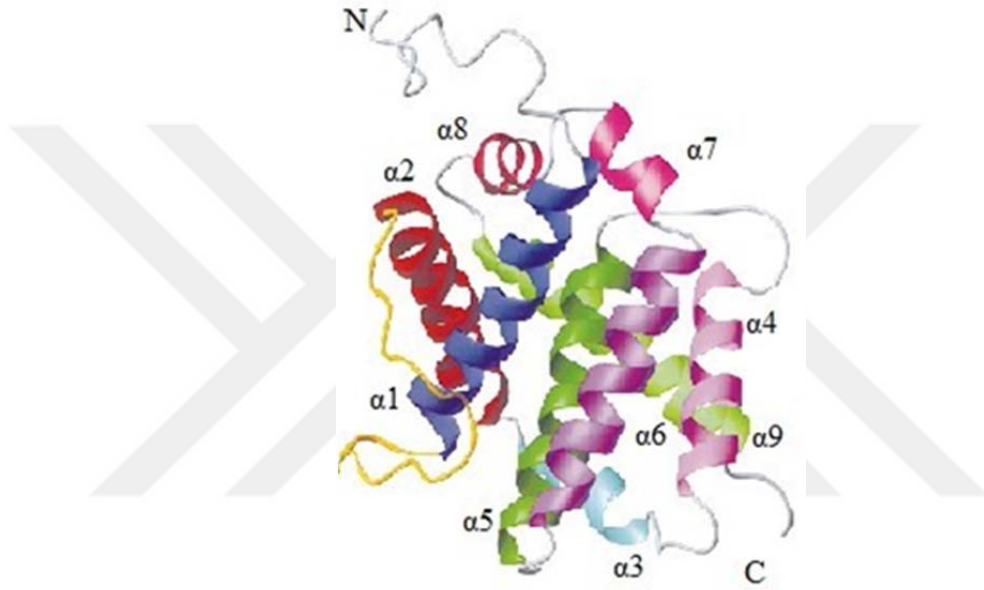
Bcl-2 ailesi proteinlerinin dikkat çekici özelliklerinden birisi de homodimer ve heterodimer oluşturabilme yeteneğidir. Bu ailenin antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri arasındaki heterodimerizasyon, birbirlerinin biyolojik aktivitelerini inhibe ettiğini düşündürmektedir. Apoptotik aktivite için BH1, BH2 ve BH3' e ilave olarak BH4' ün olması gerekirken proapoptotik aktivite için BH3 olması gerekmektedir (99).

#### **2.4.1.1.2.2. Bax Geni ve Proteini**

Memelilerde stres ile indüklenen apoptoz, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilmektedir (90, 91). Bu proteinlerden Bax, apoptozun başlamasında merkezi bir role sahiptir. Sağlıklı hücrelerde Bax, çoğunlukla sitozolde inaktif monomerler halinde; düşük derişimlerde ise ER'da ve OMM'de gevşek bir şekilde tutunmuş halde bulunmaktadır. Tek BH3 bölgesi içeren proteinlerin aktivasyonu ile Bax konformasyonel değişikliğe uğramakta, mitokondriye göç etmekte, mitokondride multimerize olarak MOMP'a sebep olmaktadır. Böylece sitokrom c gibi mitokondriyal apoptotik proteinler ve ROS mitokondriden salınmakta ve kaspaz aktivasyonuna sebep olmaktadır (91).

Bax, yapısal olarak Bcl-2 ailesi üyeleri ile benzerlik göstermektedir (91). Bax proteini kısa ilmekler ile birbirine bağlanmış olan 9  $\alpha$ -heliksten meydana gelmektedir.

$\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ve  $\alpha 9$ 'un, Bax'ın OMM ile etkileşimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$ , lipid çift tabakasında por oluşturduğu bilinen bakteriyel toksinlere çok benzer biçimde, saç tokası şeklindeki amfipatik helikslerdir (91). Bax'ın  $\alpha 5$  veya  $\alpha 6$  heliksindeki mutasyonlar, Bax'ın zar geçirgenliğini artırma ve dolayısıyla apoptozu tetikleme özelliğini ortadan kaldırmaktadır (100).  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  heliksleri, bir tarafında  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  heliksleri, diğer tarafında  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  heliksleri, yukarısında ise  $\alpha 7$  ve  $\alpha 8$  ile çevrelenmiştir (Şekil 2.11) (101,102).



Şekil 2.11. Bax'ın yapısı(101)

Bax'ın N-terminal bölgesi, proteinin çözünebilir inaktif formunda tutulmasında görev almaktadır ve Bax'ın mitokondriyal göçü için bu bölgenin hareket etmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu bölgeye hedeflemenin apoptotik düzenlenmesi (ART) de denilmektedir. Bax'ın N-terminal bölgesindeki konformasyonel değişiklik, tek başına Bax'ın aktivasyonu ve mitokondriye göçü için yeterli değildir. Bax'ın C-terminal bölgesi olan hidrofobik  $\alpha$ -heliks ( $\alpha 9$ ), BH bölgelerinden oluşan hidrofobik bir helikstir ve transmembran çapası gibi görev görmektedir. Bu heliksin baskılanması, proteinin zara tutunmasına mani olmaktadır (91) ve bu heliksin hareket etmesi BH bölgelerini,  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  hidrofobik saç tokası yapısını açığa çıkartarak dimerizasyon ve oligomerizasyona sebep olmaktadır (91,102).

#### 2.4.1.1.2.3.p53

Tümör baskılayıcı gen olan *p53*, insan tümörlerinin % 70' ini inaktive eden hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (103). Birçok organizmada kanserin baskılanmasında görevi olan *p53* proteini hücre büyümesinin durdurulması, apoptoz, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasında rol almaktadır (104).

Hücre tipi, sitotoksik ilaçlar, gama radyasyon, ısı, şok, hipoksi, osmotik şok, DNA hasar ajanları gibi birçok çevresel uyarıcı, bir hücrenin hücre siklusunda durması veya apoptoza devam etmesi yönünde etki gösterir (16,103). Normal bir hücrede DNA hasarını takiben *p53* seviyesi hızlıca artar, *p53* stabilize olur ve hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücreye kendini tamir etmesi için zaman kazandırır. Hücre hasarı tamir edilemeyecekse hücre apoptoza gider (16). Hasarlı hücrelerde fonksiyonel *p53* yoksa hücre siklusu kontrol edilmeden ilerler. *p53*' ün düzenleyici aktivitesi ise negatif düzenleyici Mdm2 proteini ile sağlanır. Mdm2 proteini, *p53*' ü kontrol altında tutar ve *p53*' ün G1/S geçişinde siklusu durdurur ve apoptozu engeller. Radyasyon vb. etkilerle DNA' da bir hasar meydana geldiğinde Mdm2 proteininin *p53*' e bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler oluşur. Bu nedenle Mdm2 *p53*' ü bağlayamaz ve serbest *p53*' ün transkripsiyonel aktivitesi hücre siklusunu G1 noktasında durur ve Bax genini aktive ederek hücreyi apoptoza götürür. Mdm2, *p53*' ün transkripsiyonunu azaltır veya *p53*' e bağlanarak aktivitesini inhibe eder (16,104).

#### 2.4.1.1.2.4. c-Myc

c-Myc geni, kromozomun 8q24 bölgesine yerleşmiştir. c-Myc proteini Janus kinaz (JAK) ailesinin bir üyesidir. Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir (16). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi antiapoptotik sitokinler veya Bcl-2 gibi apoptozun negatif düzenleyicileri varlığında c- Myc hücresel çoğalmayı sağlarken bu faktörlerin yokluğunda ise c-Myc ailesi apoptoza sebep olur. c-Myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler hücre döngüsünün bozulmasına yol açar ve *p53*' e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (16).

#### 2.4.1.1.2.5. Nükleer Transkripsiyon Faktörü NF-κB

NF-KB apoptoz, viral replikasyon, tümörjenez, inflamasyon ve çeşitli otoimmün hastalıkta gerekli birçok genin ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. NF-KB büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, radyasyon, farmakolojik ajanlar ve stresi içeren çeşitli uyarılar tarafından aktif hale getirilir. NF-KB inaktif formunda, IKB ailesi inhibitör proteinlerine bağlı olarak, sitoplazmada bulunur. NF-KB aktivasyonuna sebep olan çeşitli uyarılar IKB' nin fosforilasyonuna ve degradasyonuna neden olur. Bu da NF-KB alt birimleri üzerine nükleer lokalizasyon sinyalleri iletilmesi ve sonra molekülün nükleusa translokasyonu ile sonlanır. NF-KB nükleusta çeşitli genlerin transkripsiyonunu başlatır (79).

NF-KB muhtemelen doku orijininden çok ölüm uyarısının durumu ile belirlenen anti ve proapoptotik fonksiyonların her ikisini de gösterir. Uygun fizyolojik durumlarda NF-KB' nin aktivasyonu birçok kompleks proteinin aktivasyonu yoluyla apoptotik uyarıya dirence neden olur. Bununla beraber, belirli uyarılara tepki olarak NF-KB aktivasyonu apoptozun indüklenmesine yol açabilir. Bu, kaspaz-1 gibi kaspazlar, interferon-düzenleyicili faktör-1, c-myc, ve p53 gibi bazı proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile açıklanabilir (79).

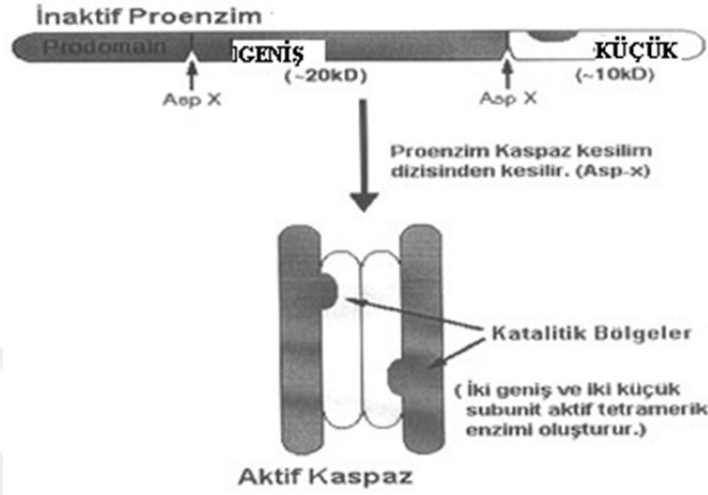
#### 2.4.1.2. Hücre içi Proteazların Aktivasyonu

Kaspazlar apoptotik hücre ölümünde önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenirler. Hücre ölümü esnasında ortaya çıkan pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin yer aldığı süreçler sonunda gelişmektedir (82).

Kaspazlar ilk olarak CED-3 yoluyla keşfedilmiştir. CED-3 bir nematod olan *C. elegans*'ın hücre ölümü için ihtiyaç duyduğu genin ürünü olup, memelilerdeki karşılığı olan interlökin-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) veya kaspaz-1 bu geniş ailenin ilk üyesi olarak tanımlanmaktadır (105).

Kaspazlar benzer amino asit dizilimine sahip olduklarından, yapısal ve substratları açısından da benzer özellikler taşımaktadırlar. Tüm kaspazlar proenzimler şeklinde üretilip (30-50 kD), 3 kısımdan meydana gelmektedirler. Bu kısımlar; NH - terminal kısım, geniş alt ünite (20kD civarı) ve küçük alt ünitelerden (10kD civarı)

oluşmaktadır. Proteolitik süreç içerisinde aktivasyona uğrayan kısımlar olan geniş ve küçük altüniteler arasında heterodimer oluşturacak birleşmeler açığa çıkmaktadır (82)(şekil 2.12)(105).



Şekil 2.12. Kaspaz aktivasyonu (105)

Proenzim ve aktif kaspaz enzimin yapısındaki iki önemli özellik aktivasyonda rol oynamaktadır. Birincisi, yüksek değişim gösteren bir dizilime sahip ve uzun olan NH- terminal kısım aktivasyonun düzenlenmesini sağlamaktadır. İkincisi ise proenzimden elde edilen tüm kısımlar olan kaspaz konsensus bölgesidir. Kaspazların hepsinde benzer özgünlük bulunmaktadır. Kaspazlar en yüksek özgünlüğe sahip proteazlar arasında bulunmasına rağmen, kesme işlemini aspartik asit üzerinden yapmaktadırlar. Kaspazların spesiflikleri her ne kadar yüksek düzeyde olsa da, substrat tanımlanmasında her optimal tetrapeptid dizilime sahip proteaz kesilmemektedir. Bunun nedeni, üçüncül protein yapısının da substrat tanımlaması üzerine olan etkisidir. Böylece proteinlerin kaspaz yolu ile kesilmesi hem spesifite hem de yüksek etkinlik göstermektedir (82).

Sağlıklı hücrelerde kaspazlar enzimatik aktivitesi çok az olan inaktif zimojenler şeklinde bulunmaktadırlar. Aktive olabilmeleri için yaklaşık olarak 20kD ve 10kD uzunluğundaki iki parçaya ayrılmalarını sağlayacak spesifik aspartik asit kalıntılarında kesilerek tamamen aktif olan tetramerik enzim kompleksi şekline gelmeleri gerekmektedir. Aktivasyon; otokatalitik süreçler ve aktif kaspazlar tarafından gerçekleştirilen proteolizis olmak üzere 2 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir(82).

Farklı kinetiklere sahip olsalar da apoptoz süresince birçok kaspaz aktive olmaktadır. Bu sebeple apoptozu başlatacak ölüm sinyalinin verilmesi için hangi kaspazın aktive olmak zorunda olduğu önemlidir (106).

**Kaspaz İnhibitörleri:** Kaspazların aktivasyonu ve inaktivasyonu çeşitli proteinler, iyonlar ve IAP' ler, Bcl-2 ailesi proteinleri, Calpain,  $Ca^{2+}$ , Granzim B ve sitokin yanıt değiştiricisi A (Crm A) gibi faktörlerle düzenlenir (16).

IAP' ler hem filogenetik hem de fizyolojik açıdan geniş çapta eksprese olan apoptotik inhibitörlerdir (16). IAP' ler apoptozisi Bcl-2 ailesi üyelerini de içine alan diğer apoptotik inhibitör ailelerinden daha etkin olarak inhibe eder. Son yıllarda IAP' lerin apoptozun moleküler mekanizmasında rol oynayan önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir (16,107).

Granzim B, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol oynarlar. Perforinler ve granzimler, normal olarak sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal katil hücrelerin sitoplazmik bölgelerinde bulunurlar. CTL' lerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar oluştururlar. Oluşan bu porlar sitozolik  $Ca^{2+}$  düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Perforinlerle birlikte salgılanan ve bir çeşit serin proteaz olan Granzim B de bu porlar aracılığı ile hücre içine girer. Granzim B prokaspaz-3, -7, -8, -9 ve -10 gibi birçok prokaspazın aktivasyonuna neden olarak enfekte olmuş hücreleri apoptoza götürür (108).

Calpain, papainaz ailesinden  $Ca^{2+}$  bağımlı bir tür sistein proteazdır. Genel olarak Calpain' in nekrozda ve apoptozda arttığı bilinmektedir. Calpain ve kaspaz-3 fodrin,  $Ca^{2+}$  bağımlı protein kinaz ve ADP-ribozil transferaz/PARP gibi birçok ortak substratı paylaşırlar (108).

Birçok herpes virüsünde bulunan FLICE inhibitör proteinleri (vFLIPs), ölüm reseptörleri yoluyla apoptoz sinyallerini engeller. vFLIP' in hücre sel homologu 8 ayrı grup tarafından keşfedilmiş ve cFLIP/Casper/CASH/FLAME/I-FLICE/MRIT/CLARP/USurpin olarak adlandırılmıştır. (16).

### 2.4.1.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler

#### 2.4.1.3.1. Biyokimyasal Değişiklikler

Kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkmaktadırlar.

- 1- DNA kırıklarının oluşması: Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir protein olup, bunlar kaspazlar tarafından yıkılarak endonükleazı serbestleştirmektedirler. Çekirdek içine giren  $Ca^{2+}$  -  $Mg^{2+}$  bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturmaktadırlar. Kırıklar nükleozomların arasından mono-veya oligonükleozomal olarak meydana gelmektedir. 180-200 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşmaktadır (109, 110).
- 2- Hücre iskeletinin yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybetmektedir (110).
- 3- Hücre membran değişiklikleri: Kaspazların etkisiyle hücre membranının asimetrisi bozulmaktadır. Plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzüne yerleşmektedir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler, hücre membranlarında thrombospondin denilen adhezif bir glikoprotein ve bazı hücre adhezyon kuvvet moleküllerini (örn: ICAM 3) içermektedirler. Membranda gerçekleşen tüm bu değişiklikler, apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilerek, fagositozlarını sağlamaktadır. Ayrıca transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar ile apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar (109).

#### 2.4.1.3.2. Morfolojik Değişiklikler

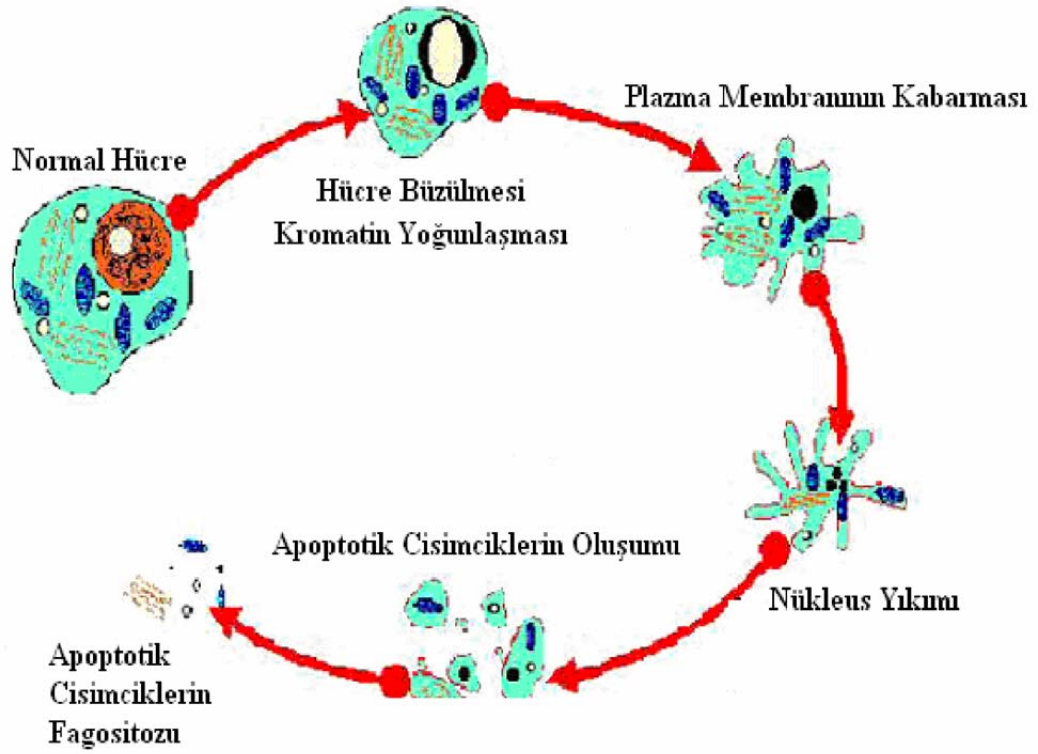
Apoptozda ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılması olarak belirtilmektedir (17). İmmün elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşmaktadır (17). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptozda yaklaşık 300000 kırılma meydana gelmekte ve hücre onarımı yapılamamaktadır (17,111).

Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılıp, özelleşmiş yüzey organellerini kaybedip ve büzülerek, birkaç dakika içinde hacimlerinin 1/3'ünü kaybetmektedirler. Bu sürecin plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (17). Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, bu hücreler etrafında açık bir parlaklık görülmektedir (111).

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşmakta ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanmaktadır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilmektedir (112).

Apoptoz, tek bir hücrede büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterize olarak tanımlanmaktadır. Hüresel büzüşmenin nedeni  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin oluşmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşüp, çevre ile olan bağlantılarını kesmekte ve mikrovillusları kaybolmaktadır. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulmakta ve 'zeiozis' olarak tanımlanan kabarcık oluşmaktadır. Bu tomurcuklanma ve parçalanma olayında transglutaminaz enzimi rol oynamaktadır (17).

Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetric olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşmektedirler. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarı oluşturmaktadır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyardırmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilmektedirler. Apoptoz 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanmaktadır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir (113). Elektron mikroskopunda apoptoz sırasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan AIF salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (şekil 2.13)(82, 114)



Şekil 2.13. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler (82)

#### 2.4.1.4. Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler (109). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerinlektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (81).

#### 2.5. Hypericum perforatum L.

*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae (Guttiferae=Clusiaceae) familyasına ait olan, Mayıs ile Ağustos ayları arasında çiçeklenen, boyu 0,3 ile 1 metre arasında değişen 5 petalli, sarı çiçekli, çok yıllık otsu bir bitkidir (115). Türkiye’de halk arasında ‘sarı kantaron, binbir delik otu, kılıç otu, yakı otu, mayasıl otu, koyunkıran’ (115); İngilizce’de ise ‘St. John’s Wort’ veya ‘goat weed’ isimleri ile bilinmektedir (115).

Bitkinin İngilizce adının, hristiyanlık inancında bir aziz olarak kabul edilen St. John’ un ( John the Baptist) doğduğu ay olan Haziran’ da altın renkli çiçeklerini açması

nedeniyle bu azize atfen verildiği düşünölmektedir (116). Dünyada 350- 400 kadar türle temsil edilen *Hypericum* cinsine (117) mensup olan bitki, dünyanın ılıman ve tropikal iklimli bölgelerinde; çoğunlukla yol ve çimenli nehir kenarlarında, bakımsız tarlalarda ve kışı nemli, yazı kurak olan bölgelerde yayılış göstermekte olup, en iyi hafif asidik ya da nötr topraklarda yetişmektedir ( 118). Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya ve Çin’ de tarımı yapılan bitki (119) ölkemizde Marmara, Karadeniz, Ege, Orta ve Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir ve 84 türle temsil edilmektedir (117,120). *H. perforatum* L.’ de çiçeklerin ve yaprakların çevresinde gözle görölebilen siyah oval noktacıklar (salgı cepleri) bulunmaktadır (117). Bitki için karakteristik olan bu salgı ceplerinin, antidepresan aktivitesiyle ilişkilendirilen hiperisin ve flavanoidleri içeren kısımlar olduğu belirtilmektedir (117).

Romalılar döneminde askeri bir doktor olan Proscurides; bitkinin diyare ve safra rahatsızlıklarında kullanımına dikkat çekerek, bitkiden ilk defa bahsetmiştir (115). Aynı zamanda Yunanlı hekim Dioscorides de bitkinin birtakım tıbbi kullanımlarını tavsiye etmiştir. Eski Yunan ve Romalılar, *Hypericum* filizlerini evlerindeki yüksekte bulunan simgeler ve heykellerin üzerine yerleştirmişlerdir. Çünkü bu bitkinin onları günahkar heveslerden koruyan gizli güçlere sahip olduğuna inanmışlardır (121). Bitkinin mental rahatsızlıkların tedavisinde kullanımına ilk değinen önlü Alman hekim Paracelsus ( 115) olmuştur. İlerleyen zamanda ise yine Alman doktor K. Daniel’ in, bitkinin ekstrelerini 20 depresyon hastasında deneterek gözlemlerini paylaştığı ve 2. Dünya Savaşı’ndan önce yayınladığı makalesi fazla ilgi görmemiştir (115).

Bitki yüzyıllar boyunca antiinflamatuar, sedatif, analjezik, diüretik, antimalaryal ve yara ilacı olarak oral ve topikal yoldan kullanılmıştır. Geleneksel endikasyonlar ise travma, yanıklar, romatizma, nöralji, gastroenterit, yılan sokması, ülserler, ezilmeler, burkulmalar, diyare, menoraji, histeri, yatak ıslatma ve depresyon olmuştur (121,122).

1984 yılında, o dönemki adıyla Alman Federal Sağlık Ajansı’ na bağılı Komisyon E, *H. perforatum* L. hakkında bitkinin geleneksel kullanımına dayanarak depresyon, sinirlilik hali ve anksiyete gibi psiko- otonomik rahatsızlıklarda kullanımını tavsiye eden bir monograf yayınlamıştır (115). Bugün St. John’s Wort’ ün hafif- orta şiddetli depresyon rahatsızlıklarının tedavisinde kullanımını çok iyi bilinmektedir (116). Depresyonun tedavisinde özellikle Amerika ve Almanya’da sıklıkla başvuru olan bu bitkiden hazırlanan preparatların satışı Amerika’da 270 milyon doları, dünyada ise 570

milyon doları geçmiştir (117).*H. perforatum* L. ile yapılan bir çalışmada bitkideki hiperisin ve psödohiperisinin farelere retroviral enfeksiyon uygulandıktan sonra antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Retroviral aktivitesinden dolayı AIDS ile bağlantısı tespit edilen bu bitki böylelikle popüler hale gelmiş; üzerinde daha fazla klinik, farmakolojik ve biyokimyasal çalışma yapılmasını sağlamıştır (118).

### 2.5.1.*H. perforatum*' un biyolojik aktif bileşenleri:

Bitkinin toprak üstü bölümlerinin sulu alkollü ekstraktları (%60 etanol veya %80 metanol) başlıca 6 doğal ürün grubu içermektedir. Bunlar: (1) naftodiantronlar, (2) floroglusinoller, (3) flavonoidler, (4) biflavonlar, (5) fenilpropanlar ve (6) proantosiyanidinlerdir. Ayrıca daha az miktarlarda tanenler, ksantonlar, esansiyel yağlar ve amino asitler de yer almaktadır. Bütün bu bileşenler saf *H. perforatum* bitkisinin ana bileşenlerini oluşturmaktadır (123) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. *H. perforatum* ana bileşenlerinin bilinen biyolojik özellikleri (123)

İçerikler	Aktivite
<b>Amentoflavon</b>	Antiinflatuar, antiülserojenik
<b>Hiperforin</b>	Gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyel aktivite, yara iyileştirici, nörotransmitter inhibitörü, antidepresan, potansiyel antikarsinojenik, anjiyojenez inhibitörü ve antimalaryal
<b>Hiperisin</b>	Antiviral, antidepresan aktivite, antiinflatuar
<b>3',8''-biapigenin</b>	Kısmen sedatif
<b>Proantosiyanidinler</b>	Antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, damar gevşetici
<b>Psödohiperisin</b>	Antiviral
<b>Kersitrin</b>	İn vitro MAO inhibitör aktivite
<b>Ksantonlar</b>	Antidepresan, antimikrobiyal, antiviral, diüretik, kardiyotonik, MAO <sub>A</sub> inhibitörü

#### 2.5.1.1. Naftodiantronlar

Bu bileşenler yoğun kırmızı renk ve fototoksik özelliklerle (124) *Hypericum* cinsine özgüdür (123). Bu grubun majör bileşenleri hiperisinlerdir. Bitkiden protohiperisin ve psödoprototrohiperisin olarak adlandırılan prototürevler izole edilmiştir.



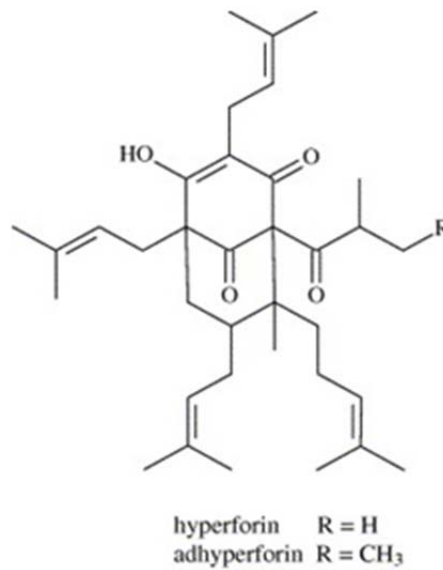
memeli hücrelerinde antiproliferatif aktivite gösterir. Bu durum hiperisin ve psödohiperisinin hücrelerin viral enfeksiyonu sırasında protein kinaz C ile gerçekleşen fosforilasyonun inhibisyonuna bağlanabilecek şekilde antiretroviral aktiviteyi açıklamaktadır (126). Hiperisin ayrıca CD8+ T hücresi aracılı sitotoksiste reaksiyonu üzerine inhibitör etkisiyle ilişkili olarak T hücresi aracılı hastalıkların tedavisi için etkili bulunmaktadır (127).

Son zamanlarda hemoglobinve hiperisinin karışımlarının irradyasyonunun, reaktif oksijen türlerinin (hemoglobinin yapısını değiştiren ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redüksiyonu için proteinin katalitik aktivitesini arttıran) oluşumunu aktive ettiği bulunmuştur. Proses sadece irradyasyon zamanına değilayrıca hiperisin konsantrasyonuna da bağlıdır. Bu çalışma sadece hiperisinin fotosensitizasyonunu doğrulamaz; hemoglobinin artmış peroksidaz aktivitesini de değerlendirir (128).

Hiperisin, *H.perforatum*'un ana fotosensitize edici bileşenidir (hiperisizme neden olur) ve fotodinamik kanser terapisi için bir fotosensitizör olarak önerilmektedir. Psödohiperisin herhangi bir fototoksisteye sahip değildir (129).

### 2.5.1.2. Floroglusinoller

Floroglusinol türevleri *Hypericum* cinsi içinde yaygın bir şekilde dağılım göstermektedir. *H. perforatum*' da bulunan ilişkili bileşenler hiperforin ( ana floroglusin içeriğinin %2-4.5' i) ve adhiperforin ( %0.2-1.9)' dir. Adhiperforin ilave bir metal grubu içerir (121,123) (Şekil 2.15) (130).



Şekil 2.15. Hiperforin ve adhiperforin (130)

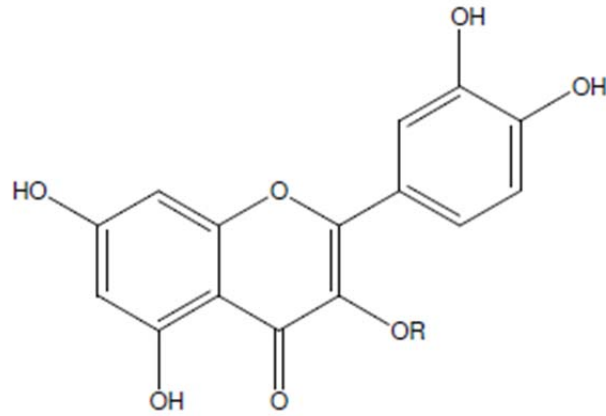
Bu bileşenler sadece üreme organlarında bulunur ( çiçeklerde yaklaşık% 2, olgun meyvelerde %4.4 ve olgunlaşmamış meyvelerde %4.5)(123,131). Ancak bitkinin çay ve tentür gibi geleneksel preparatları çok az hiperforin içerir ya da hiç içermez (132). Hiperforinin ana oksidasyon ürünü furohiperforin, hiperforin konsantrasyonunun %5' i kadar toprak üstü bölümlerde bulunur (133). İlave olarak okzepahiperforin (134) ve diğer hiperforinin oksidasyon analogları izole edilmiş ve aydınlatılmıştır (135).

Hiperforin özellikle sulu solüsyonlarda oldukça unstabil olmasına rağmen ışık ve ısıya maruz kaldığında pekçok ticari ekstrede %0-6 konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Degradasyon ürünleri 2-metil-3-büten-2-ol ve sağlam hiperforin karbon iskeleti ile iki oksidasyon ürünüdür (123).

*H. perforatum*' da bulunan hiperforinler farmakolojik açıdan çok ilginç bileşenleri temsil etmektedir. Hiperforinin kendisinin pekçok in vitro nörotransmitter sistemi inhibe ya da modüle ettiği gösterilmiştir. Sinaptosomal preparatlarda 0.5 mg/ L civarında IC<sub>50</sub> değerleri ile serotonin, dopamin ve noradrenalinin güçlü bir geri alım inhibitörüdür (136). Bu durum hiperforinin bitkinin antidepresan aktivitesindeki olası rolünü desteklemektedir. Antidepresan aktivitenin mekanizmasının nörotransmitterlerin sinaptik geri alımının inhibisyonu olduğu düşünülmektedir (137). Bileşen yeni bir antineoplastik ajan olarak oldukça kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (138). Hiperforin ayrıca antimalaryal aktivite göstermektedir ve mikromolar aralığında bir IC<sub>50</sub> değeri ile *Plasmodium falciparum*' a karşı aktif olduğu bulunmuştur. Bu aktivite oto-oksidasyona fenol benzeri duyarlılığa ve prenil rezidüeleri üzerine doymamışlığın varlığına dayanmamaktadır (139).

### 2.5.1.3. Flavonoidler

Flavonoidler, *H. perforatum*' un biyolojik olarak aktif bileşenlerinin ana grubunu oluşturmaktadır (%2-4). Şimdiye kadar teşhis edilen flavonol aglikonları kemferol, luteolin, mirsetin ve kersetini içermektedir (123). Hiperozit (hiperisin)ve rutin genel olarak *H. perforatum* glikozitleri arasında baskın olanlardır. Onları kersitrin ve izokersitrin izler (şekil 2.16) (140,141). Mártonfi ve ark. (142) İtalya' da yetişen rutinsiz kemotip teşhis etmişlerdir. Butterwick ve ark. (143) bitkiden mikelanin ( kersetin 3-O-glukronit) ve astilbin ( taksifolin 3-O-ramnopiranozit) izole etmişlerdir.



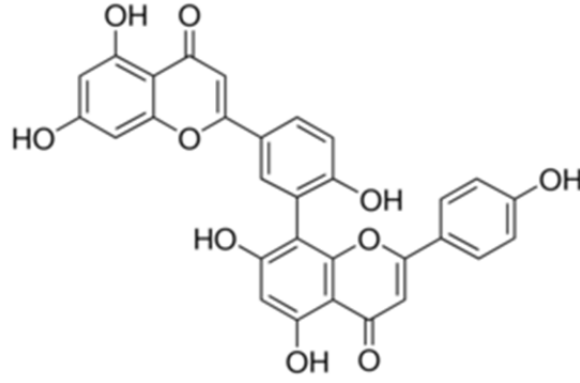
R= H	Kersetin
R= Ramnoz	Kersitrin
R= Glikoz	İzokersitrin
R= Rhamnoz-glukoz	Rutin
R= Galaktoz	Hiperozit

Şekil 2.16. Kersetin ve heterozitleri (140)

Flavonol glikozitlerinin spazmolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bileşenler ayrıca biyojenik aminlerin katabolizmasından sorumlu enzim olan monoamin oksidaz ve katekol-O-metiltransferazı inhibe eder. Glikozitler daha az aktif olmasına rağmen kersetin, kemferol ve luteolin flavonoid aglikonlarının en yüksek aktiviteye sahip olanlarıdır. Bazı flavonoidler benzodiazepin reseptörüne bağlanabilmektedir ve *H. perforatum* flavonoidlerinin aynı yolla etki edebileceği tartışılmaktadır. Rutinin *H. perforatum* ekstresinin antidepresan aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (123).

#### 2.5.1.4. Biflavonlar

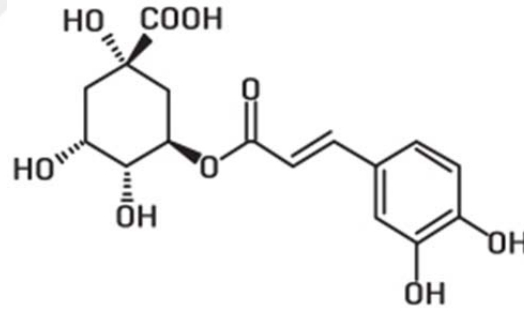
Biflavonlar bazı bitkisel kaynaklarda bulunan dimerik flavonların nadir bir grubudur. *H. perforatum*' da belirlenen 3 biflavon 3',8''-biapigenin (%0.1-0.5), amentoflavon (%0.01-0.05) (Şekil 2.17) (123, 144) ve 6',8''-dikersetin (123)' dir. Ancak amentoflavonun, antiinflamatuvar ve analjezik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (123). Amentoflavonun diazepamla karşılaştırılabilir bir afiniteyle benzodiazepine reseptörlerine bağlandığı bildirilmiştir (123).



Şekil 2.17.Amentoflavon (144)

### 2.5.1.5. Fenilpropanlar

Bu bileşenler başlıca *p*- kumarik asit ve kafeik asit gibi hidroksisinnamik asitlerin esterleri olarak bulunmaktadır. Klorojenik asit, *H. perforatum* ekstresinde %1' in aşağısında konsantrasyonlarda belirlenmiştir (Şekil 2.18) (123,145).*H. perforatum*' daki farmakolojik etkileri bilinmemektedir. Klorojenik asidin yanı sıra kafeik, *p*-kumarik, ferulik, izoferulik, gentsik ve şikimik asit de ayrıca bildirilmiştir.



Şekil 2.18. Klorojenik asit (145)

### 2.5.1.6. Proantosiyandinler

Bu bileşenler tanenlerle temsil edilirler. Total konsantrasyonları çiçeklenme fazından önce maksimum bir konsantrasyon ile %2-4 arasında değişmektedir. Dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidinlerle birlikte dimerik prosiyanidin bitkiden izole edilmiştir (123).

Proantosiyandinler,antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal etkiler göstermektedir; fakat hiçbir antidepresan etki bildirilmemiştir (123).

### **2.5.1.7. Uçucu yağlar**

*H. perforatum*'daki esansiyel yağlar; terpenoidleri ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, geraniyol,  $\beta$ -karyofillen,  $\beta$ -farnesen, humulen ve germakren D) ile birlikte alifatik bileşenleri (2-metil oktan, n- nonan, n- dekan, n-undekan, n-tetradekanol, 2-metil-dekan ve 2-metil-dodekan) içermektedir (123). Yapraklar ve çiçeklerde seskiterpen ve alifatik hidrokarbonların biyosentezi ve oksitlenmiş alifatikler arasında farklılıklar gözlenmiştir. Veriler göstermiştir ki yapraklardan elde edilen esansiyel yağlar içindeki  $\beta$ -karyofillen ve karyofillen oksit çiçeklerden elde edilenden daha yüksektir. Ancak dodekanol, spatulenol, viridiflorol, karotol ve tetradekanol çiçeklerde daha yüksek miktarlarda bulunmuştur (146).

### **2.5.1.8. Diğer kimyasal bileşenler**

Diğer tipik bileşenler ksantonlar (1,3,6,7-tetrahidroksiksanton ve kielkorin C (%0.01), asitler ( izovalerinik ,nikotinik, miristik, palmitik ve stearik), karotenoidler, kolin, nikotinamid, pektin,  $\beta$ -sitosterol, yağ asitleri, amino asitler, C vitamini, tanenler, hidroksiperoksikadiforin ( gövde ve yapraklarda) ve bisantrakinon glikozitleridir (123).

## **2.5.2.H. perforatum üzerinde yapılmış biyoaktivite çalışmaları**

### **2.5.2.1. Antidepresan etki**

#### **2.5.2.1.1. İn vivo çalışmalar**

Depresyonun etiyolojisi oldukça komplike olup, bugün hala çok da iyi anlaşılamamıştır. Elde edilen veriler serotonerjik ve noradrenerjik nörotransmisyon ve santral patofizyolojik durumla ilişkili olduğunun altını çizmektedir. Aynı şekilde, piyasada mevcut olan antidepresan ilaçların neredeyse hepsi santral sinir sisteminde görevli nörotransmitterler olan serotonin, noradrenalin ve dopaminin sinaptik iletimi üzerinde etkili olmaktadır. Bu nedenle antidepresanların büyük bir kısmı, ilgili sinapslarda serotonin ve noradrenalin düzeyinin yükselmesini sağlamaktadır. Bu da aslında *H. perforatum*'un antidepresan etki mekanizmasının da noradrenalin, serotonin ve dopamin ile ilgili olduğunu göstermektedir (115).

“Doğanın Prozac’ı” diye tabir edilen *H. perforatum* bitkisinin, klasik antidepresanlara alternatif olarak hafif ve orta şiddetli depresyona karşı antidepresan etkisi üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir(147). Fare ve sıçan gibi kemirgenler üzerinde denenen davranış ile ilgili deney modellerinde bitkinin sulu alkollü ekstresinin antidepresan etkisi gösterilmiştir(115). Saf hiperforin ve *Hypericum* ekstresi ayrıca ratlarda davranış-ümitsizlik testinde antidepresan aktivite göstermiştir (116). Ekstre, genellikle hiperisin üzerinde % 0,3 total hiperisin olacak şekilde standardize edilmektedir. Hiperforinin ışığa ve ısıya karşı dayanıksız olmasından ötürü, hiperisine göre daha az sayıda çalışma yapılmıştır ve ekstredeki miktarı %1-5 arasında değişmektedir.

Yapılan bir çalışmada %5 hiperforin taşıyan ekstre yerine, % 0,5 hiperforin taşıyan ekstrenin verilmesi ile, antidepresan etkinin azaldığı tespit edilmiştir(148). Ayrıca saf hiperforin ile bitkinin hiperforin içeriği bilinen ekstrelerinin depresyonla ilgili hayvan deneyi modellerinde denenmesi sonucu antidepresan özelliğe sahip olduğu tespit edilmiş olup yine de sıçan beyinde hiperforin seviyesinin oldukça düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır(115).

Bitkinin antidepresan etkisine ait muhtemel mekanizmalardan biri, intra- ve ekstra-nöronal olarak bulunan bir enzim olan MAO’ nun inhibisyonu olarak düşünülmüştür(149). Buna bağlı olarak, daha önceki yıllarda, bitkinin antidepresan etkisinin hiperisin’in MAO inhibitörü aktivitesine bağlı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ( 115,150). Ancak aktivite, *in vivo* olarak etki elde edilmesi çok yüksek olan bir dozda (> 100 g/ml) gözlemlendiği gibi, 100 mg/kg dozda ekstrenin sıçanlara intraperitoneal olarak verilmesinden sonra MAO inhibitörü etki görülmemiştir(115). Başka bir deyişle, MAO-A ve MAO-B inhibitör etkiyi gösterebilmesi için ekstrenin çok yüksek dozlarına ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir.

Hiperforinin serotonin geri alım inhibisyonunun etki mekanizmasının; hücre içi serbest Na<sup>+</sup> iyon konsantrasyonu ile alakalı olduğu gösterilmiştir. Bu durum hücre içi pH azalmasının sonucu olarak Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuşunun ikincil etkisi olabilir. Plazma protein bağlanması in vivo 5-hidroksitriptamin (5- HTP) uptake inhibisyonunda kısıtlayıcı faktör olduğunu gösterecek şekilde hiperforininplateletce zengin plazmada değil ancak yıkanmış plateletlerde 5-HTP re-uptake’ ini inhibe ettiği gösterilmiştir (116).

Öte yandan, bitkinin ekstresinin, 5-HTP, dopamin ve noradrenalinin sinaptozomal geri alımlarını *in vitro* olarak inhibe ettiği ve bu etkiye de hiperforinin neden olduğunu gösteren çalışmalar bildirilmiştir(136,151,152). Fakat, bu sonuçlar etki mekanizmasının, re-uptake inhibitörleri olan sentetik antidepresanlardan biraz daha farklı olduğuna dikkati çekmektedir.

Hiperforinin bariz monoamin geri alımı üzerindeki inhibitör etkisi, intraselüler  $H^+$  ve  $Na^+$  ve/veya sinaptik veziküllerde depolanan nörotransmitter düzeylerinde değişikliğe yol açmaktadır(151,153,154).

Özetle bu araştırmalardan çıkan sonuçlar(155);

- ✓ Hiperforinin etki etme şekli/ etkisi; santral sinir sistemindeki bazı reseptörlere bağlanarak gerçekleşmektedir.
- ✓ Ya da hiperforin, yapısı henüz bilinmeyen bir metaboliti üzerinden dolaylı yoldan santral sinir sistemi reseptörlerine bağlanarak veya birtakım nöromodülatörleri indükleyerek etki etmektedir.

Diğer taraftan, bitkinin antidepresan aktivitesinin en önemli mekanizması olarak; klasik trisiklik antidepresanların etki mekanizmasına benzerliği göz önüne alınabilir. Bu mekanizma ise, presinaptik sinir uçlarından sinaptik aralığa salınan nörotransmitterleri geri döndüren serotonin ve/veya norepinefrin taşıyıcı proteinlerin kompetitif inhibisyonu esasına dayanmaktadır. Buna göre; bazı antidepresanlar her iki proteinden birini inhibe ederken, bazıları da hem noradrenalin hem de serotonin taşıyıcılarını inhibe etmektedir. Üstelik bitkinin ekstresi serotonin ve noradrenalinin sinaptozomal alımının inhibisyonu yanında; dopamin, gama-aminobütirik asit (GABA) ve L-glutamatın da fare beyin dokusunda aynı şekilde alınımının inhibisyonuna yol açmaktadır(156). Bu bulgu, aynı zamanda sıçan sinaptozomlarında, sıçan nöronlarından elde edilen primer hücre kültüründe ve yine sıçan kortikal astrosit kültüründe de ispatlanmıştır(136,152,156). İlginç bir şekilde, ekstre uygulaması durdurulduktan bir süre sonra, bu alınımın tekrar eski haline döndüğü de gözlenmiştir(157). Bu bulgularla benzer şekilde, çeşitli araştırmacılar tarafından, hayvan deney modellerinde *H. perforatum* ekstresinin akut/kronik uygulamasından

sonra, noradrenalin, dopamin ve serotonin veya bunların metabolitlerinin beyindeki seviyelerinde oldukça farklı değişikliklerin olduğu saptanmıştır(115).

Hiperforinin yıllarca bitkinin biyolojik etkileriyle bir ilgisi olmadığı sanılmakta iken, ilginç bir şekilde, bitkinin nörotransmitter alınımının inhibisyonu üzerindeki etkisinden sorumlu olan başlıca bileşik olduğu tespit edilmiştir. Hiperforinin, nöronal dokularda ekstrenin kendisine göre yaklaşık 10 kat daha güçlü olup, ekstredeki nicel olarak en önemli bileşik olduğu söylenebilir(157).

Hayvanlarla yapılan deneylerde, *H. perforatum*'un sulu alkollü ekstresinin akut dozlarının serotonerjik sistem üzerindeki etkileri halen tartışmalıdır. Örneğin; ekstre uygulamasıyla sıçan beyin korteksinde 5-HTP ve metaboliti 5-hidroksi-indolasetikasit'in (5-HIAA) kayda değer ölçüde artış gösterdiği görülmüştür(158). Fakat bir diğer araştırmada, ekstre uygulamasıyla, fare hipotalamus ve hipokampusunda 5-HTP ve 5-HIAA seviyelerinde artış gözlenirken, kortekste sadece 5-HIAA seviyesinin yükseldiği görülmüştür(159).

Tüm bu değerlendirmeler, *H. perforatum* ekstresi ve hiperforinin in vivo olarak 5-HTP nörotransmisyonunu etkileyebileceğini göstermektedir. Fakat, hala bunun bitkinin antidepresan etkisiyle ne kadar ilişkili olduğu da tartışmalıdır. Nöronal membran reseptörlerindeki değişikliklerin *H. perforatum* ekstresinin genellikle 15 günlük uygulaması sonrasında görüldüğü belirtilmiştir(156,160). Klinikte de aynı şekilde, antidepresan etki elde edilebilmesi için tekrarlanan tedavi uygulaması ile uyumaktadır(161,162).

Yine antidepresan etki mekanizmasında rol alan sigma reseptörleri üzerine *H. perforatum* ekstresinin, hiperforinin ve bazı analogları ile biapigeninin kayda değer bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir(115). Ancak Raffa'nın çalışmasında(163), hiperisin ve psödohiperisin sigma reseptörlerine bağlanma üzerine inhibitör etki göstermişlerdir ( $IC_{50}=1,4$  mg/ml). Fakat bu tür bir etkileşme için gerekli olan hiperisin konsantrasyonu, insanlarda nanomolar seviyede olan plazma konsantrasyonuna göre oldukça yüksektir.

Butterweck ve ark. (164) *Hypericum perforatum*' a ait çeşitli ekstre bileşenlerinin farmakolojik önemini değerlendirmek üzere fare ve ratlarda in vivo bir çalışma yürütmüşlerdir. Üç ekstre hazırlanmıştır. Bunlardan ilki hem hiperforin (%3,2) hem de hiperisin (%0,15) içeren St.John's wort sulu alkollü ekstresi (Ekstre A); ikincisi hiperforin içermeyen ancak hiperisin (%0,14) içeren ekstre (Ekstre B); üçüncüsü

hiperforin ve hiperisin içermeyen ancak flavonoidlerce (yaklaşık %12) zengin ekstre (Ekstre C). Farelerde kuyruk süspansiyon testi (TST) ve ratlarda zorlamalı yüzme testi (FST) kullanılarak üç preparatın in vivo aktivite profili karakterize edilmiştir. Daha sonra saf hiperforinin aktivitesi de araştırılmıştır. Saf hiperforin (8 mg/kg) kadar Ekstre B ve C (500 mg/kg) akut uygulamadan sonra TST’ de immobilité zamanını belirgin derecede kısaltmış, ancak Ekstre A etkisiz kalmıştır. FST’ de her üç ekstre 500 mg/kg maruziyetten sonra immobilité zamanını kısaltmıştır. Bu çalışma ile araştırmacılar flavonoidlerin St. John’s wort ekstresinin terapötik efikasitesinden sorumlu bileşenlerin bir bölümü olduğunu öne sürmüşlerdir. Hiperisin ve hiperforin içermeyen ekstrenin, davranış modellerinde antidepresan aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca hiperforinin St. John’s wort ekstresinin yararlı etkilerini devam ettirdiği de gösterilmiştir.

#### **2.5.2.1.2. Klinik Çalışmalar**

Maprotilin, imipramin, sertralin ve fluoksetin gibi mevcut antidepresan ilaçlarla kıyaslamalı olarak *H. perforatum* ekstresi ile yapılmış çok sayıda klinik çalışma mevcuttur (165-170). Witte ve ark. tarafından gerçekleştirilen depresyon tanısı konulmuş hastalar üzerinde çok merkezli ve plasebo kontrollü bir klinik çalışmada (171), 6 hafta süresince *H. perforatum* ekstresi (Psychotonin® Forte) verilen hasta grubunun Hamilton Depresyon Skalası(HDS)’ na göre, plasebo grubuna kıyasla değerlerinde %79 oranında azalma olduğu gösterilmiştir. Hafif ve orta şiddette depresyon teşhisi konulmuş hastalara, *H. perforatum*’dan hazırlanan LI 160 ekstresi 6 hafta süresince verilmiş ve depresyon ölçümünde kullanılan önemli bir parametre olan HDS’ de tedaviden önce 20,2 olan değeri, 6 hafta sonra 8,8’e gerilemiştir(166). İmipramin verilen hasta grubunda ise benzer şekilde, tedaviden önce 19,4 olan değer, tedavi sonrasında 10,7’ye gerilemiştir. Ancak ekstre verilen grupta, imipramin grubuna göre daha az yan etki tespit edilmiştir. Bir randomize, çift körlü, çok merkezli çalışmada hafif-orta dereceli depresyonlu 162 hastaya 6 hafta süresince günde 2 kez 250 mg (günlük 1 mg hiperisine eşdeğer) St. John’s wort ekstresi (ZE 117) veya plasebo verilmiştir (116). Çalışmanın sonunda, plasebo alan hastaların %15’i ile karşılaştırılan, St. John’s wort uygulanan hastaların %56’sı tanımlanmış kriterlere göre cevap verenler şeklinde sınıflandırılmıştır. Advers etki gözlenen hasta proporsiyonları gruplar arasında

benzer çıkmıştır (sırasıyla St. John's wort için %7.4 ve plasebo için %6,2). Aynı pozitif sonuçlar, ZE 117 kodlu *H. perforatum* ekstresinin 6 hafta süresince uygulandığı ve imipraminle kıyaslandığı randomize, çift körlü ve çok merkezli başka bir çalışmada da tespit edilmiştir(172).

Bir randomize, çift körlü, çok merkezli deneyde orta depresyonlu 263 hastaya 8 hafta boyunca günde 3 kez 350 mg St. John's wort ekstresi (STEI 300, %0,2-0,3 hiperisin ve %2-3 hiperforin içeren; n=106), günde 100 mg imipramin (3 bölünmüş dozda:50 mg, 25 mg ve 25 mg; 1. gün 50 mg, 2-4. gün 75 mg; n=110) veya plasebo (n=47) verilmiştir (116). 6 haftalıkuygulamadan sonra *Hypericum* plaseboya göre daha etkili bulunmuştur, 8 haftalık uygulamadan sonra imipramin kadar etkili bulunmuştur. Ayrıca hem St.John's wort hem de imipraminin plasebonun yaptığından çok daha fazla uzunlukta hayat kalitesini arttırdığı gözlenmiştir. St. John's wort alanların %22'si, imipramin alanların % 46'sı ve plasebo alanların %19'unda advers olaylar bildirilmiştir.

Amerika'da DSM-IV kriterine göre major depresyonlu hastalarda St. John's wort ekstresi (günlük 900-1800 mg) ile SSRI sertralinin (günlük 50-150 mg) karşılaştırıldığı geniş bir plasebo kontrollü çalışma yürütülmüştür (116). Randomize, çift körlü kontrollü deneylerin yayınlanan özetlerinde, St. John's wort ekstresi plaseboya üstünlük sağlamıştır (116). Hafif orta depresyonda günlük 20 mg St. John's wort ve fluoksetin arasındaki efikasite ile (116) günlük 150 mg St. John's wort ve imipramin arasındaki (116) efikasitenin eşit olduğu bildirilmiştir.

St. John's wort ile SSRI' lerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, ICD-10 kriterine göre hafif-orta dereceli depresyonlu 60-80 yaş arası 161 hastaya 6 hafta boyunca günde 2 kez 400 mg St.John's wort ekstresi (LoHyp-57) ve 10 mg fluoksetin verilmiştir (116). Ekstrenin ne hiperisin ne de hiperforin içeriği çalışmanın yayımlanan bir raporunda bildirilmemiştir. Maruziyet peryodunun sonunda St. John's wort alanların %71,4'ü ve fluoksetin alanların %72,2' si tanımlanmış, önceden belirlenmiş kriterlere göre cevap vericiler olarak sınıflandırılmıştır. Hafif-orta dereceli depresyonlu hastaların alt gruplarından elde edilen veriler analiz edildiğinde hem St. John's wort hem de fluoksetin benzer efikasite göstermiştir. Advers reaksiyon gelişen hasta sayısı ekstre ve fluoksetin için sırasıyla 13 ve 17 olmuştur (116).

Hafif-orta dereceli depresyonlu ayakta tedavi alan 30 hastada yapılan randomize, çift körlü deneyde St. John's wort ekstresinin (LI 160; 600 mg/gün/hafta sonrasında 6

hafta boyunca 900 mg/gün) etkisi ile bir SSRI sertralin (1 hafta boyunca günlük 50 mg, sonra 6 hafta boyunca günlük 75 mg) karşılaştırılmıştır (167). Hamilton depresyon ölçeğinde (HDS)  $\geq 50$  azalma şeklinde belirlenen bir klinik cevap gözlenmiştir. Sertralin ve *Hypericum* alan hastaların sırasıyla %40 ve %47' sinde, iki ajanın eşdeğer olduğunu öne sürecektir şekilde gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak belirgin olmamıştır.

Hafif-orta dereceli depresyonlu hastaları içeren 27 randomize kontrollü denemede St. John's wort ekstresi çalışılmıştır (173). Bu deneylerin 17'sinde (1168 hasta içeren) St. John's wort ile plasebo karşılaştırılmıştır; diğer 10 denemede (1123 hasta içeren) St. John's wort ekstresi ile amitriptilin, imipramin, desipramin ve maprotilin gibi geleneksel antidepresanlar veya sedatif ilaçlar karşılaştırılmıştır. (8 çalışmada tek içerikli preparatlar kullanılırken, 2'sinde St. John's wort ve valerian kombinasyonu kullanılmıştır). St. John's wort 350-1800 mg arasında değişen dozlarda kullanılmıştır. Test edilen preparatların hiperforin içeriği bilinmemektedir. Birçok deney 4-6 hafta sürerken bazıları 3 ay sürmüştür. Meta analizleri sonuçları göstermiştir ki St. John's wort preparatları plaseboya göre hafif-orta dereceli depresif rahatsızlıkların kısa süreli tedavisinde anlamlı derecede üstünlük sağlamıştır. St. John's wort preparatları geleneksel antidepresan ajanlar kadar etkili bulunmuştur.

Depresif bozukluk yaşayan hastaların yer aldığı St. John's wort ekstresinin kullanıldığı randomize kontrollü deneyler yürütülmüştür (116). Bu deneylerin 6' sında hafif-orta dereceli depresif rahatsızlık gösteren 651 hasta yer almıştır. 2 deney plasebo kontrollü olarak yürütülmüş; 4'ünde St. John's wort ile standart antidepresanlar karşılaştırılmıştır. Çalışmalar 4-6 hafta sürmüş ve bitki ekstresinin günlük dozu 200-900 mg arasında değişmiştir. Uygulanan total hiperisin oranı günlük 0,75-2,7 mg arasında olmuştur. Bu meta analizi göstermiştir ki St. John's wort plaseboya üstünlük göstermiştir. Bu sonuç trisiklik antidepresanlarla gözlenenle benzerdir. Trisiklik antidepresanların St. John's wort preparatlarından daha yüksek bir yan etki proporsiyonuna sahip olduğu bildirilmiştir.

Yine randomize ve çift körlü bir klinik deneyde, majör depresyon tanısı konulmuş hastaların yer aldığı iki gruba, sertralin ve *H.perforatum* ekstresi uygulanmış ve her iki grupta da etkinin birbiri ile çokbenzerlik gösterdiği gözlenmiştir (115). Ancak sertralin verilen hasta grubunda yan etkinin daha çok miktarda görüldüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, plaseboyla kıyaslandığında,

HDS'deki toplam skoru %40'dan daha fazla azaltan *H. perforatum* ekstresi ile alınan sonuçlar uyumludur. Fakat yine majör depresyonlu hastalarda yapılan plasebo kıyaslamalı başka bir deneyde ise depresyon semptomlarını azaltmada *H. perforatum* ekstresinin etkili olmadığı bildirilmiştir(115).

Depresyonlu hastalar üzerindeki başka bir randomize, çifte körlü, plasebo-kontrollü çok merkezli bir çalışmada; WS 5573 ve WS 5572 kodlu *H.perforatum* ekstreleri, 42 gün süresince uygulanmış ve plasebo grubuna göre HDS'de toplam skoru %50 oranında azaltmıştır(148). Ancak bu çalışmada en iyi sonuç; WS 5573'e göre daha yüksek oranda hiperforin içeren WS 5572 ekstresinin denenmesi ile elde edilmiştir.

Lecrubier ve ark.'larının çift körlü, plasebo-kontrollü klinik çalışmasında da, WS 5570 kodlu *H. perforatum* ekstresi yine hafif ve orta şiddetli depresyon tanısı konmuş hastalarda denenmiş ve plasebo grubuna göre HDS' de dikkat çekici bir düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (174).

Öte yandan, bitkinin LI 160 kodlu ekstresinin sağlıklı kadınlara uygulamasından sonra, büyüme hormonunun plazma konsantrasyonlarında artma, prolaktin konsantrasyonlarında ise azalma tespit edilmiştir(175). Bu bulgu da, *H. perforatum* ekstresinin etki mekanizmasının dopaminle bağlantılı olduğuna dikkat çekmektedir. Sıçanlar üzerinde yapılan deneylerle de aynı neticeye ulaşılmıştır(143,176). Randomize olarak yürütülen bir çalışmada gönüllü 12 sağlıklı kadında hormon konsantrasyonları üzerine St. John's wort ekstresinin (LI 160S) tek dozu 600 mg, 300 mg veya plasebo etkisi araştırılmıştır (116). Plaseboyla kıyaslandığında bitki ekstresi (600 mg) dozlamadan sonra 30-60 dakika arasında kortizol sekresyonunu arttırmıştır. Bu durum bitkinin santral sinir sisteminde belirli nörotransmitterler üzerinde etkisinin olduğunu göstermektedir. 3 grup arasında ACTH, GH ve prolaktin salgılanması arasında hiçbir fark görülmemiştir. Szegedi ve arkadaşlarının randomize, çifte-körlü ve çok merkezli çalışmasında(177), WS 5570 kodlu ekstre majör depresyonlu hastalar üzerinde uygulanmış ve paroksetin ile kıyaslanmıştır. WS 5570'in 6 hafta süresince uygulanması neticesinde, HDS' de başlangıçta 22 olan değer, hastalarda 14, paroksetin grubunda ise 11,4'e kadar gerilemiş ve araştırmacılar tarafından WS 5570 ekstresinin en az paroksetin kadar etkili olduğu ve hatta daha iyi tolere edilebildiği sonucuna ulaşılmıştır.

*H. perforatum* ekstresinin antidepresan etkisi üzerindeki çalışmalar göstermektedir ki(178-180);

- ✓ Klasik antidepresanların neden olduğu yan etkilerden başağrısı, bulantı, seksüel disfonksiyon, insomnia, sedasyon, aritmi, kilo değişiklikleri ve kısa süreli hafıza kaybı vs bu bitkisel ilacın yol açtığı yan etkilere göre daha ağır seyrederek ve daha sık görülür.
- ✓ İlacın kullanımına son verilmesi ile “ilaç bırakma” semptomlarına neden olmadığı gibi alışkanlığa ve bağımlılığa da neden olmaz.
- ✓ En kaliteli uyku evresi olan REM’i olumsuz şekilde etkilemediği gibi çoğunlukla uyku düzenleyici etkisi tespit edilmiştir.
- ✓ Klasik antidepresanlarla kıyaslandığında alkol veya diğer ilaçlarla kullanımı neticesinde etkileşimi daha azdır.

*H. perforatum* üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, bitkinin standardize ekstresini içeren preparatlarının günlük 500-1000 mg arasında değişen dozlarda alınması ile hafif ve orta şiddetli depresyon tedavisinde olumlu etkisinin olabileceği şeklindedir(181).

#### **2.5.2.2. Yara iyileştirici etki**

*H. perforatum* yara iyileştirici bir ilaç olarak uzun süredir başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. *Hypericum* yağ infüzyonu geleneksel olarak yanıklar ve yaraların iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır. Etkisi antibakteriyel aktivitesiyle ilişkili olabilir (121). Bitkinin çiçekli tepe kısmı ve taze yapraklarının tentürü oral yoldan uygulandığında *Calendula* ( bir diğer yara iyileştirici bitki) taze yapraklarının çiçekli tepe kısmının dilüe edilmemiş tentürünün topikal uygulamasından daha etkili bulunmuştur. Kesik yaraları tedavi etmede epitelizasyon, *H. perforatum* uygulamasında 15 gün içinde; *Calendula* uygulamasında ise 16,5 gün içerisinde meydana gelmiştir (123).

Doğum sırasında sezeryan kesikleri olan 24 kadın hastada yapılan çalışmada kesik olan bölgede iyileşme *Calendula* yağ ekstresi ve *Hypericum* yağlarının kombinasyonunun kullanımı ile test edilmiştir. Tedavi grubundaki kadınların kesikleri %70 *Hypericum* ekstresi ve %30 *Calendula* ekstresinin yağlı kısımları karışımı ile topikal olarak tedavi edilmiştir. İkinci grup plasebo grubu olmuştur ve buğday ruşeym yağ ekstresi verilmiştir. Bütün hastalar 16 gün boyunca günde iki kez tedavi edilmiş;

cerrahi yaranın yüzey çevre alanı (SPA) tedaviden önce ve sonra ölçülmüştür. *Hypericum/Calendula* ile tedavi olan hastalar, plasebo grubundaki hastalara kıyasla ( yaklaşık % 16) cerrahi yaranın SPA' sında belirgin bir azalma ( yaklaşık % 38) göstermiştir (182).

*H. perforatum* ekstresinin yara iyileştirici etkisinin başlıca hasar gören alanı kapatarak yara iyileşmesinde rol oynayan fibroblast kollojen üretiminin stimülasyonundaki ve fibroblast hücrelerinin poligonal formlara aktivasyonundaki artışla alakalı olabilir (183).

Bir diğer çalışmada *H. perforatum*' un çiçekli toprak üstü kısmının zeytinyağı ekstresinin in vivo eksizyon ve insizyon modellerine uygulanarak yara iyileştirici etkisi incelenmiştir. Antiinflamatuvar aktivite için kapiler permeabilitede asetik asit indüklü artışın inhibisyonuna dayanan bir in vivo model kullanılmıştır. Sonuçlar *H. perforatum* zeytinyağı ekstresinin eksizyon ( %5.1-82.6 inbisyon) ve insizyon ( %20.2-100.0 inihbisyon) modeli yaralarında mükemmel bir yara iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Toprak üstü bölümlerin etanol ile ekstraksiyonu ve daha ileriki fraksiyonasyon, etil asetat altekstresinin eksizyon modelinde yaraları % 17.9 ve % 100 oranında ve insizyon modelinde %9.4 ile %100 arasında inhibe eden en aktif fraksiyon olduğunu göstermiştir (184).

Süntar ve ark. daha etkili bir yara iyileştirici aktivite sağlamak için yeni bir merhem formülasyonu geliştirmişlerdir. Formülasyonun içeriği şu şekildedir: *H. perforatum* çiçekli toprak üstü kısımlarının zeytinyağı ekstresi, *Origanum majorana* ve *Origanum minutiflorum* uçucu yağlarının eşdeğer karışımı ve *Salvia triloba* uçucu yağı. Bu çalışmanın amacı histopatolojik yöntemlerle beraber in vivo ve in vitro modeller kullanarak bu yeni formülasyonun yara iyileştirici etkisini değerlendirmektir. Bunun için rat ve fareler üzerinde in vivo yara iyileştirici deneysel modeller geliştirilmiştir ve etkisi bir referans merhem Madecassol® ile karşılaştırılabilir bir şekilde incelenmiştir. Her bileşenin iyileştirici aktivitesi, formülasyonun yara iyileştirici kapasitesindeki gelişmeleri değerlendirmek için tek tek araştırılmıştır. Bu formülasyon ve *Hypericum perforatum*, Madecassol® ile karşılaştırıldığında her iki yara modelinde de en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Ancak diğer içerikler herhangi bir belirgin yara iyileştirici etki göstermemiştir. Ancak formülasyonun efikasitesi, yalnız *H. perforatum* merheminden çarpıcı şekilde yüksek olmuştur ve bu durum histopatolojik değerlendirmelerle

doğrulanmıştır. Diğer taraftan formülasyon in vitro elastaz aktivitesini azaltmamıştır fakat kollajenaz aktivitesini inhibe etmiştir. Karışım ayrıca bakterisidal ve fungisidal aktivite göstermiştir (185).

*H. perforatum* total ekstresinin merhemi hazırlanarak Wistar ratlar üzerinde lineer insizyon, sirküler eksizyon ve termal yanıklar için deneysel yara modelleri yürütülmüştür. Amaç merhemın iyileştirici özelliklerini araştırmaktır. 21 gün boyunca topikal uygulama yapılmıştır. Klinik ve makroskopik değerlendirmeler, yara kontraksiyon oranı, re-epitelizasyon süresi ve histopatolojik gözlemlerle gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki; test edilen merhem, deri yaralarında belirgin bir iyileştirici etkiye sahiptir ve kullanım için uygun bulunmuştur (186).

Diyabetlilerde gecikmiş yara iyileşmesi süreci en önemli endişelerden biridir. Yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma olarak dört aşamaya sahiptir. Başarılı bir onarım için tüm bu dört faktörün düzgün bir şekilde meydana gelmesi gereklidir. Bu yüzden stereolojik metodlar kullanılarak tam kalınlıkta diyabetik deri yaraları üzerinde *H. perforatum*' un iyileştirici etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. 48 dişi diyabetik rat randomize olarak dört gruba (n=12) bölünmüştür: jel baz uygulanan grup, *H. perforatum* %5 jel uygulanan grup, *H. perforatum* %10 jel uygulanan grup ve hiçbirşey uygulanmayan kontrol grubu. Hayvanların boyunlarında 1 cm<sup>2</sup> lik tam kalınlıkta yara oluşturulmuş ve yara bölgesi her üç gün ölçülmüştür. Hayvanlar öldürüldükten sonra deri örnekleri alınmış ve stereolojik değerlendirmeler için hazırlanmıştır. Sonuç olarak, *Hypericum perforatum* uygulanan grup, kontrol ve taşıyıcı gruba kıyasla daha hızlı yara kapama oranına sahip olmuştur (p<0.05). Ayrıca *Hypericum perforatum* gruplarında fibroblastların sayısal yoğunluğu, kollajen demetlerinin hacim yoğunluğu ve damarların ortalama çap ve hacim yoğunlukları kontrol ve taşıyıcı gruba kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olmuştur. Çalışmanın sonuçları göstermiştir ki; *H. perforatum*, fibroblast proliferasyonunu, kollajen demet sentezi ve revaskülarizasyonu arttırarak doku rejenerasyonunu geliştirme yeteneğine sahiptir (187).

*H. perforatum* muamelesinin termal yanıklardaki etkisini araştırmak ve gümüş sülfadiazin tedavisi ile karşılaştırmak için Kıyan ve ark. bir araştırma yapmışlardır. Ratlarda yapılan deneyde, *H. perforatum* uygulanan grupta kollajen renk bozukluğunun epidermal tabakanın az bir bölümünde lokalize olduğu ve dermisin derinlerine inmediği

gözlenmiştir. Epidermis, kıl folikülleri ve yağ bezlerinin deneyin her saatinde uygulanan yanık, jel ve gümüş sülfadiazin gruplarıyla karşılaştırıldığında korunduğu gözlenmiştir ve yapı olarak hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubuna en yakın grup *H. perforatum* uygulanan grup olmuştur. Sonuç olarak ilk 24 saat içinde dört kez *H. perforatum* uygulaması deneysel termal ikinci derece yanıklarda yara iyileşmesinde net bir şekilde etkili olmuş ve gümüş sülfadiazine göre üstünlük sağlamıştır (19).

Topikal *H. perforatum*' un timpanik membran perforasyonu yapılan bir rat modelinde tedavi edici rolü histopatolojik yolakla araştırılmıştır. Çalışmada 30 dişi Sprague –Dawley ratlar kullanılmıştır. *H. perforatum* ekstresi saf zeytinyağı içerisinde süspansiyon olarak hazırlanmıştır. Bütün ratlarda sağ ve sol timpanik membranlarda mikroskop altında ince bir delik açılmıştır. Ratlar randomize olarak üç gruba ayrılmıştır. Grup 1' de *H. perforatum* ekstresi günlük damla olarak verilmiştir; Grup 2' de zeytinyağı günlük tek başına verilmiştir ve 3. grupta ratlar hiçbir müdahale olmaksızın spontan iyileşmeye bırakılmıştır. Her gruptan üç rat 7., 14. ve 21. günlerde öldürülmüş; temporal bölümleri fibroblast proliferasyonu, lökosit infiltrasyonu, neovaskülarizasyon ve subepitelyal kalınlığı değerlendirmek ve gruplar arasında karşılaştırma yapmak için ayrılmıştır. Histopatolojik değerlendirmeler göstermiştir ki; lökosit infiltrasyonu, fibroblast proliferasyonu ve subepitelyal kalınlıkta 7. 14. ve 21. günde alınan örneklerde belirgin farklılıklar olmuştur. Gruplar arasında neovaskülarizasyon açısından anlamlı bir fark olmamıştır. Spontan iyileşme grubu ile karşılaştırıldığında *H. perforatum*' un timpanik membran yara iyileşmesi modelinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Böylelikle bitkinin ototoksikite açısından güvenli olduğu gösterilirse klinikte kullanılabilirliği düşünülmektedir (188).

Soğuk zorlandırılmış yüzme yöntemiyle ratlarda femur ve alt çene kemiği kütledeki değişimler üzerine *H. perforatum*' un etkisi araştırılmıştır ve *H. perforatum* uygulamasının stress yaralarını iyileştirdiği saptanmıştır. Kemik kütle yoğunluğu normal değerlerine kavuşmuştur. Bitkinin bunu östrojen benzeri etkilerle gerçekleştirdiği düşünülmektedir (189).

Yücel ve ark. ilk kez bir yoğun bakım ünitesi hastasında St. John's wort' un yağlı ekstresinin baskı yaralarının tedavisindeki yararlı etkilerini gösteren bir vaka çalışması yapmışlardır. *H. perforatum*' un yağlı ekstresi yara bakım ve tedavisi için 40 gün boyunca günlük olarak yoğun bakım ünitesindeki gönüllü bir hastaya

uygulanmıştır. Belirli aralıklarda yara boyutu ve durumları ile başlangıç ve son tedavi tarihlerinde alınan doku bölümlerinin histopatolojik değerlendirilmesi ölçülerek iyileşme durumu makroskopik olarak monitörize edilmiştir. Makroskopik ve histopatolojik deneylerden elde edilen sonuçlar St. John's wort yağlı ektresinin baskılı yaraların tedavisinde belirgin bir etkiye sağladığını göstermiştir. Bu nedenle bu ekstrenin yoğun bakım ünitesindeki hastalarda bu tarz yaraların önlenmesi ya da tedavisinde uygun maliyetli bir seçenek olabileceği öne sürülmüştür (190).

2017 yılında yapılan bir araştırmada, oral ve topikal uygulamalar karşılaştırılarak St. John's wort' ün diyabetik Sprague-Dawley ratlardaki yaralara etkisi değerlendirilmiştir. Oral yoldan uygulanan bitkinin problemlili yaralarda, topikal kullanılan bitki ve zeytinyağına göre daha fazla pozitif etkiler gösterdiği bulunmuştur. *H. perforatum* daha hızlı bir antiinflamatuar cevap ve daha iyi bir iyileşme sağlamıştır. Bu durum, bitkinin diyabetik yaralardaki klinik kullanımıyla ilgili önemli bir bulgudur (191).

*Achillea millefolium* ve *H. perforatum* merhemlerinin, ilk kez hamile kalıp tek çocuk doğuran kadınlardaki epizyotomi yaralarının iyileşmesi üzerine etkililiği değerlendirilmiştir. Bu çalışma 140 kadın üzerinde gerçekleştirilen çift körlü klinik denemedir. Kadınlar randomize olarak dört gruba ayrılmıştır. Her grupta 35 kadın bulunmaktadır. İki kontrol grubunda müdahale edilmeyen ve plasebo merhemi uygulanan kadınlar bulunmaktayken iki vaka grubu *H. perforatum* ve *A. millefolium* merhemi kullanan kadınları içermiştir. İyileşme süreci, doğumdan sonraki 7., 10. ve 14. günlerde kızarıklık, ekimöz, ödem, boşaltım ve yara açılması özelliklerine bakılarak değerlendirilmiştir. Ağrı seviyesi ise görsel analog skala ortalaması ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında doğum sonrası 7., 10. ve 14. günde ağrı seviyesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Kızarıklık ve ödem doğum sonrası 7. ve 10. günde ve ekimöz doğum sonrası 7. günde farklılık göstermiştir. Bitkileri kullanan gruplardaki kızarıklık, ağrı seviyesi, ödem ve ekimöz kontrol gruplarına kıyasla daha düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Fakat yara boşalması ve açılma insidensi arasında farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ )(192).

### 2.5.2.3. Antibakteriyel etki

Literatürde *H. perforatum* ham bitki ekstresinin in vitro antibakteriyel aktivitesini önemseyen yaraların, deri ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde bitkinin geleneksel kullanımını destekleyen pekçok çalışma mevcuttur (123). Hiperforinin *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bileşenin çoklu ilaç dirençli *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Corynebacterium diphtheria* Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ancak hiperforinin antibakteriyel etkilerinin sadece yüksek konsantrasyonlarda gözlemlendiği önemle belirtilmiştir. Hiperforin *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilere veya *Candida albicans*' a karşı hiçbir büyüme inhibitörü etki göstermemiştir (123).

Ekstreler staphylococci, shigella ve *E. coli*' ye karşı dekoksasyonlardan daha aktif olmuş (193) ve Gram pozitif bakterilere karşı Gram negatif bakterilerden daha belirgin aktivite göstermiştir (194,195). Mazandarani ve ark. (196) *H. perforatum* çiçekli toprak üstükısımlarının etanollü ekstresinin Gram pozitif bakterilere karşı (*Enterococcus faecalis* ve *S. aureus* PTCC 1112), ya hiç aktivite göstermeyen ya da sadece minimal aktivite gösteren Gram negatif bakterilerden (*Salmonella typhi* PTCC 1595, *Shigella dysenteriae* PTCC 1188, *Yersinia enterocolitica* PTCC 1151, *E. coli* PTCC 1330 ve *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074) daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Conforti ve ark. (197) tarafından yapılan bir çalışmada metanollü ekstrenin 50µg/mL bir MIC değeri ile Gram pozitif bakterilere karşı en iyi performansı gösterdiği kanıtlanmıştır.

*H. perforatum*' un farklı ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi, Gram pozitif (*Staphylococcus oxford*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sanguis*) ve Gram negatif bakterilere (*Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*) karşı test edildiği zaman farklı ekstreler arasında aktivitede çeşitlilikler göstermiştir. Agar plaklarında petrol eteri ekstresi *P. aeruginosa* (0.04 ml/disk) ve sıvı besiyeri kültüründe 310 µg/ml MIC değeri ile *S. aureus*, *S. oxford*, *S. mutans* ve *S. sanguis*' e ve 1250 µg/mL' de *E. coli* ve *P. vulgaris*' e karşı aktif olmuştur. Kloroform ekstresi *S. oxford*, *S. aureus* ve *S. mutans* (0.04 mL/disk)' e karşı aktif olmuştur. Methanol ekstresi *E.coli*, *P.vulgaris*, *S. mutans* ve *S. sanguis*' e ve sıvı besiyeri kültüründe *S. oxford* (MIC 62 µg/mL) ve *S. aureus* (MIC 1250µg/mL)' a karşı aktivite göstermiştir. Sulu ekstre yalnızca *S.*

oxfordüzerinde aktif olmuştur. Sonuçlar göstermiştir ki organik çözücüler antibakteriyel bitki komponentlerini ekstre etmede sudan daha uygundur (198).

Farklı çözücü kombinasyonlarında ( su/ alkol/glisero; su/ alkol; alkol/ gliserol) *H. perforatum* ekstresinin anti-stafilokokal aktiviteleri *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. saprophyticus* ve deri piyoinflamatuar hastalığı olan hastalardan izole edilen bakterilerin referans dizilerine karşı analiz edilmiştir. Su/ alkol/ gliserol ekstrere en çok aktif olan çözücü kombinasyonu olmuştur (199).

Amonyak solüsyonu ve %70 etanol ekstraksiyonuyla hazırlanan *H. perforatum* preparatlarında hastalıklı hayvanlardan elde edilen Gram pozitif ( *S. aureus* ve *S. pyogenes*) ve Gram negatif ( *Pasteurella haemolytica*, *E. coli* ve *P. vulgaris*) bakterilerin büyümesi üzerine 1:4-1:160 dilüsyonlarda antimikrobiyal etkileri çalışılmıştır (200).

*H. perforatum* çiçekli toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrere ve fraksiyonların *Helicobacter pylori*' nin standart ve klinik izolatlarına karşı anti helikobakter aktivitesi denenmiştir. Ekstreler 1.95 ve 250 µg/mL arasında MIC değerleri ile aktivite göstermiştir (123). Benzer bir çalışmada, bitki ekstresinin bütanol fraksiyonu 15.6 ve 31.2 µg/mL MIC değerleri ile anti *H. pylori* aktivitesi ortaya koymuştur (194).

Meral ve Karabay (201) *H. perforatum* metanollü ekstresinin 1000 µg/mL konsantrasyonda Gram pozitif (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 65381/P, *S. epidermis* ATCC 12228 ve *E. faecalis* ATCC 29212) ve Gram negatif (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. cloacae* ATCC 13047, *E. coli* ATCC 29998 ve *E. coli* ATCC 8737) bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini bildirmişlerdir.

Su ve %10 ve %30 su/etanol (v/v) solüsyonları ile hazırlanan *H. perforatum* ekstrerelerinin dört test bakterisine karşı antagonistik özellikleri değerlendirilmiştir. *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus plantarum* ve *E. coli* insan kalın bağırsağından izole edilmiştir. En yüksek inhibitör özellik %30 etanol solüsyonu ile gözlenmiştir (202).

*H. perforatum* ekstresinin antibakteriyel aktivitesine mevsimsel değişikliklerin etkisini belirlemek amacıyla bir Gram pozitif ( *S. aureus*, ATCC 12600) ve iki Gram negatif (*E. coli*, ATCC 8677 ve *P. aeruginosa*, ATCC 9721) bakteri zincirine karşı donmuş bitki materyalinden hazırlanan *H. perforatum* sulu etanollü ekstresinin

antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Ekstreler test edilen bütün zincirlere karşı aktivite göstermiştir. Çalışma göstermiştir ki; antimikrobiyal aktivite derecesi toplama zamanından etkileniyor görünmektedir. Temmuz' da toplanan örnekler antimikrobiyal aktivite göstermemiş; fitokimyasal üretimin mevsimsel varyasyonunun bu türlerde meydana geldiğini gösterecek şekilde Ağustos' ta toplanan örnekler aktif olmuştur (203).

#### **2.5.2.4. Antifungal etki**

Milosevic ve ark. (204), spor sayma metodunu kullanarak *H. perforatum* etanollü ekstresinin 5-45 mg/ml konsantrasyonlarda *Fusarium oxysporum* ve *Penicillium canescens* mantarına karşı antifungal aktivitesini araştırmışlardır. 45 mg/ml konsantrasyon ,  $1 \times 10^2$  CFU/ ml spor ön inokülasyonu ile *F. oxysporum* için beş spor ve *P. canescens* için 15 sporda spor sayısını azaltarak en yüksek fungustatik aktiviteyi göstermiştir.

Maskovic ve Solujic (205) dilüsyon (MIC) ve mikroskopik metodlar kullanarak *H. perforatum* etanol ekstresinin *P. canescens* ve *F. oxysporum* büyümesinin inhibisyonu üzerindeki etkililiğini değerlendirmişlerdir. İki fungal dizi için ekstrenin MIC' si 10 mg/ml idi. Ekstre konsantrasyonundaki bir artma her iki mantarda- *P. canescens*' te %62' den fazla (ekstre konsantrasyonu 0-45 mg/ml, spor sayısı 104' ten 40 CFU/ml' ye düştü) ve *F. oxysporum*' da % 72' den fazla ( ekstre konsantrasyonu 0-45 mg/ml, spor sayısı 100' den 24 CFU' ya düştü) spor sayısında bir azalma oluşturduğunu göstermiştir. *H. perforatum* ekstresinin daha yüksek konsantrasyonları antifungal etkiler göstermiştir.

#### **2.5.2.5. Antiviral etki**

Hiperisin viral enfeksiyonların fotodinamik tedavisinde kullanılan iyi bilinen bir fotosensitize edici ajandır. Fotodinamik terapi, bileşenlerin absorpsiyon dalga boyunda fotosensitize edici ajan ve görünür ışığın kombinasyonunu içerir. Veziküler stomatit, *influenza* virüsü ve tip 1 ve tip 2 *Herpes simplex* virüsüne karşı hiperisin ve psödohiperisinin inhibitör etkisi gösterilmiştir (206). Hiperisinin farelerde Friend lösemi virüsü ile radyasyon lösemisi virüsüne karşı güçlü antiretroviral etkisi olduğu gösterilmiştir (207). Aynı çalışmada, Moloney fare lösemi virüsüne (Mo-MuLV) karşı

da oldukça potent inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir ( $IC_{50}=6 \mu\text{g/ml}$ ). Ancak hiperisin *H. simplex* virüs, *influenza A*, *adenovirus* ya da *polivirüs*' ten herhangi birine selektif etki göstermemiş ve bu virüslere karşı %50 sitotoksik konsantrasyonunun 25  $\mu\text{g/ml}$  civarında olduğu bulunmuştur. Hücreler enfekte edilmeden önce, hiperisin ile inkübasyona bırakılmış ve *H.simplex*, *influenza A*, *adenovirus*,*polivirüs* ve Mo-MuLV ile enfekte edildikten sonra bunlardan 'zarflı virüsler' olarak bilinen *Herpes simplex*, *influenza A* ve Mo-MuLV adlı üç virüse karşı 1.56 ile 25  $\mu\text{g/ml}$  arasında değişen virüsidal etki saptanmıştır. Ancak "zarfsız virüsler" olan *adenovirus* ile *polivirüs* üzerinde herhangi bir virüsidal etkiye yol açmamıştır. Daha sonra antiretroviral etkisi olduğu tespit edilen hiperisin ile sentezlenen bazı değişik türevlerinin at enfeksiyöz anemi virüsüne karşı %99.99 oranında inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (208). Ancak hazırlanan türevlerin hiçbiri virüsidal etki göstermemiş ve araştırmacılar tarafından hiperisin ana iskeletinin antiviral aktivite için gerekli olduğu belirtilmiştir. Hudson ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise (209) hiperisinin özellikle floresan ışık altında yapılan bir deneyde fare sitalomegalovirüsü (MCMV), Sindbis virüsü ve insan immün yetmezlik virüsüne (HIV-1) karşı antiviral etkisi incelenmiş ve Sindbis virüsünün MCMV' ye oranla ışığa daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. MCMV ile enfekte edilmiş hücrelere hiperisin ilave edildiğinde, inhibisyon gözlemlendiği ve inhibisyonun özellikle ilk iki saat içinde çok kuvvetli olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen bir diğer benzer çalışmada (210), hiperisinin HIV-1' e karşı antiviral etkisi ışık varlığında incelenmiş; doz bağımlı ve ışık şiddeti bağımlı antiviral etkisi çalışılmıştır. Alınan sonuçlar, hiperisin tarafından HIV-1' in tamamen inaktif edilmesinde ışığın zorunlu olduğuna işaret etmiştir. Çünkü hiperisin sadece ışık varlığında belirgin sitotoksik seviyeye ulaşmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada hem hiperisin hem de psödohiperisinin ışıklı ortamda singlet oksijen oluşumu ile viral füzyonu önlediği gösterilmiştir (206).

Hiperisinin hepatit B virüs ailesine mensup olan kaz hepatit B virüsüne (DHBV) karşı etkisi incelenmiş; hiperisinle bir saat inkübasyona bırakılan hücreler DHBV ile enfekte edilmiş ve bileşik birkaç gün boyunca vasatta virüs üremesini önlemiştir (211). Yine de araştırmacılar tarafından virüsidal etkisinin zayıf olduğu, ancak viral morfojenizin son aşamalarında etkisini gösterdiği bildirilmiştir. Hiperisinin antiviral etkisinin foto indüklü olup olmadığının denendiği bir çalışmada ise (212), bileşiğin hem

oksijenli hem de hipoksik koşullar altında antiviral etkisi incelenmiş ve her iki ortamda eşit aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla hiperisinin antiviral etkisinin oluşumunda çok büyük olmasa da singlet oksijen molekülünün bir rolü olabileceği görüşüne varılmıştır.

HIV gibi retrovirüslere karşı antiviral aktivite, bitkinin fotodinamik ve lipofilik özelliklerinin kombinasyonu ile gerçekleşir. Hiperisin, hücre membranlarını ve revers transkriptaz aktivitesini düzeltmesini önleyen viral proteinleri çapraz bağlayarak antiviral aktivite sergilemiştir (206).

Yunanistan’ da doğal olarak yetişen *H. perforatum*’ un metanollü ekstresi ve kromotografik işlemler neticesinde elde edilen alt fraksiyonları insan sitomegalo virüsüne karşı test edilmiş ve 3 nolu fraksiyonun 38 µg/ml konsantrasyonda %100 antiviral aktiviteye sahip olup, referans olarak kullanılan gansiklovirden daha iyi etki gösterdiği saptanmıştır (213).

Hiperisinin HIV ve hepatit C’ ye karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilmektedir. St. John’s wort ekstresi alan HIV-pozitif hastalarda yapılan pek çok kontrolsüz çalışmada, bazı hastalarda CD4 hücre sayısında artma gibi immünolojik ve klinik faydalar bildirilmiştir. Bir faz I, artan doz çalışmasında 350 hücre/mm<sup>3</sup>’ den az sayıda CD4 hücreli 30 HIV-pozitif hastaya haftada 2 kez 0.25 veya 0.5 mg/kg vücut ağırlığı; haftada 3 kez 0.25 mg/kg vücut ağırlığı intravenöz sentetik hiperisin veya günlük 0.5 mg/ kg oral hiperisin verilmiştir. Toksik etkiler ve fototoksiteden dolayı 16 hasta tedaviye son vermiştir. HIV p24 antijen seviyesinde belirgin değişimler, HIV titrasyonu, HIV RNA kopyası ve CD4 hücre sayısı ile belirlenen anti-retroviral aktivite gözlenmiştir (116).

İnfluenza A/PR/8/34 H1N1 virüsüne maruz kalan A549 akciğer epitelyal hücrelerde ve BALB/c farelerde *H. perforatum* ekstresinin immün-regülatör etkisi değerlendirilmiştir. A549 hücrelerinde, ekstre (30 µg/ml) influenza virüsü indüklü monosit kemotaktik protein (MCP)-1 ve interferon- $\gamma$  indüklü protein 10 kD (IP-10)’ yi belirgin şekilde inhibe etmiştir; fakat interlökin-6 (IL-6)’ yi dramatik bir şekilde arttırmıştır. 10<sup>7.9</sup> EID<sub>50</sub> İnfluenza A/PR/8/34 H1N1 (yüksek doz) ile intranazal inoküle edilen farelerde 110 mg/kg vücut ağırlığında *H. perforatum*’ un günlük oral uygulanması; akciğer viral titrasyonu, bronkoalveolar lavaj (BAL), proinflamatuvar sitokin ve kemokin seviyeleri ve inokülasyondan 5 gün sonra akciğerlerdeki

proinflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu etanol verilen farelere kıyasla arttırmıştır. Sitokin sinyalizasyon 3 supresör (SOCS3) transkripsiyonu, hem A549 hücrelerde hem de BALB/c farelerde *H. perforatum* ekstresi ile artmıştır. Antiviral immün cevabı engelleyen bu durum, etkisiz viral geçiş ve artmış akciğer inflamasyonuna neden olmuştur. Fareler daha düşük dozda ( $\sim 10^{5.0}$  EID<sub>50</sub>) inoküle edildiğinde *H. perforatum* uygulaması, vücut ağırlığını etkilemeksizin viral titrede ufak bir azalmaya neden olmuştur ve *H. perforatum* enfeksiyonun daha geç fazında uygulanmıştır. Fareler, *H. perforatum* ekstresi verildiğinde influenza virüsünün yüksek dozu ( $10^{7.9}$  EID<sub>50</sub>) ile intranasal muamele gördüğünde, daha yüksek mortalite göstermiştir. Sonuç olarak, *H. perforatum* ile SOCS3 artışı influenza virüsüne karşı immün savunmaya zarar vermekte ve daha yüksek mortaliteye sebep olmaktadır (214).

#### 2.5.2.6. Antioksidan etki

2001 yılında bildirilen bir çalışmada(215); hiperisin üzerinden standardize edilen Nature Plus® ve hiperforin üzerinden standardize edilen Movana® adlı tablet formundaki preparatların toz edilip, distile su ve alkali solüsyon (pH=13, NaOH) ile elde edilen çözeltilerinden; 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:7,5, 1:10 ve 1:20 oranlarda dilüsyonlar hazırlanmış ve ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından yaratılan süperoksit radikaline karşı antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Hiperisin preparatının 1:1 oranında hazırlanan konsantrasyonunda önemli bir prooksidan etki gözlenirken, 1:2,5 oranındaki konsantrasyonun altındaki tüm konsantrasyonlarda doz-bağımlı olarak güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Hiperforin preparatı ile de benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen, hiperisin preparatının daha yüksek etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmanın devamında bu preparatlar insan plasenta venleri üzerinde de antioksidan etkileri açısından denenmiş ve süperoksit radikali ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

*H. perforatum*'un etanollü ekstresinin sıçanlarda, skopolamin-indüklü amnezi üzerindeki etkisini denemek üzere yapılan bir çalışmada; beyindeki oksidatif stres durumu da incelenmiştir(216). Oksidatif stresin biyokimyasal parametreleri olarak malondialdehit (MDA), GSHPx, GSH ve SOD seviyeleri ölçülen sıçanlarda, skopolamin uygulanmasından sonra MDA seviyesinin yükseldiği GSH seviyesinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Aynı deneyde yapılan pasif-kaçınma testinde, skopolamin-indüklü hafıza kaybının giderilmesinde de etkili olduğu tespit edilen bitkinin ekstresinin

güçlü antioksidan özelliği de göz önüne alınarak, depresyonlu demans hastalarında ciddi anlamda fayda sağlayabileceği bildirilmiştir.

Aralarında *H. perforatum*' un da bulunduğu birçok bitkinin yer aldığı bir tarama çalışmasında, bitkilerin antioksidan etkisi insan aktif nötrofilleri kullanılarak yaratılan bir dizi reaktif oksijen radikalleri üzerinde en kuvvetli antioksidan etkiyi gösteren bitki olarak saptanmıştır(217).

Bir diğer çalışmada; *H. perforatum*' dan hareketle hazırlanan etanollü ekstrede kolorimetrik yöntemle toplam flavonoit miktarı tayin edilmiş, ayrıca LC-MS analizi ile ekstrede rutin, hiperozit, izokersitrin, avikularin, kersitrin ve kersetin olduğu tespitine varılmıştır(218). Ekstrenin antioksidan etkisi de 1,1-difenil pikril hidrazil (DPPH) ve süperoksit radikallerini süpürme gücü üzerinden incelenmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 10,63 mg/ml and 54,3 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Ekstre ile indirgeme gücü arasında lineer bir korelasyon olduğu da gözlenmiştir ( $r^2=0,9991$ ). 150 µg ekstre ilavesi ile, 84 saatlik inkübasyondan sonra linoleik asit peroksidasyonu üzerinde görülen güçlü inhibitör etkiye, hidroksil ve peroksil radikalleri üzerinde de rastlanmıştır. Ayrıca güçlü metal şelat yapıcı etkisi de tespit edilen ekstrenin, bu çalışmada değişik mekanizmalar üzerinden etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir. *H. perforatum*' dan izole edilen altı adet flavonoidin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi üzerindeki inhibitör etkisi, sıçan kan ve beyin homojenatlarında spektrofotometrik olarak incelenmiştir(219). Buna göre; kersetin ve hiperozit konsantrasyon-bağımlı olarak enzim inhibisyonu yapmışlar ve hiperozitte bulunan galaktoz grubunun, NOS inhibisyonu üzerindeki selektif etkisi üzerinde önemli bir rolü olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

*H. perforatum* standardize ekstresinin (SHP) lipit peroksidasyon inhibisyonu, hidroksil radikali süpürücü aktivitesi ve DPPH ile etkileşimi açısından serbest radikal süpürücü ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. SHP' nin 1ve 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonları, rat beyin korteks mitokondrisinde Fe<sup>2+</sup>/askorbat veya NADPH sistemi ile indüklenen lipit peroksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Sonuçlar SHP' nin DPPH radikalini doz bağımlı olarak süpürdüğünü ve ayrıca ksantin oksidaz aktivitesi üzerinde inhibitör etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>indüklü oksidatif hasara karşı standardize ekstrenin koruyucu etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromide (MTT), laktat dehidrojenaz (LDH) deneyleri, kaspaz-3 enzim aktivitesi ve reaktif oksijen türlerinin akümüasyonu

aracılığıyla hücre canlılığı ölçülerek araştırılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye (300 µM) 8 saat maruziyeti takiben hücre yaşamsallığında belirgin bir redüksiyon gözlenmiştir. Bu durum 1-100 µg/ml SHP ile (24 saat preinkübe edilen) belirgin şekilde önlenmiştir. Aynı bir deneyde, standardize ekstrenin farklı konsantrasyonları (0.1-100 µg/ml) kaspaz-3 aktivitesindeki artışı azaltmış ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü reaktif oksijen türleri oluşumunu baskılamıştır. Tüm bu sonuçlar göstermiştir ki; SHP serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonunun inhibisyonu aracılığıyla hem in vitro hem de bir hücre sisteminde aktiviteye sahiptir (220).

*H. perforatum*' un etanollü ekstresi ve fraksiyonlarının antioksidan etkileri ve toplam fenol miktarları tespit edilmiş ve fraksiyonların HPLC/DAD/MS/MS ile kromatografik profili incelenmiştir(221). Buna göre, bitkide kemferol 3-rutinozid ve rutinasetilin varlığı ilk defa gösterilmiş ve ekstrenin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi tespit edilmiştir. Flavonoit ve kafeilkinik asit taşıyan fraksiyonların, ekstrenin DPPH radikal süpürücü etkisinden başlıca sorumlu bileşikler olduğu tespiti yapılmıştır. Bunun yanı sıra, askorbat/Fe<sup>+2</sup> ile indüklenen lipit peroksidasyon üzerindeki etkisi ise flavon aglikonlarını içeren fraksiyonlarda yüksek oranda görülmüş, ancak hiperisin ve hiperforin'in ekstrenin antioksidan etkisine pek katkısının olmadığı bildirilmiştir.

Bulgaristan'da halk arasında kullanılan çeşitli bitkilerin sulu ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada (222); *H. perforatum*'un Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi (TEAC) değeri 3,74±0,14 mM, toplam fenol miktarı ise kersetin eşdeğeri olarak 881,93±6,68 mM olarak elde edilmiş ve taramadaki en yüksek antioksidan kapasiteye sahip bitkilerden biri olduğu belirtilmiştir.

Aralarında *H. perforatum*'un da bulunduğu Balkanlar'da yetişen 9 adet *Hypericum* cinsine ait metanollü ekstrele ait toplam antioksidan kapasitesi,  $\alpha$ - tokoferol eşdeğeri olarak ölçülmüş ve yapraklar ile çiçeklerdeki flavonoit içeriği (%7,4 ve %11,7 sırasıyla) ve antioksidan etki arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (223).

Paola ve ark. farelerde zimozan (500 mg/kg, tuz süspansiyonu olarak i.p. uygulanmıştır)' in neden olduğu çoklu organ disfonksiyonunun gelişimi üzerine *H.perforatum* ekstresinin etkilerini araştırmışlardır. Farelerin organ hasarı ve sistemik inflamasyonu, zimozan ve/veya *H. perforatum* ekstresi uygulandıktan sonra 18 saat değerlendirilmiş ve 12 gün boyunca izlenmiştir (vücut ağırlığı kaybı ve mortalite için).

Farelerin bitki ekstresi (30 mg/kg i.p. zimoandan 1 ve 6 saat sonra) ile muamelesi zimoanın neden olduğu peritoneal eksudasyon ve polimorfonükleer hücrelerin migrasyonu, pulmoner intestinal ve pankreatik hasarı, renal disfonksiyonu ve akciğer ve bronşlardaki miyeloperoksidaz artışını azaltmıştır. iNOS, nitrotirozin ve poli (ADP-riboz)(PAR) için yapılan immünohistokimyasal analizler, *H. perforatum* almış zimoan enjekte edilen farelerden elde edilen akciğer ve bağırsak dokularında pozitif lekeler ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma ile *H. perforatum* ekstresinin farelerde zimoan indüklü çoklu organ disfonksiyonunun derecesini azalttığı ilk kez gösterilmiştir (224).

MTT deneyi, LDH salım deneyi, akış sitometri analizleri ve DNA fragmentasyon deneyi ile rat feokromasitoma PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü apoptoza karşı *Hypericum perforatum*'un flavonoid içeriği zengin ekstresinin (FEHP) koruyucu etkileri araştırılmıştır. PC12 hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 4 saatlik muamelesini takiben, hücre canlılığında anlamlı bir azalma ve LDH salımında anlamlı bir artma gözlenmiştir. Ancak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' den önce FEHP ile önceden muamele hücre canlılığını arttırmış, LDH salımını ve apoptotik hücre oluşumunu azaltmıştır. Ayrıca, DNA fragmentasyon deneyinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü apoptotik DNA fragmentasyonu yoğunluğu doz bağımlı bir yolakla inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki FEHP, PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşan apoptoza karşı koruyucu etkilere sahiptir ve Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi oksidatif stresle ilişkili nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde bu ekstre oldukça yararlı olabilir (31).

#### **2.5.2.7. Antiinflamatuvar etki**

2006 yılında yayınlanan bir çalışmada, *H. perforatum*'dan hazırlanan çeşitli ekstrelerden, aseton ve etanol ekstrelerinin, inflamatuvar ve alerjik çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinen ve lökotrien sentezinde anahtar enzim olan lipoksijenaz üzerindeki etkisi incelenmiş ve bu iki ekstrenin de antilipoksijenaz etkiye sahip olduğu bulunmuştur(225). Ekstrelerin yanı sıra, bitkide bulunan başlıca bileşikler olan flavonoidler (kersetin, izokersitrin, hiperozit, rutin) ve biflavonoidler ile naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin) da aynı yöntemle incelenmiş ve en yüksek anti-lipoksijenaz etkiye hiperisin'in yol açtığı tespit edilmiştir (IC<sub>50</sub> 5,768×10<sup>-6</sup> M). Benzer şekilde, Albert ve arkadaşları(226) hiperforinin de siklooksijenaz-1 ve 5-lipoksijenaz üzerinde dual inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Sırbistan’da yetişen *H. barbatum*, *H. androsaemum*, *H. richerii*, *H. hirsutum*, *H. perforatum* ve Tara Dağı’nda kültürü yapılan *H. perforatum* örneği olmak üzere 6 adet *Hypericum* türünden hareketle hazırlanan etanollü ekstraların antiinflamatuvar aktiviteleri, referans olarak indometazin’in kullanıldığı karragenan-İndüklü pençe ödemi deney modeli kullanılarak sıçanlar üzerinde test edilmiştir(227). Tüm ekstraların antiinflamatuvar etki gösterdiği bulunmuş, ancak en yüksek etkiyi *H. hirsutum* ile *H. perforatum*’ un doğal ve kültür örneklerinden hazırlanan ekstraları göstermiştir. Ancak ekstraların hiperisin içeriği ile antiinflamatuvar etkileri arasında bir ilişki saptanamamıştır.

*H. perforatum* flavonoidler ve fenolik asitler adı altında pek çok polifenolik bileşenleri içeren tıbbi bir türdür. Polifenolik bileşenler yüksek bir antioksidan potansiyeline sahip olduğundan dolayı, bir çalışmada karragenan İndüklü plevrit- bir akut inflamasyon- hayvan modelinde *H. perforatum*’ un etkisi değerlendirilmiştir. *H. perforatum* ekstresi (karragenandan önce oral yoldan 30 mg/kg verilen) akut inflamasyon hayvan modelinde güçlü antiinflamatuvar etkiler göstermiştir. Farelerin plevral boşluğu içerisine karragenan enjeksiyonu, plevral boşluğa sıvı akümülyasyonunu takiben çok sayıda nötrofil (PMNler), akciğer dokularına PMN’ lerin infiltrasyonu ve sonuç olarak lipid peroksidasyonu (tiyobarbitürik asit-reaktan madde ölçümü ile belirlenen) ve TNF- $\alpha$  ile IL-1 $\beta$ ’ nin artmış üretimi ile karakterize akut bir inflamatuvar cevap oluşturmuştur. İnflamasyonun bütün parametreleri *H. perforatum* ekstresi ile azalmıştır. Daha da ötesi, karragenan, akciğer dokularının immünohistokimyasal deneyleri ile belirlenen şekilde adhezyon moleküllerinin ICAM-1 ekspresyonunda upregülyasyon, nitrotirozin ve poli (ADP- riboz)’ de artış oluşturmuştur. ICAM-1, nitrotirozin ve PAR için lekelenme derecesi *H. perforatum* ekstresi ile anlamlı derecede azalmıştır. İlave olarak, bu inflamatuvar olayların akciğerlerde NF- $\kappa$ B aktivasyonu, sinyal transduser ve aktivatör transkripsiyon-3 (STAT-3 I) aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NF- $\kappa$ B ve STAT-3 aktivasyonu *H. perforatum* ekstresinin muamelesi ile belirgin şekilde inhibe edilmiştir. Sonuçlar göstermektedir ki; *H. perforatum* ekstresi ile NF- $\kappa$ B ve STAT-3 aktivasyonunun önlenmesi, akut inflamasyon gelişmesini azaltmaktadır (228).

Bir diğer çalışmada hiperforinin lökosit elastaz (LE) aktivitesini inhibe ettiği gibi PMN lökosit alımı ve istenmeyen olası doku cevaplarında etkili olup olmadığı test

edilmiştir. İn vitro insan PMN canlılığı ve kemokin- reseptör ekspresyonunu etkilemeksizin, hiperisin (stabil disikloheksilamonyum tuzu olarak) kemotaksisleri ve kemoinvazyonlarını ( $IC_{50}=1 \mu M$  ikisi için) doz bağımlı bir yolakla inhibe etmiştir. Bu etki formil-Met-Leu-Phe ile uyarılan nötrofiller tarafından adhezyon molekülü CD116'nın ekspresyonunun azalması ve jelatinaz matriks metalloproteinaz-9'un LE tetikleyici aktivasyonunun bloke edilmesiyle ilişkili olmuştur (229).

Periodontitli bir hayvan modelinde *H. perforatum*'un etkileri incelenmiştir. Yetişkin erkek Sprague-Dawley ratlarda birinci azı dişinin etrafına bir naylon ip bağlanarak periodontit oluşturulmuştur. Sekiz gün boyunca günlük 2 mg/kg dozda *H. perforatum* uygulanmıştır. 8. günde mandibüler 1. azı dişini çevreleyen jinjivomukozal doku kaldırılmıştır. Ratlardaki periodontit; ödem, nötrofil infiltrasyonu ve sitokin üretimi ile bu aşamaları takip eden diğer inflamatuvar hücrelerin oluşması, NF- $\kappa$ B ve iNOS ekspresyonu gibi bir dizi inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu, tirozin rezidülerinin nitrasyonu ve nükleer enzim poli polimeraz aktivasyonu; apoptoz ve jinjivomukozal doku hasar derecesi gibi inflamatuvar proseslerle sonuçlanmıştır. Bu çalışmada *H. perforatum*'un bütün bu inflamasyon parametrelerini azaltarak belirgin bir antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır (230).

Kaplan ve ark.'nın 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada fareler üzerinde gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı *H. perforatum* ekstresinin koruyucu etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Nefrotoksisite oluşturmak için farelere 9 gün boyunca gentamisin verilmiş ve *H. perforatum* etanollü ekstresi koruyucu etkiler için 9 gün boyunca uygulanmıştır. Nefrotoksisite seviyelerini karşılaştırmak için ELISA metodu kullanılarak böbreklerdeki siklooksijenaz-2, fosfolipaz A2 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimleri analiz edilmiştir. Gentamisin uygulaması, bu enzimlerin ekspresyonunu arttırmıştır. Daha sonra uygulanan *Hypericum perforatum* ekstresi siklooksijenaz-2 ve iNOS sentaz enzim artış oranını azaltırken fosfolipaz A2 artışını etkilememiştir (231).

#### **2.5.2.8. Apoptozu modüle edici etki**

St. John's wort'un, nöronal hücrelerde  $H_2O_2$  indüklü sitotoksisiteye karşı koruyucu etkisi olup olmadığını araştırmak için, SK-N-MC insan nöroblastoma hücreleri üzerinde 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür deneyi, 4,6-

diamino-2-fenilindol boyama, terminal deoksinükleotidil transferaz- aracılı dUTP çentik son etiketleme deneyi, akış sitometre analizleri, DNA fragmentasyon deneyi ve kaspaz-3 enzim deneyi uygulanmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyetinden önce St. John' s wort ile muamele edilen hücrelerde apoptoz azalırken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamele edilen hücreler çeşitli apoptotik özellikler sergilemiştir. Ek olarak, St. John' s ile önceden muamele, kaspaz-3 enzim aktivitesindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü artışı inhibe etmiştir. Bu sonuçlar bitkinin insan nöroblastoma hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü apoptoza karşı koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (18).

*Echinacea purpurea* ve *H. perforatum*' un in vivo apoptoz sürecini düzenleyip düzenlemediğini belirlemek ve Fas-Ag ile Bcl-2' nin sinyal transdüksiyon yolağındaki rolünü tanımlamak için bu bitkisel ilaçlar, fare gruplarına 14 gün boyunca oral olarak uygulanmıştır. İki doz seviyelerinde kullanılan ( günde 30 ve 100 mg/kg) *Echinacea purpurea* ve *H. perforatum* ile muamele edilen farelerdeki dalak lenfositlerinin apoptoza karşı, vehikül ile tedavi edilen farelerden önemli ölçüde daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, doğal maddelerle tedavi edilen farelerde, Fas-Ag ekspresyonunda bir düşme ve Bcl-2 ekspresyonunda bir artma gözlenmiştir. Sonuç olarak; in vivo çalışılan ilaçlar, farelerin dalak lenfositlerinde apoptozu modüle etmiş ve bu durum kısmen Fas-Ag ekspresyonunda azalma ve Bcl-2 ekspresyonunda artma aracılı olabilir (232).

2008 yılında yapılan bir çalışma ile *Panax quinquefolius* (PQE), *Ginkgo biloba* (GBE) ve *Hypericum perforatum* ekstrelerinden (HPE) oluşan bir karışım olan Menta-FX' in nöroprotektif mekanizmalarının açığa kavuşturulması amaçlanmıştır. PQE, GBE ve HPE' nin her üçünün de antioksidan özellikler gösterdiği gözlemlendiğinden; antioksidasyonun Menta-FX' in nöroprotektif etkisiyle ilişkisi araştırılmıştır. Karışım, aksotomize retinalarda NOS aktivitesini etkilemeden NO içeriğini düşürmüştür. Bu durum, Menta-FX' in muhtemel NO süpürücü özelliğine işaret etmektedir. İlave olarak karışımın aksotomi indüklü nükleer parçalanma ve kaspaz-3 aktivasyonundaki sıklığına etkisi araştırılmıştır. Menta-FX uygulaması, aksotomize retinalarda nükleer parçalanmayı dikkate değer seviyede azaltmıştır. Sürpriz bir şekilde Menta-FX, kaspaz-3 aktivasyonunda hiçbir etki göstermemiştir; ancak aksotomize retinal gangliyon hücrelerinde kaspaz-3 bağımsız nükleer fragmentasyonu selektif bir şekilde azaltmıştır. Ek olarak, fosfoinozid-3 kinaz (PI3K) aktivitesinin, wortmannin (PI3K inhibitörü)' nın

intravitreal enjeksiyonuyla engellenmesi Menta-FX' in nöroprotektif etkisini tamamen ortadan kaldırmıştır; ki bu durum karışımın nöroprotektif etkisinin PI3K bağımlı olduğunu gösterir. Veriler, Menta-FX' in aksotomize retinal gangliyon hücrelerindeki kaspaz-3 bağımsız apoptotik yolak üzerinde PI3K bağımlı selektif inhibisyon gösterdiğini öne sürmektedir. Bu yüzden çalışma, bitkisel ilaçların diğer nörodejeneratif rahatsızlıklarda nöroprotektif ajanlar olarak potansiyel kullanımının altını çizmektedir (233).

*H. perforatum*' un flavonoid bakımından zengin ekstresinin (FEHP) MTT deneyi, LDH salım deneyi, akış sitometri analizleri ve DNA fragmentasyon deneyi ile rat feokromositoma PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>indüklü apoptoza karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. PC12 hücrelerininH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye 4 saatlik maruziyeti ile hücre canlılığında anlamlı bir azalma ve LDH salımında artma gözlenmiştir. Ancak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyetinden önce PC12 hücrelerinin FEHP ile muamelesi hücre canlılığını arttırmış; LDH salımını ve apoptotik hücre oluşumunu azaltmıştır. Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan DNA sarmalının yoğunluğu, DNA fragmentasyon deneyi ile doz bağımlı yolakla inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki; FEHP, PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü apoptoza karşı koruyucu etkilere sahiptir ve FEHP, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi oksidatif stresle ilişkili nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir (31).

Naziroğlu ve ark. (2013) tarafından *H. perforatum*' un multiple sklerozlu (MS) hastaların lökositleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, nötrofil ve serum lipid peroksidasyonu, nötrofil apoptozu ve Ca<sup>2+</sup> seviyelerininazaldığı gözlenmiştir. Böylelikle bitkinin MS hastalarında transiyent reseptör potansiyeli ve voltaj kapılı kalsiyum kanallarını modüle ederek oksidatif stres ve Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonları üzerine koruyucu etkiler oluşturduğu gözlenmiştir (234).

İn vitro sitokinlere maruz kalan izole rat ve insan pankreatik adacıklarında St. John' s wort ve hiperforinin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Fonksiyonel, yapısal, biyomoleküler ve hücre ölümü değerlendirme çalışmaları yürütülmüştür. Hem rat hem de insan adacıklarında, *H. perforatum* ve hiperforin sitokin indüklü fonksiyonel bozulmayı etkisiz hale getirmiş; iNOS, CXCL9, CXCL10 ve COX2 gibi proinflamatuvar genlerin mRNA ekspresyonunu down-regüle etmiştir. Besiyerindeki nitrit ölçümüyle değerlendirilen kültür adacıklarındaki sitokin indüklü NO üretimi bitkisel bileşenlerin varlığında anlamlı şekilde azalmıştır. Sitokinlere 48 saat maruziyeti takiben, apoptoz ve

nekrozdaki artış St. John' s wort ile tamamen; hiperforin ile kısmen önlenmiştir. 20 saat boyunca sitokinlere maruz kalan insan adacık hücrelerinde yapısal morfometrik analizler, St. John' s wort ve hiperforinin erken  $\beta$ -hücre hasarını önlediğini göstermiştir. Sonuç olarak, bitki bileşenleri sıçan ve insan pankreatik adacıklarını; sitokin aracılı  $\beta$ -hücre hasarının anahtar mekanizmalarını etkisiz hale getirecek şekilde sitokin etkilerine karşı korumuştur. Tip-1 diyabetlilerde ise hücre disfonksiyonunu önlemede umut verici bir farmakolojik ajan olacağı düşünülmektedir (235).

Naziroğlu ve ark. (2014), *H. perforatum*' un Behçet hastalarının nötrofillerinde oksidatif stress, apoptoz ve sitozolik serbest  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> konsantrasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada Behçet hastalığı teşhisi yeni konulan 9 hasta ve 9 kontrol grubu kullanılmıştır. Hastalık aktivitesi klinik bulgularla değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrollerden nötrofiller alınmıştır. Hastalardan alınan nötrofil örnekleri 3 alt gruba bölünmüş ve sırayla *H. perforatum*, voltaja duyarlı kalsiyum kanal blokörleri (verapamil+diltiazem) ve non-spesifik TRPM2 kanal blokörü (2-aminoetil difenilborinat, 2-APB) ile inkübe edilmiştir. Nötrofiller,  $Ca^{2+}$  agonisti ve oksidatif stress kalıbı fMLP ile stimüle edilmiştir. [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> değerleri, kaspaz-3, kaspaz-9, apoptoz ve lipid peroksidasyonu değerleri hasta gruplarında yüksekken; hücre canlılığı, glutatyon ve glutatyon peroksidaz değerleri düşük çıkmıştır. Ancak [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>, kaspaz-3 ve kaspaz-9 *H. perforatum* alan hasta grubunda dikkate değer şekilde düşerken; glutatyon ve glutatyon peroksidaz değerleri artmıştır. [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> konsantrasyonu ayrıca verapamil+diltiazem, 2-APB ve *H. perforatum* inkübasyonlu hasta grubunda azalmıştır. Sonuç olarak; Behçet hastalığının patojenezinde önemli rol oynayan voltaja duyarlı kalsiyum kanalları ve transüvar reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları aracılığıyla nötrofil  $Ca^{2+}$  girişi, apoptoz ve oksidatif stresin önemi dikkat çekmiştir. *H. perforatum*,  $Ca^{2+}$  akışını modüle ederek oksidatif stress üzerine koruyucu etkiler oluşturmuştur (30).

Oksidatif stress ve sitozolik  $Ca^{2+}$  aşırı yüklemesi, spinal kord hasarından (SCI) sonra dorsal kök gangliyonlarındaki apoptoz üzerinde önemli role sahiptir. *H. perforatum*, NADPH oksidaz ve protein kinaz C yollarını modüle etme yeteneğinden dolayı SCI' da antioksidan özelliklere sahiptir. Bu yüzden ratlarda SCI indükli dorsal kök gangliyon nöronlarında TRPM2 ve transüvar reseptör vaniloid 1 (TRPV1) kanalları aracılığıyla oksidatif stress, apoptoz ve  $Ca^{2+}$  girişi üzerine *H. perforatum*' un koruyucu özelliği araştırılmıştır. Sıçanlar kontrol, *H. perforatum*, SCI ve SCI+*H.*

*perforatum* olarak 4 gruba ayrılmıştır. *H. perforatum* grubu SCI indüksiyonundan sonra 3 gün boyunca 30 mg/kg *H.perforatum* almıştır. SCI indüklü TRPM2 ve TRPV1 akımı ve sitozolik serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu *H. perforatum* ile azalmıştır. Glutasyon peroksidazda SCI indüklü azalma ve hücre canlılığı değerleri *H. perforatum* muamelesi ile düzelmiştir. Yine SCI grubunun dorsal kök nöronlarında apoptozda SCI indüklü artış, kaspaz-3, kaspaz-9, sitozolik reaktif oksijen türleri üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyon değerleri, *H. perforatum* uygulaması ile ortadan kaldırılmıştır. Sonuç olarak dorsal kök gangliyonlarında SCI indüklü oksidatif stress, apoptoz, TRPM2 ve TRPV1 aracılı  $Ca^{2+}$  girişi üzerine *H.perforatum*' un koruyucu rolü olduğu gözlenmiştir (236).

2017 yılında yapılan bir başka çalışmada ise siyatik sinir hasarlı (SNI) ratlarda siyatik sinir ve dorsal kök gangliyon nöronlarındaki proses üzerine *H. perforatum*' un koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ratlar kontrol, sham, sham+ *H. perforatum*, SNI ve SNI+*H. perforatum* olarak 5 gruba ayrılmıştır. *H. perforatum* grubu SNI oluşumundan sonra 4 hafta 30 mg/kg *H. perforatum* almıştır. TRPM2 ve TRPV1 kanalları sırasıyla ADP-riboz veya kümen peroksit ve kapsaisin ile nöronlarda aktive edilmiştir. SNI indüklü TRPM2 ve TRPV1 akışı ve hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  ve ROS konsantrasyonları *H. perforatum*, N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit (ACA) ve kapsazepin (CapZ) ile azalmıştır. SNI grubunun siyatik sinir ve dorsal kök gangliyon nöronlarında apoptoz ve mitokondriyal depolarizasyonda SNI indüklü artış, *H. perforatum*, ACA ve CapZ muamelesi ile azalmıştır. SNI grubunun siyatik sinir, dorsak kök gangliyon nöronu, deri ve musculus piriformis'inde PARP-1 , kaspaz-3 ve -9 ekspresyonu *H. perforatum* uygulaması ile azalmıştır. Sonuç olarak *H. perforatum* uygulaması ile siyatik sinir ve dorsal kök gangliyon nöronlarında mitokondriyal ROS, apoptoz ve TRPM2 ve TRPV1 inhibisyonu aracılığıyla  $Ca^{2+}$  girişindeki artış azalmıştır (237).

#### **2.5.2.9. Antikanser etki**

Yeni kanser kemoterapilerindeki ilerlemede, toksisite olmaksızın belirgin antitümör aktivite hedefdir. Bitkisel kaynaklı antitümör ajanlar için verimli bir bitki desteği ön şarttır. St. John's wort Avrupa, Kuzey Amerika, Kuzey Afrika ve Asya' da bolca yetiştiği ve minimal yan etkilerle iyi bir güvenlik profiline sahip olduğu üzere her iki kriteri de taşıyor görünmektedir. *Hypericum* bileşeni hiperisin, güçlü bir

fotosensitize edici ajandır ve kanser hastalarında fotodinamik terapideki kullanımı birkaç yıldır araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Çok sayıda *in vitro* alışmada (238-240) eşitli hücre dizilerine etkisi araştırılmıştır. Bütün bu çalışmalar hiperisinin fotosensitizasyondan sonra tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkisini göstermektedir.

Hiperisinin fotoaktive edici etkisi, pekçok kanser hücre dizisi *in vivo* hayvan kanser modellerinde araştırılmıştır. Lazer irradyasyonunun takip ettiği prostatik adenokarsinoma hücreleri ve insan prostat kanser metastatik hücre dizisinin 0,001-0,3  $\mu\text{g/ml}$  hiperisin ile inkübasyonu her iki hücre dizisinde de fototoksik etkilerle sonuçlanmıştır. İrradyasyon yokluğunda ise hiçbir etki gözlenmemiştir (241). Benzer *in vitro* alışmalarda insan üriner kanal karsinoma hücrelerinde fotoksisite göstermiştir (242). Pankreatik kanser hücre dizisi hiperisinleinkübe edilmiş ve sonra yeşil lazer ışığına maruz bırakılmıştır. Antitümöral hiperisinin intratümöral uygulanması ve lazer fototerapisinin takip ettiği pankreasa yerleştirilmiş pankreatik kanser hücrelerini taşıyan nude farelerle yapılan *in vivo* alışmalar, çiftlenmiş kontrollerle kıyaslandığında pankreatik kanser hücre büyümesinde azalma ile sonuçlanmıştır (243). Ayrıca insan skuamöz karsinoma hücrelerinin transplantasyonunu takip eden tümör büyümesine, hiperisin ile lazer intratümöral fotodinamik terapi uygulaması, yalnızca lazer uygulaması ile kıyaslandığında tümör nekrozunda anlamlı bir indüksiyon ile sonuçlanmıştır (244).

Yine pek çok çalışma, *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde fotodinamik terapide hiperisinin anlamlı rolünü kanıtlamıştır (245). Hiperisin epidermal büyüme faktörü reseptör ve protein tirozin kinaz aktivitesini inhibe ediyor görünmektedir. Hiperisinin etki mekanizması ve hücresele komponentlerle etkileşimi üzerine yapılan bir çalışmada (246) ışık aracılı pH düşüşünün hiperisinin fotodinamik aktivitesini potansiyelize edebildiği belirtilmiştir.

Hiperforin de antitümör etkilerinden dolayı hayvanlarda ve *in vitro* alışmalarda araştırılmaktadır. Schempp ve ark. hiperforinin *in vitro* rat ve insanlarda skuamöz hücre karsinomu, malign melanom ve lenfoma kadar meme kanseri gelişimini kamptotekin, paklitaksel ve vinkristin gibi diğer test edilen sitotoksik ilaçlardan daha iyi veya onlara eşit şekilde doz bağımlı olarak inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Veriler göstermiştir ki; hiperforin sırayla hücre ölüm yolağını tetikleyen mitokondri aktivasyonu, sitokrom salımı ve kaspaz aktivasyonu aracılığıyla tümör hücre apoptozunu indüklemiştir (247).

*H. perforatum*' un polar metanol ekstresi (PMF) son zamanlarda fotodinamik terapi (PDT) ve fotodinamik tanı koymada (PDD) kullanılmak üzere yeni bir doğal fotosensitizör olarak geliştirilmekte ve test edilmektedir. PMF , HL-60 lösemik hücreler ve kordon kan homepoetik öncüllerde test edilmektedir. 2006 yılında yapılan bir çalışmada, T24 (yüksek dereceli metastatik kanser) ve RT4 (primer düşük dereceli papiler transizyonel hücre karsinomu) insan mesane kanser hücreleri kullanılarak PMF' nin üriner mesane karsinomuna karşı fototoksik bir ajan olarak efikasitesi çalışılmıştır. Hücre kültür inkübasyonunu takiben, PMF 630 nm lazer ışığı kullanılarak uyarılmıştır. Fotosensitizör, hücre yıkımını %80' den %86' ya çıkaracak biçimde 4-8 J/cm<sup>2</sup> hafif dozla 60 µg/ml konsantrasyonda her iki hücre dizisinde de belirgin bir fototoksosite göstermiştir. PMF 20 µg/ml konsantrasyonda her iki hücre dizisinde de aktif olamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar, aynı hücre dizilerinde aynı koşullar altında klinik olarak fotosensitizör olarak kabul edilen Photofrin® ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Photofrin®, 4 µg/ml ile klinik açıdan maksimum tolere edilebilir dozda kullanılmıştır ve 630 nm lazer ışığı ile uyarılmıştır. T24 hücresinde Photofrin® PMF' ye kıyasla 8 J/cm<sup>2</sup> dozda % 7 hücre ölümü ile daha az fototoksosite göstermiştir. Ayrıca RT4 hücrelerine karşı Photofrin® 8 J/cm<sup>2</sup> dozda dahi minimal bir hücre ölümü (%9) oluşturmuştur. En son olarak, PMF fotoaktivasyonu ile indüklenen hücre ölümü tipi, akış sitometri ve DNA sarmallama kullanılarak çalışılmıştır. Bu iki mesane hücre dizisinde PMF fotodinamik etkiyle gerçekleşen hücre ölümü, ağırlıklı olarak apoptozdan kaynaklanmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi mükemmel fototoksosite, selektif lokalizasyon, doğal olarak bulunma, kolay ve düşük maliyette hazırlama PMF ekstresinin, yeni, etkili bir PDT fotosensitizörü olduğu gerçeğinin altını çizmektedir (248).

#### **2.5.2.10.Fotosensitivite etki**

*Hypericum* veya hiperisin alımını takiben gelişen güneş ışığına duyarlılık hiperisizm olarak bilinir. Hiperisinin, St. John's wort içindeki fotosensitize edici ajan olduğu bildirilmiştir (116).

Bitki için yapraklardan hazırlanan bitki çayının alımı, gecikmiş hipersensitivite ya da fotodermatite yol açmaktadır. Süregelen fototerapi veya güneşe maruziyetten

önce topikal ve/veya oral bitki preparatları kullanan bireylerde fotosensitivite reaksiyonlarını bildiren 3 durum raporu bulunmaktadır (116).

Plasebo ve 900, 1800 ve 3600 mg St. John's wort ekstresi alan 13 sağlıklı gönüllüyü içeren çift körlü, çapraz geçişli bir çalışmada dozlamadan sonra 4 saat UV-A ve UV-B ışığı ile deri radyasyonunu takip eden bitkiyi alan veya almayan grupta herhangi bir fotosensitivite reaksiyonu gözlenmemiştir. 15 gün boyunca günde 3 kez 600 mg St. John's wort alan 50 gönüllünün katıldığı çalışmada UV-A duyarlılığında orta dereceli bir artış gözlenmiştir (249). Dozlar terapötik olarak tavsiye edilenden daha yüksek uygulanmıştır. Bir diğer tek doz çalışmasında, 12 sağlıklı gönüllüye 1800 mg bitki uygulaması 43 ng/ml ortalama serum total hiperisin konsantrasyonu ve 5,3 ng/ml ortalama deri vezikül sıvı konsantrasyonu ile sonuçlanmıştır (250). Durgun faz konsantrasyonuna ulaşmak için günde 3 kez 300 mg bitki uygulamasından sonra ortalama serum total hiperisin konsantrasyonu 2,8 mg/ml olmuştur; bu konsantrasyonlar fototoksik olarak değerlendirilmiştir (250).

Bir çalışmada 28 gün boyunca 0,05 mg/kg oral hiperisin alan HIV-pozitif hastaların, güneş ışığına maruziyetle hafif fotosensitivite semptomları geliştirdiği bildirilmiştir. Doz 0,16 mg/kg' ye çıktığında 2 hasta tolere edilemeyen fotosensitivite semptomları geliştirdiği gözlenmiştir (251). Oral veya intravenöz hiperisin alan HIV ile enfekte 30 hastanın katıldığı doz artışı bir başka çalışmada, 16 hasta orta dereceliveya şiddetli fototoksiteden dolayı 8 haftalık terapiyi tamamlamadan önce tedaviyi sonlandırmıştır; 23 hastanın 11' inde şiddetli kutanöz fototoksiste gözlenmiştir (252).

Topikal St. John's wort' ün fotosensitivite kapasitesini araştıran bir çalışmada, gönüllülerin güneşe maruziyetinden önce ön kol bölgelerine *Hypericum* yağı veya *Hypericum* merhemi uygulanmıştır (253). Duyarlı bir fotometrik ölçüm kullanılan deri eritema gelişme testinde *Hypericum* yağı ile muameleden sonra eritema indeksinde bir artış meydana gelmesine rağmen görsel değerlendirmede her iki preparatın uygulanmasından sonra eritemada herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir.

#### **2.5.2.11.Diğer etkiler**

Mevsimsel duygulanım bozukluğu (SAD) yaşayan öznelde St. John's wort ekstresinin etkisi araştırılmıştır (254,255). SAD' lı 20 birey parlak ışık terapisi ile veya ışık terapisi olmaksızın günde üç kez 300 mg St. John's wort ekstresi (0.9 mg hiperisine

eşdeğer) alacak şekilde randomize edilmiştir (254). Dört hafta sonra her iki grupta da bazal değerlere kıyasla HDS' de belirgin bir azalma olmuştur; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin farklılıklar gözlenmemiştir. Bir diğer çalışmada sekiz hafta boyunca ışık terapisi alan (n=133) veya almayan (n=168) günde üç kez 300 mg St. John's wort (0.9 mg hiperisine eşdeğer) kullanan hafif-orta SAD' li bireylerden elde edilen veriler değerlendirilmiştir (255). Çalışma randomize edilmemiş veyapılan anket sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. 301 anket sonucu elde edilen veriler analiz için uygun bulunmuştur. Her iki grupta da bazal değerlere kıyasla, SAD skorlarında anlamlı azalmalar gözlenmiştir; gruplar arası SAD skorlarındaki farklılıklar istatistiksel anlamda belirgin bulunmamıştır.

Bir randomize, çift körlü, plasebo kontrollü deneyde, menapozla ilişkili psikonegatif semptomlu 179 kadında, 6 hafta boyunca St. John's wort ve black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) kombine preparatı veya plasebo denemiştir (116). Sonuçlar göstermiştir ki; kombinasyon ürünü plaseboya kıyasla sonuçlar üzerinde çok daha anlamlı etkiler göstermiştir. Psikovejetatif rahatsızlığı bulunan hastalarda (256) ve psikolojik kaynaklı menapozal belirtili kadınlarda (26) St. John's wort ekstresi ile pazarlama sonrası sürveyans çalışmaları yürütülmüştür. Bütün çalışmalarda bitki ekstresi uygulaması bazal değerlerle karşılaştırıldığında semptom skorlarında gelişmeler bildirilmiştir; bu çalışmalarda bir kontrol grubu kullanılmamıştır.

Kontrolsüz pilot çalışmalarda yorgunluk gösteren 20 birey ve premenstrual sendrom yaşayan 19 kadında St. John wort' ün kullanım potansiyeli çalışılmıştır. Bazal değerlerle karşılaştırıldığında St. John' wort uygulamasından 6 hafta sonra yorgunluk hissinde, depresyon ve anksiyete semptomlarında ayrıca 2 menstrüel siklusta bitki ile muameleden sonra tüm premenstrual sendrom skorlarında belirgin düzelmeler gözlenmiştir (116).

Çok merkezli, randomize, plasebo kontrollü bir deneyde, somatizasyon bozukluğu veya somatoform otonomik disfonksiyon gösteren 151 ayakta tedavi gören hastada St. John's wort' un etkinliği plaseboyla karşılaştırılmıştır. *Hypericum* ekstresi günlük 600 mg' a dozlanmış ve sonuç HDS ile ölçülmüştür. *Hypericum* ekstresi anksiyete ve somatoform şikayetleri azaltmada plasebodan belirgin derecede daha etkili olmuştur. Tedavi grubundaki hastaların %81' i plasebo grubunun %50' si ile karşılaştırıldığında gelişme kaydetmiştir. Tolerebilite uygun bulunmuştur ( 257).

Ayrıca St. John's wort alkolizmin üç sıçan modelindeki potansiyel terapötik faydaları için araştırılmıştır. Her üç modelde *Hypericum* ekstresi gönüllü alkol alımını belirgin derecede doz bağımlı olarak azaltmıştır (258).

### **2.5.3.Advers etkiler**

Randomize kontrollü deneylerden, ilaçizleme ve pazarlama sonrası sörveyans çalışmalarından ve ulusal ve uluslararası ilaç güvenlik izleme topluluklarından elde edilen St. John's wort verileri, bitkinin iyi tolere edildiğini göstermiştir. Advers etkiler genellikle hafiftir. Bildirilen en yaygın advers etkiler; gastrointestinal semptomlar, baş dönmesi, konfüzyon ve yorgunluk/sedasyondur. Plasebo kontrollü deneylerde St. John's wort ile gözlenen advers etkilerin sıklığı plasebo ile gözlenenlerle benzerdir (116). Fotosensitivite St. John's wort' ün tavsiye edilen dozlarında aşırı seyrek görülen bir olaydır.

### **2.5.4.Gebelik ve laktasyon**

Gebeliğinin 24. haftasında 900 mg/gün St. John's wort almaya başlayan 38 yaşındaki bir kadınla ilgili bir rapor bulunmaktadır (116). Geç başlangıçlı trombositopeni dışında gebelik normal seyrinde sürmüştür. Hamile olduktan sonra fluoksetin ve metilfenidat almayı sonlandıran ve 900 mg/gün St. John's wort almaya başlayan 43 yaşında bir bayanla ilgili rapor bulunmaktadır. Bazı yan etkilerin gözlenmesine rağmen gebeliğin nasıl sonlandığı belirtilmemiştir (116).

Bitkinin ham sulu ekstresi için kobay ve tavşanlarda hafif bir uterotonik aktivite bildirilmiştir (116).

Moretti ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada gebelikte St. John's wort'e maruz kalanların major malformasyonlarla ilişkili olup olmadığını araştırmışlardır. Bitkiyi alan özneler prospektif olarak toplanmış ve takip edilmiştir. Depresyon için diğer farmakolojik terapileri alan bir grup gebe kadınla karşılaştırılmıştır. Bir 3. Grup olarak bilinen herhangi bir teratojene maruz kalmamış sağlıklı kadınlar seçilmiştir. Karşılaştırılan 2 grupta bitkiye maruz kalan 54 gebe ve 108 diğer hamileden bilginin alınmıştır. Sonuçlar, major malformasyonların 3 grup arasında benzer olduğunu ve St. John's wort ile karşılaştırılan hastalık grubu ve sağlıklı grupta sırasıyla %5, %4 ve %0 oranında olduğunu göstermiştir (p=0,26). Bu kadar risk normal popülasyonda da

gözlenebilmektedir. 3 grup arasında canlı doğum ve prematüre doğum arasında da fark olmamıştır (259).

Toksisite verileri ile ilgili eksikliklerden ötürü St. John's wort gebelik ve laktasyonda önerilmeden kullanılmamalıdır (3).

### **2.5.5.İlaç etkileşimleri**

Daha önceden bildirildiği üzere St. John's wort aşırı dozlarda MAO inhibitor tedaviyi potansiyelize edebilir (116). Ayrıca tiramin içeren gıda alımının önlenmesi (ör: peynir şarap, et ve maya ekstreleri) gerekir. MAO inhibitörleri ile etkileşime giren sempatomimetik ajanları (ör: öksürük/soğuk algınlığı ilaçları) içeren ilaçlar St.John's wort alınırken dikkatli kullanılmalıdır.

Reçetelenen ilaçların terapötik etkisini azaltan veya etkinin kaybına yol açacak şekilde bitki ve belirli reçetelenen ilaçlar arasındaki etkileşimlerin yayınlanan spontan raporlarından (260) yenikanıtlar ortaya çıkmıştır. Etkilenen ilaçlar arasında indinavir, varfarin, siklosporin, digoksin, teofilin ve oral kontraseptifler yer almaktadır. St. John'swort ile eş zamanlı SSRI alan hastalarda artmış seratonerjik etkiler bildiren raporlar da bulunmaktadır (116,261).

Sağlıklı gönüllülerle ilaç etkileşim çalışmaları bitki ile fenprokumon ve digoksin (116) arasında etkileşimlerin olduğuna dair destekleyici kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca St. John's wort' ün p-glikoproteinini etkilediği kadar karaciğerde CYP3A4,CYP1A2 ve CYP2C9 gibi bazı sitokrom ilaç metabolize edici enzimleri indükleyebileceğine dair kanıtlar da sunulmuştur (116,261). İn vitro çalışmalar, bitki ham ekstrelerinin CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2 ve CYP2C19 enzim aktivitesini inhibe ettiğini; hiperforinin CYP2D6 aktivitesinin güçlü bir nonkompetitif inhibitörü ve CYP2C9 ve CYP3A4 aktivitesinin güçlü bir kompetitif inhibitörü olduğunu bildirmektedir (262). İnsan hepatositlerinin *Hypericum* ekstresi ve hiperisin ile muamelesinin CYP3A4 ekspresyonunda belirgin bir indüksiyonla sonuçlandığı ve hiperforinin CYP3A4 monooksijenazın ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer reseptör olan X reseptörü için güçlü bir ligand olduğu gösterilmektedir(263). Tezat olarak, gönüllü sayısının çok az olması ve St. John's wort uygulamasının indüktif bir etkiyi tamamen önlemek için çok kısa olmasına rağmen (116), gönüllüleri içeren bazı çalışmalar CYP izoenzimleri üzerinde belirgin etkiler bulmada başarısız olmuştur (116). Bu bilgilere karşı ve bitkinin

farklı preparatlarında aktif bileşenlerinin içeriği farklılık gösterdiğinden, enzim indüksiyonunun derecesi farklılık gösterebilir.

Bu görüşler UK İlaç Güvenlik Komitesine belli ilaçlarla St. John's wort' ün kullanımı üzerine eczacılara, doktorlara ve hastalara tavsiye sunmasını sağlar (264,265).

Varfarin, siklosporin, digoksin, teofilin, antikonvülzanlar (karbamazepin, fenobarbital, fenitoin): transplant rezeksiyonu, tutarıklar ve astım kontrolünün kaybı gibi terapötik etkilerde azalma riski söz konusudur. Tavsiye ise plazma ilaç konsantrasyonlarını kontrol etmek (varfarin ile hastanın INR' si kontrol edilmeli) ve St. John's wort alımını kesmektir. Ayrıca doz ayarlaması gerekli olabilir.

HIV proteaz inhibitörleri (indinavir, nelfinavir, ritonavir, sakinavir), HIV non-nükleozit revers transkriptaz inhibitörleri (efavirenz, nevirapin). HIV supresyonunun olası kaybı ile azalmış kan konsantrasyonları riski vardır (261).

Oral kontraseptifler: azalmış kan konsantrasyonları, ani kanama ve istenmeyen gebelik riski vardır (261).

Triptanlar ( sumatriptan, naratriptan, rizatriptan, zolmitriptan), SSRI' ler ( sitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, sertralin): advers reaksiyon riskinin olası artışına bağlı artmış seratonerjik etki riski vardır (116,261) .

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM)'nden etik kurul izni alınarak yapılmıştır.

Deneylerde Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM)'nden sağlanan 8 haftalık Swiss albino türü erkek fareler kullanıldı.

#### 3.1. Sigara Duman Düzeneği

Fareler 3 deney grubuna ayrıldı.

1. Kontrol (Dumansız, n=8)
2. Duman Uygulanan (n=8)
3. Kantaron Uygulanan (70 mg/kg/gün; gavaaj) (Dumanlı, n=8)

Fareler 100 cm uzunluğunda 60 cm genişliğinde 80 cm yüksekliğinde karşılıklı 2 kenarın birinde duman giriş bölgesi diğerinde ise hava çıkış bölgesi olan fleksiglas odanın içine konuldu(Şekil 3.1). Duman giriş bölgesine yanma düzeneği monte edilip düzeneğe bağlı olan sigara yakılarak düzeneğin içerisindeki vakum pompası vasıtasıyla duman giriş bölgesinden hava çıkış bölgesine duman akımı oluşturularak farelerin dumanı solumaları sağlandı. Her sigaradan 10 dakika boyunca odanın içerisine duman sağlandı. Bu süre sonunda 10 dakika odanın dumansız kalması sağlandı. Bu döngü her gün 20 adet sigaranın bitimine kadar uygulandı. Bu uygulamaya 8 hafta boyunca her gün devam edildi. Dumanın homojen dağılması için odanın etrafına çeşitli açılardan fan yerleştirildi. Oda sıcaklığı 37°C' de tutuldu ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık koşullarında çalışıldı. Dumansız kontrol gruplarına da aynı deneysel koşullar sağlandı. Fleksiglas odanın içine duman yerine hava aspirasyonu sağlandı. Yukarıda açıklanan protokolün sonunda fareler servikal dislokasyon ile öldürdü.

Farelerin toraksı açılarak akciğerler bir bütün olarak çıkarıldı. Çıkarılan doku Krebs solüsyonu bulunan petri içerisinde çevre dokulardan temizlendi. ELISA testi için kantitatif tayin deneylerinde kullanılmak üzere -80°C'de dondurularak ependorf içinde saklandı.



Şekil 3.1. Duman Uygulama Düzenegi

### 3.2. *H. perforatum* Ekstresinin Hazırlanması:

Sarı kantaron ekstresi hazırlanmasında tek bir yöntem bulunmamaktadır. Anadolu'da zeytinyağı ile karıştırılan sarı kantaron çiçeğinin bekletilip süzülmesi ile elde edilen yağlı solüsyon en çok karşılaşılan yöntemdir. Literatürde de bu konuda fikir birliği bulunmamaktadır. Ancak antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkilerinden sorumlu hiperforin içeriği bakımından en zengin olan yöntemin güneşte kurutma yöntemi olduğu bildirilmiştir (266). Laboratuvarımızda temmuz ayında toplanmış *H. perforatum* çiçeği,

yaprakları ve bitki gövdesi etüvde kurutulularak mikser vasıtasıyla un haline getirildi. Daha sonra %80' lik etanol solüsyonu içerisine alınarak 1 gece sheakerda bekletildi.. Partikülleri ayırmak üzere 0,1 mm çapında filtreden süzülen ekstreden alkol vaporizasyonla uzaklaştırıldı. Daha sonra ekstreden 8 hafta boyunca her gün tek doz 70 mg/kg olmak üzere farelere duman uygulamasından önce oral yolla gavaj yöntemiyle verilmiştir.

### **3.3. Kullanılan kimyasal ajanlar**

Sığır serum albumini Sigma firmasından temin edildi. Bioscience, bradford protein assay solüsyonu Biorad'dan, Ripa-buffer Santa Cruz'dan, kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ELISA kitleri Uscn Life Science Inc'den temin edildi.

### **3.4. ELISA deneyleri**

ELISA testleri Rayto firmasından temin edilen ELISA mikroplate okuyucu ve yıkayıcı ile yapıldı.

#### **3.4.1. Homojenizasyon**

Eppendorf içinde -80°C' de dondurulmuş dokuların üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30µl PMSF (fenylmetanesulfonylfluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz inhibitörü eklendi ve ultrasonik parçalama cihazıyla buz üzerinde dokular parçalanarak homojenatlar elde edildi. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi. Altaki çökeltiler (pelletler) atıldı. Üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) ELISA testlerinde kullanılmak üzere saklandı.

#### **3.4.2. Protein miktar tayini**

Homojenizasyon yapılarak elde edilen homjenatların total protein miktarının tayini için Bradford yöntemi kullanıldı.

Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlandı. Her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml bradford solüsyonu eklendi ve vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda

absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. Prism programında çizilen standart eğriye göre homojenatların protein miktar tayini  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  cinsinden yapıldı.

### **3.4.3. ELISA Testi**

#### **3.4.3.1.ELISA Bax Miktar Tayini**

Homojenatlardan 100'er  $\mu\text{l}$  ELISA kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü alüminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100  $\mu\text{l}$  reaktif A solüsyonu eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$  reaktif B solüsyonu eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90  $\mu\text{l}$  substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50  $\mu\text{l}$  stopsolüsyonu eklenip 450 nm'de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek Bax geninin miktarı tayin edildi.

#### **3.4.3.2. ELISA Bcl-2 Miktar Tayini**

Homojenatlardan 100'er  $\mu\text{l}$  ELISA kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü alüminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100  $\mu\text{l}$  reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$  reaktif B solüsyonu eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90  $\mu\text{l}$  substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50  $\mu\text{l}$  stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek Bcl-2 miktarı tayin edildi.

#### **3.4.3.3.ELISA kaspaz-3 Miktar Tayini**

Homojenatlardan 100'er  $\mu\text{l}$  ELISA kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü alüminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100  $\mu\text{l}$  reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda

kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek kaspaz-3 miktarları tayin edildi.

### **3.5. Sonuçların değerlendirilmesi**

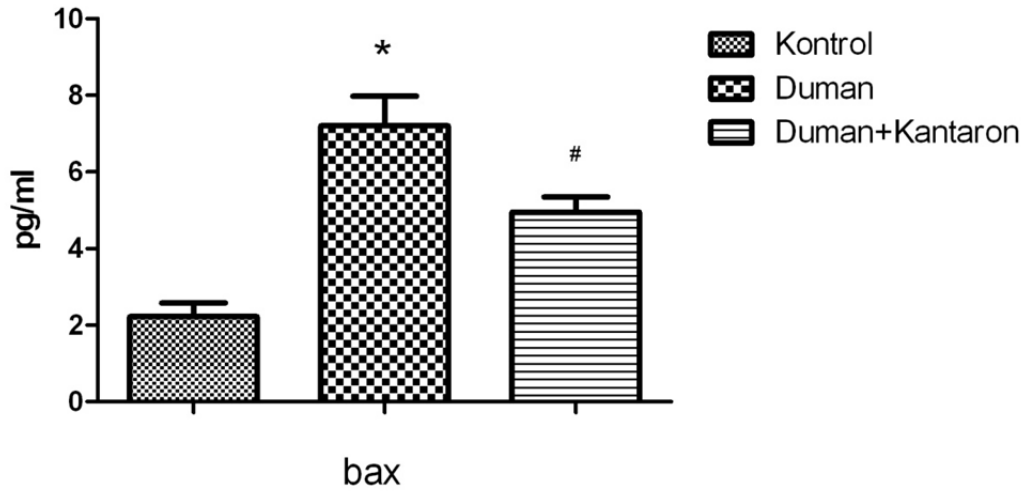
Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analiz için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism (CA, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* testi olarak Bonferoni kullanıldı. 0.05’den küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.ELISA deneyleri

#### 4.1.1.Bax protein miktar tayini

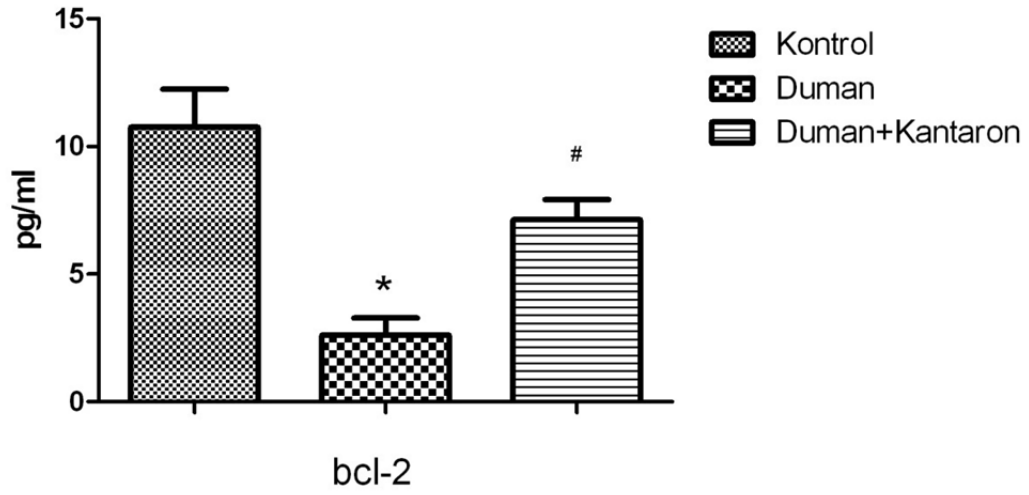
Bax proteini düzeyinin duman maruziyeti olan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda artmış olduğu ve kantaron ile bu artışın geri çevrilebildiği görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde Bax proteini üzerine etkisi(n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrole göre  $P<0.05$ . # Duman uygulanan gruba göre  $P<0.05$ ).

#### 4.1.2.Bcl-2 protein miktar tayini

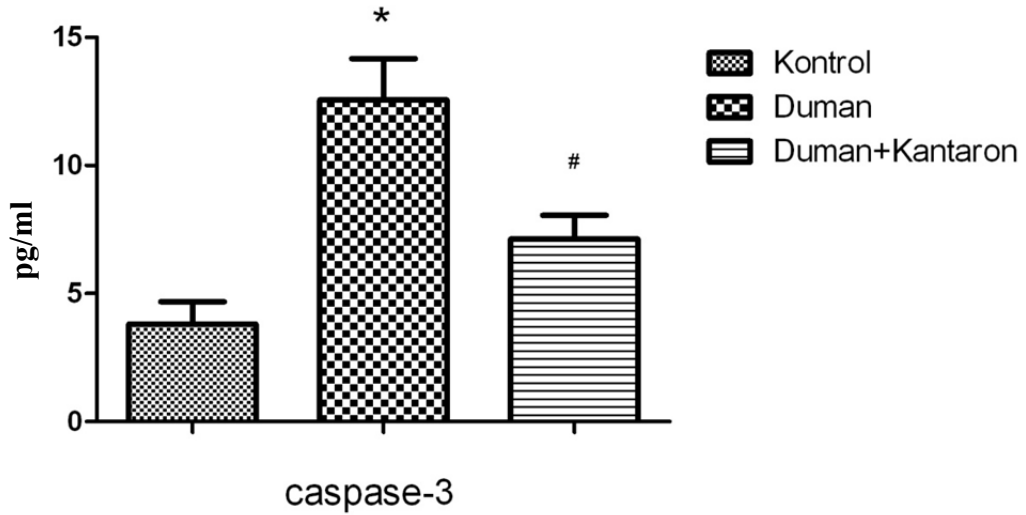
Sigara dumanına maruz bırakılan fare grubunda Bcl-2 protein seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşerken, kantaron ekstresi azalan Bcl-2 protein seviyesini anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde Bcl-2 proteini üzerine etkisi(n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrole göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05)

#### 4.1.3.Kaspaz-3 enzim miktar tayini

Kaspaz-3 enzimi sigara dumanı uygulanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken kantaron maruziyeti ile enzim seviyesi azalmıştır (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Sigara dumanı maruziyetinin akciğerde kaspaz-3 enzimi üzerine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrole göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05)

Sonuç olarak duman uygulaması ile Bax protein ve kaspaz-3 enzim ekspresyonu artmış, Bcl-2 seviyesi ise azalmıştır. Duman uygulamasından önce verilen bitki ekstresi ise bu durumu tamamen tersine çevirmiştir (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Deney gruplarına göre Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 miktarları (pg/ml)

	<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Duman Uygulanan</b>	<b>Duman+Kantaron</b>
<b>Bax</b>	2,217±0,3655	7,200±0,7833*	4,957±0,3921#
<b>Kaspaz-3</b>	3,806±0,8763	12,56±1,608*	7,125±0,9342#
<b>Bcl-2</b>	10,76±1,486	2,602±0,6747*	7,125±0,7892#

İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrolle göre P<0.05. # Duman uygulanan gruba göre P<0.05)

## 5. TARTIŞMA

Sigara dumanının insan dokuları üzerindeki etkilerine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sigara kullanımının yol açtığı olumsuz etkiler arasında solunum yolları hastalıkları (özellikle KOAH) ilk sırada yer almaktadır(267). Kardiyovasküler hastalıkların etiolojisinde de sigara önemli rol oynamaktadır. Sigara dumanında bulunan benzopirenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların DNA bütünlüğünü bozarak kanser oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir(268-271). Sigara dumanında bulunan maddelerin zararlı etkileri daha pek çok dokuda karşımıza çıkmaktadır. Yapılan epidemiyolojik araştırmalar sigara ile ilişkili hastalıkların çok çeşitli ve yaygın olduğunu ortaya koymaktadır (272,273).

Sigara dumanı akciğerlerde inflamatuvar hücrelerin oluşumunu arttırmaktadır. Daha sonra akciğer matriksi ve yapısal hücrelerin ölümüne sebep olan reaktif oksijen türleri ve proteolitik enzimler salgılanmaktadır. Sonuç olarak alveolar duvar veya endotelial hücrelerde apoptoz gerçekleşmektedir (274). Bu çalışmada kronik sigara dumanı uygulanan farelerin akciğerlerinde indüklenen apoptoza *H. perforatum* ekstresinin etkisi ilk defa araştırılmıştır. Çalışmanın temel bulguları *H. perforatum* ekstresinin uygulanmasının ardından apoptozda sigara dumanı ile ekspresyonları artmış olan kaspaz-3 enzim ve Bax protein miktarları anlamlı şekilde azalmış; ekspresyonu azalmış olan Bcl-2 geni ise anlamlı bir şekilde artmıştır.

Bizim çalışmamızda kronik sigara dumanı uygulanarak farelerin akciğerlerinde apoptoz indüklenmiştir. Benzer şekilde bir grup araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada KOAH' ı olmayan sigara içiciler ve içmeyenlere kıyasla amfizem hastalarında alveolar duvar hücrelerinin apoptozunda artış şeklinde bulgular rapor edilmiştir. Sigara içmeyenlere kıyasla KOAH hastalarında T hücrelerinin apoptozunda artış olduğu ve bu artışın KOAH hastalarında sigarayı bırakmalarına rağmen devam ettiği rapor edilmiştir (275,276). İnsanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada KOAH hastalarının akciğer doku kesitlerinde bizim çalışmamızda olduğu gibi apoptozda artış olduğu gözlenmiştir (277).Amfizemi olan sigara içicilerinkile karşılaştırıldığında amfizemi olmayan içicilerin akciğerlerinde apoptotik alveolar duvar hücrelerinde dikkate değer bir fark bulamamışlardır. Yine de bu çalışmada içicilerdeki apoptoz, içilen sigara miktarıyla doğrusal bir ilişki göstermiştir (278). Biz kendi çalışmamızda

fare akciğerlerinde amfizem gelişip gelişmediğine bakmaksızın bu sonuçları gözlemledik. Gösterdik ki sigara maruziyeti her şekilde akciğerlerde apoptoza neden olmuştur.

Apoptoz süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması, hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteindir (17). Bizim çalışmamızda kronik sigara dumanı ile indüklenen apoptozda kaspaz-3 enziminin ve Bcl-2 ailesi üyelerinden Bax proteininin ekspresyonunun arttığı; antiapoptotik gen olan Bcl-2 proteinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Imai ve ark. tarafından yapılan çalışmada, insan amfizemöz akciğer dokularında kaspaz-3' ün aktif alt birimlerinde artış gözlenmiştir. Kontrol grubundan farklı olarak amfizem hastalarında proapoptotik proteinler Bax ve Bad' in artmış ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Antiapoptotik protein Bcl-2' ye amfizematöz akciğer dokusunda rastlanmamıştır (279).

İnsan nöroblastoma hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan apoptozda *H. perforatum* kaspaz-3 enzim aktivitesindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü artışı inhibe etmiştir (18). Naziroğlu ve ark. (2014) *H. perforatum*' un Behçet hastalarında Ca<sup>2+</sup> değerleri, kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerini düşürdüğünü ortaya koymuşlardır (30).

2016 yılında yapılan bir çalışma ile ilk kez hiperozitin akciğer kanserinde antiapoptotik faktörlerin ekspresyonunu inhibe ederek ve kaspaz 3 ile siklin-D/p53 sinyalizasyon yollarını aracılığıyla proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu artırarak anti-kanser fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (280). Normal hücrelerde uyarıcılarla oluşan apoptozda antiapoptotik özellik gösteren bitki ekstresi, kanserli dokuda ise proapoptotik özellik göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarla bunun nedenleri araştırılabilir.

Farelerde yapılan bir çalışmada aktif kaspaz-3' ün intratrakeal uygulanmasının epitelyal apoptoz gelişimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (281).

Amfizemli bir rat modelinde antioksidan aktiviteye sahip bir bileşenin uygulanması, alveolar hücre apoptozunun gelişimini önlemiştir (282). Bu durum bize oksidatif stres ile apoptoz arasında bir pozitif feedback ilişki sunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda *H. perforatum*' un güçlü bir antioksidan ajan olduğu ortaya konmuştur(31,215-224). Çalışmamızda da bitkinin sigara dumanı maruziyeti ile fare

akciğerinde meydana gelen hasar üzerindeki iyileştirici etkisi araştırılmış ve *H. perforatum* ekstresinin uygulanmasının ardından apoptozda ekspresyonları artmış olan kaspaz-3 enzim ve Bax protein miktarları anlamlı şekilde azaldığı; ekspresyonu azalmış olan Bcl-2 geninin ise anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

Kasahara ve ark. tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada VEGF reseptörünün bloke edilmesi alveolar hücre apoptozuna ve hava boşluklarının genişlemesine yol açmıştır. Ayrıca bir kaspaz inhibitörü ile tedavi VEGF reseptör blokajına cevaben septal hücre apoptozunu önlemiştir (283). Şöyle ki; bitkimiz nasıl ki kaspaz-3 enzim seviyelerinde azalmaya sebep olmuşsa sigaranın sebep olabileceği VEGF blokajını da ortadan kaldırmış olabilir. İlerde yapılacak çalışmalarla bu kısım da aydınlatılabilir.

Bir diğer grup araştırmacılar antioksidan genleri bozulmuş farelerde sigara dumanına cevap olarak apoptotik alveolar septal hücre (özellikle endotelial ve tip II epitelyal hücrelerde) sayısında artış gözlemişlerdir (284). Fareler kullanılarak yapılan bir in vivo çalışmada, *H. perforatum* uygulaması dalak lenfositlerinde Bcl-2 ekspresyonlarında bir artışla sonuçlanmıştır (232). Bizim çalışmamızda da bitki ekstresi ile duman sonrası azalmış olan antiapoptotik protein Bcl-2 seviyesi artmıştır. Yine *H. perforatum*' un flavonoid bakımından zengin ekstresi rat feokromasitoma PC12 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan apoptozda apoptotik hücre oluşumunu azaltmıştır (31). Bir başka çalışmada *H. perforatum* standardize ekstresinin rat beyin korteks mitokondrisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü apoptozda kaspaz-3 enzim aktivitesini azaltmıştır (220). Bu çalışmaların sonuçları da bizim çalışmamızda elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Tezat olarak *Panax quinquefolius*, *Ginkgo biloba* ve *H. perforatum* ekstrallerinden oluşan bir karışım retinal gangliyon hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivasyonunda hiçbir etki göstermemiştir (233).

Ratlarda spinal kord hasarı ile oluşturulan dorsal kök gangliyon nöronlarında oksidatif stres, apoptoz ve Ca<sup>2+</sup> girişi üzerine *H. perforatum*' un koruyucu özelliği araştırılmıştır. Sonuç olarak spinal kord hasarı indüklü apoptoz artışı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonu anlamlı derecede düşmüştür. Yine sitozolik serbest Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu *H. perforatum* uygulaması ile azalmıştır (236). Bir başka çalışmada siyatik sinir hasarlı ratlarda *H. perforatum* PARP-1, kaspaz-3 ve -9 ekspresyonunu azaltmış; hücrelere Ca<sup>2+</sup> girişindeki artış da azalmıştır (237). Bu çalışmalar *H.*

*perforatum*' un apoptotik hücre oluşumunu engellemesinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması açısından ileride yapılacak çalışmalar için ışık tutabilir.

Bitkilerle yapılan çoğu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da temel sorun bitkisel ekstrelerdeki aktif maddelerin çeşitlerinin ve miktarının tam olarak bilinmiyor olmasıdır. Kantaron gibi pek çok aktif maddesi belirlenmiş bitkisel ekstrelerin içerisinde bulunan aktif maddeyi ayırt etmek ve bu madde ya da maddelerin biyoyararlanımını tespit etmek ve kantitasyonunu sağlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bizim uyguladığımız ekstre hazırlama yöntemimizde de kantaron içeriğindeki hangi aktif bileşenin hangi dozlarda bu enzim aktivitelerini etkiledikleri bilinmemektedir. Biyoyararlanım ve biyoaktivitenin belirlenmesi amacıyla kantaron ekstrelerinin hazırlanmasının sistematik olarak standardize edilmesi ve içeriğindeki maddelerin belirlenmesi, çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılabilmesi açısından çok yarar sağlayacaktır. Kantaron içeriğindeki maddelerin pek çoğunun belirlenmesine karşın içeriğindeki maddelerin bir kısmının fotosensitif olması nedeniyle günümüze kadar ekstrenin hazırlanması konusunda standartlar oluşturulabilmiş değildir. Bu yüzden spesifik biyoaktiviteye sahip ekstre içeriğinin etkinliği (285,286) ve bileşenleri bilinmemektedir. Oluşturduğumuz deney şartlarında kantaron ekstresinin antiapoptotik etkinliğinin kaynağı belirsizdir. Ayrıca bu ekstrenin hazırlanma koşullarının değişmesi ile aynı sonuçların elde edilebilirliği de test edilmelidir (287).

Sarı kantaron ekstresindeki antiapoptotik etkilerden sorumlu tutulan maddelerin başında bu bitki türüne spesifik bileşenler olan hiperisin ve hiperforinler gelmektedir. Ekstrenin hazırlanmasında kullanılan yöntemin ve güneş ışığına maruz bırakmanın içeriğinde değişikliğe neden olduğu da bilinmemektedir (266). Çeşitli deneylerde ekstrelerden elde edilen hiperisin, hiperforin gibi maddelerin farklı ekstre hazırlanış şekilleri ile miktar olarak değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Kantaron ekstresindeki bu gibi fotoaktif bileşenlerin varlığı, içeriğindeki antiapoptotik etkiden sorumlu maddelerin miktarlarının değişmesine yol açmaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar göstermiştir ki *H. perforatum* ekstresi fare akciğer dokusunda sigara dumanı ile oluşturulan apoptozu anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir. Bu durum bitki ekstresinin, özellikle KOAH ve amfizem gibi ciddi akciğer hastalıklarında dahi bu tarz çeşitli rahatsızlıkların önlenmesinde kullanılabileceğine dikkat çekmektedir. Ayrıca moleküler düzeyde yaptığımız çalışmayla apoptozun hangi yollar aracılığıyla önlediği de ortaya konmuştur. Bu da bitkinin etki mekanizmasını açıklamak açısından önemlidir. Ancak sigara bırakıldıktan sonra bile meydana gelen/ devam eden rahatsızlıkların belirtilerini önlemede apoptozun terapötik hedef olarak kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak sigara dumanı veya diğer sebeplerle yapısal akciğer hücrelerinin apoptoz ve rejenerasyonu arasındaki denge bozulması, sağlıklı akciğer dokularının yıkımına neden olduğu için, bu durum *H. perforatum* ekstresinin potansiyel kullanımının değerlendirilmesini önemli kılmaktadır. Yapılacak ileriki çalışmalarla bitki ekstresi akciğer hastalıklarının önlenmesinde terapötik bir ajan olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

1. **Yang J, Moon H, Chettimada S, Jin Y.** Cross-talk between apoptosis and autophagy in lung epithelial cell death. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, **2014**; 2 (2): 99-109.
2. **Park EM, Park YM, Gwak YS.** Oxidative damage in tissues rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Bio Med*, **1998**; 25: 79-86.
3. **BruntlandGH.** The World Health Report. *World Health Organization*; Genova, **1999**.
4. **He XM, Zhou Y, Xu MZ, Li Y, Li HQ, Li WY.** Effects of long-term smoking on the activity and mRNA expression of CYP isozymes in rats. *Journal of Thoracic Diseases*, **2015**; 7(10): 1725-1731.
5. **Tsuchiya M, Asad A, Kasahra E, Sato EF, Shino M, Lnoe M.** Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentration of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*, **2002**; 105:1155-1157.
6. **Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM.** Adverse effects of cigarette smoke on NObioavailability: Role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*, **2006**; 48(2): 278-285.
7. **Guo X, Oldham MJ, Kleinman MT, Phalen RF, Kassab GS.** Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. *Am J Physiol Heart CircPysiol*, **2006**; 291(5):H2354-H2361.
8. **Li T, Molteni A, Latkovich P, Catellani W, Baybutt RC.** Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with the development of emphysema in rats. *J Nutr*, **2003**; 133(8): 2629-2634.
9. **Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Selecı D, Enli Y, Kaftan HA, Kilic M.** Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries. *Circ J.*, **2006**; 70(5): 593-599.
10. **Barua RS, Ambrose JA, Reynolds LJE, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC.** Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity. *Journal of the American College of Cardiology*, **2002**; 1758-1763.
11. **Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J.** Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. *The Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. Circulation*, **1994**; 90:2905-2908.
12. **Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH.** Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. *Circulation*, **1992**; 86: 1664-1692.
13. **Smith CJ, Fischer TH.** Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*, **2001**; 158: 257-267.
14. **Ahmed A1, Thlivers JA, Sahw A, Sowa M, Gilchrist J, Scott JE.** Caspase 3 activity in isolated fetal rat lung fibroblasts and rat periodontal ligament fibroblasts: Cigarette smoke induced alternations. *TobInduc Dis*, **2013**; 11(1):25. Doi: 10.1186/1617-9625-11-25.
15. **Banerjee S1, Maity P, Mukherjee S, Sil AK, Panda K, Chattopadhyay D, Chatterjee IB.** Black tea prevents cigarette smoke-induced apoptosis and lung damage. *J Inflamm (Lond)*, **2007**; 4:3.
16. **Görür A.** Hepatosellüler karsinomda apoptozis mekanizması ve bazı benzimidazol türevlerinin hepatosellüler karsinom üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, **2008**.

17. **Akşit H, Bidik A.** Apoptozis. *YYÜ VET FAK DERG*, **2008**; 19(1):55-63.
18. **Jang MH, Lee TH, Shin Mc, Bahn GH, Jim JW, Shin DH, Kim EH, Kim CJ.** Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn. ( St. John's Wort) against Hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett*, **2002**; 329(2): 177-180.
19. **Kıyan S, Urangil Y, Altuncı YA, Çavuşoğlu T, Çetin Urangil EÖ, Karabey F.** Investigation of acute effects of *Hypericum perforatum*(St. John's Wort-Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulusal Travma Acil Cerrahi Deg*, **2015**; Vol.20, No. 5.
20. <https://wildseed.co.uk/species/view/219>
21. **Linde K, Berner MM, Kriston L.** St. John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev*, **2008**; 4:CD000448.CrossRef
22. **Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, et al. Klein S, Rister RS (trans).** The complete German Commission E Monographs-therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin, TX: American Botanical Council; Boston: *Integrative Medicine Communication*; **1998**.
23. **Martinez B, Kasper S, Rhrmann S, Möller HJ.**Hypericum in the treatment of seasonal affective disorders. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, **1994**; 7Suppl 1:29-33.CrossRef
24. **Taylor LH, Kobak KA.** An open-label trial of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*, **2000**; 61:575-578.CrossRef
25. **Stevinson C, Ernst E.** A pilot study of *Hypericum perforatum* for the treatment of premenstrual syndrome. *BJOG*, **2000**; 107:870-876.CrossRef
26. **Grube B, Walper A, Wheatly D.** St. John's Wort extract: efficacy for menopausal symptoms of psychological origin. *Adv Ther*, **1999**; 16:177-186.
27. **Weiss R, Fintelmann V.** *Herbal Medicine*, 2<sup>nd</sup>ed, New York, Thieme, **2000**; 235.
28. **Türk Eczacılık Tarihi Simgesi Eczacılık Tarihi Araştırmaları (Ed. A.fMat)**, 3, İstanbul Üniv. Yay.No.4390, *Eczacılık Fak. Yay. No.80*, İstanbul, **2003**.
29. **Pulok KM, Rob V, Suresh B.** Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *Journal of Ethno-Pharmacology*, **2000**; 70:315-321.
30. **Nazıroğlu M1, Sahin M, Ciğ B, Aykur M, Erturan I, Ugan Y.** *Hypericum perforatum* modulates apoptosis and calcium mobilization through voltage-gated and TRPM2 calcium channels in neutrophil of patients with Behcet's disease. *J Membr Biol*, **2014**; 247(3):253-62.doi: 10.1007/s00232-014-9630-7
31. **Zou YP1, Lu YH, Wei DZ.** Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother Res.*, **2010**; 24Suppl 1:S6-S10. doi: 10.1002/ptr.2852.
32. **Guyton C.** *Tıbbi Fizyoloji*. 12.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2013.
33. **Türk Toraks Derneği.** *Temel Akciğer Sağlığı ve Hastalıkları*. 2.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2015**.

34. **Behr J, Nowak D.** Tobacco smoke and respiratory disease. In: D'Amato G, Holgate ST (Eds.). The impact of Air Pollution on Respiratory Health. 1st. Sheffield. *ERS Journal Ltd. EurRespir Monography*, 2002; p. 161-79.
35. **Pryor WA, Stone K.** Oxidants in cigarette smoke; radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate and peroxynitrite. *Ann NY AcadSci*, 1993; 686: 12-28.
36. **Gücün M.** Sigarakullaniminin trombositoz fonksiyonları üzerine etkisinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Türkiye, 2009.
37. **Ambrose JA, Barua RS.** The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 43: 1731-37.
38. **International Agency for Research on Cancer:** Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk Of Chemicals to Humans. Volume 38. Lyon, *International Agency for Research on Cancer*, 1986.
39. **US Department of Health and Human Services:** The Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No (CDC) 89-8411, 1989.
40. **Hecht SS, Hoffmann D.** Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 1988; 9:875.
41. **Zevin S, Saunders S, Gourlay SG, Jacob P, Benowitz NL.** Cardiovascular Effects of Carbon Monoxide and Cigarette Smoking. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 38:1633-38.
42. **Tuder RM, Voelkel NF.** *The pathobiology of chronic bronchitis and emphysema.* 3rd Ed, London: BC Decker Inc, 2002; p.: 90-113.
43. **Gilman AG, Goodman LS, Gilman A.** *Goodman and Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics.* 6th Ed, New York, Mac Millan Publishing Co. 1980; 558.
44. **Al-Bader A, Omu AE, Dashti H.** Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation. *Arch Androl*, 1999; 43: 135-140.-
45. **Ridker PM, Genest J, Libby P.** *Risk Factors Atherosclerotic Disease.* 6th ed, Philadelphia, WB Saunders, 2001; p.: 1010-40.
46. **Richter P, Faroon O, Pappas RS.** Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017; 14:1154. doi:10.3390/ijerph14101154
47. **Habeebu SS, Liu J, Klassen CD.** Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998; 149:203-209.
48. **Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, 1989; 70: 737-757.
49. **Church DF, Pryor WA.** Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985; 64: 111-126.
50. **Mussalo-Rauhamaa H, Salmela SS, Leppanen A, Pyysalo H.** Cigarette as a source of some trace and heavy metals and pesticides in man. *Arch Environ Health*, 1986; 41: 49-55.
51. **Orrenius S, McConkey DJ, Nicotera P.** Role of calcium in toxic and programmed cell death. *Biol React Intermed*, 1991; 283: 419-425.

52. **Karlıkaya C, Öztuna F, Solak Z, Özkan M.**Tütüncü kontrolü. *Toraks Dergisi*,**2006**; 7(1): 51- 64.
53. **Shapiro SD, Snider GL.** Obstructive diseases. *Textbook of Respiratory Medicine*. 4th Ed, Philadelphia, Curtis Center, 2005; 1115-1153.
54. **Calverley P, Bellamy D.** The challenge of providing better care for patients with chronic obstructive disease: the poor relation of airways obstruction. *Thorax*, **2000**;117:15-1911
55. **Sahpiro SD.** The macrophage in COPD. *Am J Resipr Crit Care Med*, **1999**; 160:29-32.
56. **GülbayBE,Acıcan T.** Patogenezveİnflamasyon.*KronikObstruktifAkciğerHastalığı*. Ankara, Bilimsel tıp yayınevi, **2003**; B2:21-33.
57. **Sakhatsky P, Miranda GAG, Newton J, Lee CG, Choundhary G, Vang A, Rounds S, Lu Q.** Cigarette Smoke-induced lung endothelial apoptosis and emphysema is associated with impairment of FAK and eIF2 $\alpha$ . *Microvasc Res*, **2014**; 94: 80-89.
58. **King PT, Sharma R, O'Sullivan KM, Callaghan J, Dousha L, Thomas B, Ruwanpura S, Lim S, Farmer MW, Jenings BR, Finsterbush M, Brooks G, Selemidis S, Andeson GP, Holdworth SR, Bardin PG.** Deoxyribonuclease 1 reduces pathogenic effects of cigarette smoke exposure in the lung. *Scientific Reports*, **2014**; 7:12128 doi:10.1038/s41598-01712474-5.
59. **Fauler J, Frolich JC.** Cigarette smoking stimulates cysteinyl leukotriene production in man. *Eur J Clin Invest.*, **1997**; 27: 43-7.
60. **Ghosh A, Choudhury A, Das A, Chatterjee NS, Das T, Chowdhury R, Panda K, Banerjee R, Chatterjee IB.** Cigarette smoke induces *p*-benzoquinone–albumin adduct in blood serum Implications on structure and ligand binding properties. *Toxicology*,**2011**; 10.1016/j.tox
61. **Tan SX, Jang DX, Hu RC, Dai AG, Gan GX, Fu DY, Kong CC, Chen YR, Wank LL.** Endoplasmic Reticulum Stress Induces HDR1 to Protect Alveolar Type II Epithelial Cells from Apoptosis Induced by Cigarette Smoke Extract. *Cellular Physiology and Biochemistry*,**2017**; 43:1337-1345.
62. **Krupski WC.** The peripheral vascular consequences of smoking. *Ann VascSurg*,**1991**;5:291-304.
63. **McBride PE.** The health consequences of smoking: cardiovascular diseases. *Med Clin North Am*,**1992**;76:333-353.
64. **Zimmerman M, McGeachie J.** The effect of nicotine on aortic endothelium: a quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis*,**1987**; 63: 33-41.
65. **Roberge S, Bazin M, Bouter M.** Endothelial cell coat modifications in rat thoracic aorta. Effect of ovariectomy and cigarette smoke. *Experientia*,**1983**; 39: 72-74.
66. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** Robbins Pathologic Basis of Disease. *WB Saunders Comp*,**1994**: 473-476.
67. **Pittilo RM.** Cigarette smoking and endothelial injury: a review. *AdvExp Med Biol*,**1991**; 273: 61-78.
68. **Folts JD, Gering SA, Laibly SW. et al.** Effects of cigarette smoke and nicotine on platelets and experimental coronary artery thrombosis. In Diana J (ed): Tobacco Smoking and Atherosclerosis: Pathogenesis and Cellular Mechanisms. New York, Plenum Publishing, **1990**,pp 339-358.
69. **US Department of Health, Education, and Welfare:** The Helath Benefits of Smoking Cessation: A Reparat of the Surgeon General. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No (CDC) 90-8416, **1990**.

70. **Hegarty KM, Turgiuss LE, Mulligan JJ. et al.** Effect of cigarette smoking on high density lipoprotein phospholipids. *BiochemBiophys Res Commun*,**1982**; 104:212-219.
71. **Barrett-Connor E, Tee Khaw K.** Cigarette smoking and increased central adiposity. *Ann Intern Med*, **1989**; 111:783-787.
72. **Lindell G, Bukhave K, Lilja I, Madsen JR, Graffner H.** Acute effects of high-dose intragastric nicotine on mucosal defense mechanisms: an analysis of nicotine, prostaglandin E2, phospholipase A2, and phospholipids. *Dig Dis Sci*,**1997**;42(3):640-644.
73. **Henderson B, Csordas A, Backovic A, Kind M, Bernhard D, Wick G.** Cigarette smoke is an endothelial stressor and leads to cell cycle arrest. *Atherosclerosis*,**2008**; 201:298–305
74. **Lu Q, Sakhatskyy P, Grinnell K, Newton J, Ortiz M, Wang Y, Sanchez-Esteban J, Harrington EO, Rounds S.** Cigarette smoke causes lung vascular barrier dysfunction via oxidative stress-mediated inhibition of RhoA and focal adhesion kinase. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol*, **2011**; 301(6):L847-57.
75. **Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A.** Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol*, **2006**;41(2):275-84.
76. **Wright JL, Tai H, Churg A.** Cigarette Smoke Induces Persisting Increases of Vasoactive Mediators in Pulmonary Arteries. *Am. J. Respir.*,**2004**; pp. 501–509.
77. **Eşrefoğlu M.**Cell Injury and Death: Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *TürkiyeKlinikleri J Med Sci*, **2009**; 29(6): 1660-76.
78. **Curtin JF, Donovan M, Cotter TG.** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, **2002**; 265(1-2): 49-72.
79. **Korkmaz F.**İsrganotu (*urticadioica*) ekstreseininkolonkanseri hücre serileri üzerinde ki apoptotik, antiproliferatif ve antioksidan etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Türkiye, **2010**.
80. **Griffith OW, Meister A.** Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl AcadSci USA*,**1985**;82(14):4668-72.
81. **Cohen JJ.** Apoptosis. To Be Or Not To Be. *Postgraduate Syllabus*, **1998**; 1: 1–19
82. **Alpaslan Balkan BM.** HEPG2 hücrelerinde selenyum ve vitamin c'nin apoptozis üzerindeki etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Türkiye, **2012**.
83. **Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I.** The Pharmacology of Apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, **1999**; 20:35-42.
84. **Green DR.** Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*,**1998**; 94(6): 695-8.
85. **Gastman BR.** Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*,**2001**; 23(5): 409-25.
86. **Kaufmann SH, Gores GJ.** Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays*,**2000**; 22: 1007-1017.
87. **Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC.** Apoptosis-associated caspase activation assays. *Elsevier*, **2008**; 44: 262–272.
88. **Reed JC.** Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*,**2000**; 157:1415–1430.

89. **O'Brien MA, Kirby R.** Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Car*, **2008**; 18(6): 572–585.
90. **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell*, **2004**; 116 (2): 205-219.
91. **Öncül S.** Karaciğer ve meme kanseri hücreleri ile embriyonik böbrek hücrelerinde doksorubisinin apoptotik genlerin ve mdr-1 geninin ekspresyon düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Türkiye, **2013**.
92. **Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, **2007**; 87(1):99-163.
93. **LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG.** IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, **2008**; 27(48): 6252-6275.
94. **Hengartner MO.** Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, **2001**; 104(3):325-328.
95. **Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A.** Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2003**; 1010:186-194.
96. **Immunityageing.** (t.y.). Erişim: 18 Eylül **2013**, <http://www.immunityageing.com/content/figures/1742-4933-3-5-1-1.jpg>
97. **Dash P.** Basic Medical Sciences, *St. George's, University of London*. [www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash) (Electronic journal)
98. **Gustafsson AB, Gottlieb RA.** Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**; 292(1):C45-51.
99. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **1998**; 3(11): 697-707.
100. **Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B.** Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO Journal*, **2005**; 24 (12):2096-2103.
101. **Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N.** Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **2000**; 103(4): 645-654.
102. **Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B.** Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, **2007**; 12(5):887-896.
103. **Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **2001**; 1551(2): F1-37.
104. **Lowe SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **2000**; 21:485–495.
105. **Yılmaz N, Pençe S, Kaspazlar İ.** *İbni Sina Tıp Derg*; **2002**; 127-146.
106. **Cuoltas L, Strasser A.** The molecular Control of DNA damage-induced Cell Death. *Apoptosis*, **2000**; 5:491-507.
107. **Shi Y.** Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses and Perspectives. *Journal of Cancer Molecules*, **2005**; 1(1): 9-18.
108. **Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J.** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **2005**; 37(11):719-27.

109. **Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins, **2004**.
110. **Sheikh MS, Fornace AJ.** Role of p53 family in apoptosis. *J Cell Physiol*, **2000**; 182:171-181.
111. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisinönemi. *ToraksDergisi*, **2001**; 2(1):91-95.
112. **Dayan YB, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Shoenfeld Y.** Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies? *Medical Hypotheses*, **2000**; 55(2):103–108.
113. **Saraste A, Pulkki K.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, **2000**; 45:528-537.
114. **Roshal M, Zhu Y, Planelles V.** Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, **2001**; 6:103–116.
115. [www.acikarsiv.gazi.edu.tr/File.php?Doc\\_ID=2991](http://www.acikarsiv.gazi.edu.tr/File.php?Doc_ID=2991) (Yayımlanmamış)
116. **Barnes J, Andeson LA, Phillipson JD.** St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2001**; 53:583-600.
117. **Kaçar O, Azkan N.** Sarı Kantaron'da (*Hypericum perforatum* L.) HiperisinveÜstDrogHerbaVerimiileBazıMorfolojikveAgronomikÖzelliklerArasındakiİlişkiler. *Uludag.Üniv.Zir.Fak.Derg.*, **2004**; 18(2): 109-122.
118. **Çakmak HE, Bayram E.** MuğlaOrijinli Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) PopulasyonlarınınBazıAgronomikveKaliteÖzelliklerininBelirlenmesi. *EgeÜniv. ZiraatFak. Derg.*, **2003**, 40(1):57-64.
119. **Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. eds.** Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Newton, MA. *Integrative Medicine Communications*, **2000**; 359-366.
120. **Sarımahmut M, Balıkcı N, Celikler S, Ari F, Ulukaya E, Guleryuz G, Ozel MZ.** Evaluation of genotoxic and apoptotic potential of *Hypericum adenotrichum* Spach. in vitro. *Regul Toxicol Pharmacol*, **2016**; 74:137-46.
121. **Upton R.** St. John's Wort Monograph. Herbalgram #40. *American Herbal Pharmacopoeia*, **1997**; 3-38.
122. **Snow JM.** *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). *Protocol J Bot Med*, **1996**; 2:16-21.
123. **Saddiqe Z, Naem I, Maimoon A.** A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**; 131:511-521.
124. **Schey KL, Patat S, Chignell CF, Datillo M, Wang RH, Roberts JE.** Photooxidation of lens alpha-crystallin by hypericin (active ingredient in St. John's Wort). *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **2000**; 72: 200-203.
125. [https://pharmaxchange.info/2012/12/pharmacognosy-of-st-johns-wort/hypericin\\_and\\_pseudohypericin\\_structure/](https://pharmaxchange.info/2012/12/pharmacognosy-of-st-johns-wort/hypericin_and_pseudohypericin_structure/)
126. **Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuk K, Tamaoki T.** Hypericum and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1989**; 165: 207-212.
127. **Lavie G, Meruelo D, Aroyo K, Mandel M.** Inhibition of the CD8+ T cell-mediated cytotoxicity reaction by hypericin: potential for treatment of T cell-mediated diseases. *International Immunology*, **2000**; 12: 479-486.

128. **Zhao J, Meng W, Miao P, Yu Z, Li G.** Photodynamic effect of hypericin on the conformation and catalytic activity of hemoglobin. *International Journal of Molecular Science*, **2008**; 9:145-153.
129. **Vandenbogaerde AL, Kambuhabwa A, Delaey E, Hirnpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA.** Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **1998**; 45: 87-94.
130. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942204005916>
131. **Tekelova D, Repcak M, Zemkova E, Toth J.** Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, **2000**; 66:778–780.
132. **Meier B.** Comparing phytochemicals: the example of St. John's Wort. *Advances in Therapy*, **2001**; 18:35–45.
133. **Verotta L, Appendino G, Belloro E, Jakupovic J, Bomardelli E.** Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, **1996**; 2:770–772.
134. **Verotta L, Appendino G, Jakupovic J, Bomardelli E.** Hyperforin analogues from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, **2000**; 63:412–415.
135. **Shan MD, Hu LH, Chen ZL.** Three new hyperforin analogues from *Hypericum perforatum*. *Journal of Natural Products*, **2001**; 64:127–130.
136. **Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE.** Hyperforin as a possible antidepressant component of *hypericum* extracts. *Life Sciences*, **1998**; 63: 499-510.
137. **Chatterjee SS, Biber A, Weibezahn C.** Stimulation of glutamate, aspartate and gammaaminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry*, **2001**; 34(Suppl. 1):S11-S19.
138. **Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Glib B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC.** Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's Wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*, **2002a**; 21:1242-1250.
139. **Verotta L, Appendino G, Bamardelli E, Brun R.** In vitro antimalarial activity of hypericin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**; 17:1544-1548.
140. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/25513>
141. **Pietta P, Gardana C, Pietta A.** Comparative evaluation of St. John's Wort from different Italian regions. *Farmaco*, **2001**; 56: 491-496.
142. **Mártonfi P, Repčák M, Ciccarelli D, Garbari F.** *Hypericum perforatum* L., - chemotype without rutine from Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2001**; 29:659-5-661.
143. **Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, Nahrstedt A.** Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*, **1998**; 64:291–294.
144. <https://en.wikipedia.org/wiki/Amentoflavone>
145. [https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid)

146. **Radusiene J, Judzentiene A, Bernotiene G.** Essential oil composition and variability of *hypericum perforatum* L. growth in Lithuania. *Biochemical Systematics and ecology*, **2005**; 33:113-124.
147. **Di Carlo G, Bornelli F, Ernst E, Izzo AA.** St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22:292-297.
148. **Laakmann G, Schule C, Baghai T, Kieser M.** St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, **1998**; 31(Suppl. 1):54-59.
149. **Treiber K, Müller WA.** Effects on transmitter uptake and their cellular and molecular basis. In: St. John's Wort and Its Active Principles in Depression and Anxiety (Müller WE, Ed.), Birkhauser Verlag, Switzerland, **2005**.
150. **Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Blatt S, Wagner H.** Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med*, **1984**;50: 272-274.
151. **Gobbi M, Dalla Valle F, Ciapparelli C, Diomede L, Morazzoni P, Verotta L, Caccia S, Cervo L, Mennini T.** *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **1999**; 360:262-269.
152. **Müller WE, Singer A, Wonneman M, Hafner U, Rolli M, Schafer C.** Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, **1998**;31(Suppl. 1): 16-21.
153. **Roz N, Mazur Y, Hirshfeld A, Rehavi M.** Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. *Life Sci*, **2002**;71: 2227-2237.
154. **Roz N, Rehavi M.** Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci*, **2003**;73: 461-470.
155. **Menini T, Gobbi M.** The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci*, **2004**;75:1021-1027.
156. **Müller WE, Rolli M, Schafer C, Hafner U.** Effect of *Hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, **1997**;30: 102-107.
157. **Neary JT, Whittemore SR, Bu Y, Mehta H, Shi YF.** Biochemical mechanisms of action *Hypericum* LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase. *Pharmacopsychiatry*, **2001**;34: S103-107.
158. **Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Costantino G, Infrerra G, Campo GM, Caputi AP.** Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *J Pharmacy Pharmacol*, **1999**;51: 723-728.
159. **Yu PH.** Effect of the *Hypericum perforatum* extract on serotonin turnover in the mouse brain. *Pharmacopsychiatry*, **2000**;33: 60-65.
160. **Teufel-Mayer R, Gleitz J.** Effects of long-term administration of *Hypericum* extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *Pharmacopsychiatry*, **1997**;30: 113-116.
161. **Contreras CM, Marván ML, Alcalá-Herrera V.** Sleep deprivation is a less potent agent than clomipramine in increasing firing rate in lateral septal neurons in the rat. *Neuropsychobiology*, **1993**; 27:83- 85.
162. **Detke MJ, Johnson J, Lucki I.** Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharm*, **1997**; 5:107-112.

163. **Raffa RB.** Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St. John's wort releaves sigma receptor. *Life Sci.*, **1998**; 62: PL265-PL270.
164. **Butterweck V, Christofeel V, Nahrstedt A, Peterreit F, Spengler B, Winterhoff H.** Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different Hypericum preparations in behavioral models. *Life Science*, **2003**; 73:627-639.
165. **Harrer G, Hubner WD, Podzuweit H.** Effectiveness and tolerance of the Hypericum extract LI 160 compared to maprotiline: a multicenter double-blind study. *J Geriatr Psychiat Neurol.*, **1994**;7: S24-S28.
166. **Vorbach EU, Arnoldt KH, Hübner WD.** Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10. *Pharmacopsychiatry*, **1997**;30: 81-85.
167. **Brenner R, Azbel V, Madhusoodaman S, Pawlowska M.** Comparison of an extract of Hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clin Ther*, **2000**;22: 411-419.
168. **Schrader E.** Equivalence of St. John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int Clin Psychopharmacol*, **2000**;15: 61-68.
169. **Volz HP, Laux P.** Potential treatment for subthreshold and mild depression: a comparison of St. John's wort extracts and fluoxetine. *Compr Psychiat*, **2000**;41: 133-137.
170. **Laakmann G, Dienel A, Kieser M.** Clinical significance of hyperforin for the efficacy of Hypericum extracts on depressive disorders of different severities. *Phytomed*, **1998**;5: 435-442.
171. **Witte B, Harrer G, Kaptan H, Podzuweit H, Schmidt U.** Treatment of depressive symptoms with a high concentration hypericum preparation. A multicenter placebo-controlled double-blind study *Fortschr Med*, **1996**;113: 404-408.
172. **Woelk H.** Comparison of St. John's wort and imipramine for treating depression: randomized controlled trial. *Brit Med J*, **2000**;321: 536- 539.
173. **Linde K, Mulrow CD.** St. John's Wort for depression (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, **2001**; Issue 1, Oxford: Updated Software.
174. **Leclubier Y, Clerc G, Didi R, Kieser M.** Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiat*, **2002**;159: 1361-1366.
175. **Franklin M, Chi J, McGavin C, Hockney R, Reed A, Campling G, Whale RW, Cowen PJ.** Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of Hypericum extract (LI 160) in healthy volunteers. *Biol Psychiat*, **1999**; 46:581-584.
176. **Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E.** Effect of acute administration of Hypericum perforatum-CO<sub>2</sub> extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. *Pharmacopsychiatry*, **2000**;33: 14-18.
177. **Szegedi A, Kohnen R, Dienel A, Kieser M.** Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St. John's Wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ online first paper*, **2005**. doi: 10.1136/mbj.38356.655266.82.
178. **Stevinson C, Ernst E.** Hypericum for depression. An update of the clinical evidence. *Eur Neuropsychopharmacol*, **1999**; 9:501-505.
179. **Cass H.** St. John's wort as an herbal treatment for depression general considerations for the use of herbs in mental health. *Sem Integr Med*, **2003**;1: 191-198.

180. **Rodriguez-Landa JF, Contreras CM.** A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomed*,**2003**;10: 688-699.
181. **Schulz V.** Clinical trials with *Hypericum* extracts in patients with depression: results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs. *Phytomed*,**2002**; 9:468–474.
182. **Lavagana SM, Secci D, Chimenti P et al.** Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in the childbirth with caesarean section. *Farmacologia*,**2001**;25:451-453.
183. **Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y.** Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *J Ethnopharmacol.*, **2007**; 111(1):33-39.
184. **Süntar IP, Akkol EK, Yılmaz D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yeşilada E.** Investigation on the in vivo healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*,**2010**; 127(2):468-477.
185. **Süntar IP, Akkol EK, Keleş H, Oktem A, Can Beşer KH.** A novel wound healing ointment: a formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano oils based on traditional Turkish knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*,**2011**; 134:89-96.
186. **Prisacaru AI, Andritoiu CV, Andriescu C, Havarenau EC, Popa M, Motoc AGM, Sava A.** Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*,**2013**; 54(4):1053-1059.
187. **Yadollah-Damavandi S, Chavoshi-Nejad M, Jangholi E, Nekouyan N, Houseini S, Seifae A, Rafiee S, Karimi H, Ashkani-Esfahani S, Parsa Y, Mohsenikia M.** Topical *Hypericum perforatum* Improves Tissue Regeneration in Full-Thickness Excisional Wounds in Diabetic Rat Model. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,**2015**; article ID:245328.
188. **Yaşar M, Kaya A, Karaman H, Kavugudermaz M, Polat H, Sağıt M, Özcan I.** Potential Curative Role of *Hypericum Perforatum* in an Experimental Rat Model of Tympanic Membrane Perforation. *The Journal of International Advanced Otolaryngology*,**2016**; 12(3):252-256.
189. **Seferos N, Petrokokkinos L, Kotsiou A, Rallis G, Tesseromatis C.** *Hypericum perforatum* L. treatment restored bone mass changes in swimming stressed rats. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*,**2016**; vol.18 No.1.
190. **Yücel A, Kan Y, Yesilada E, Akın O.** Effects of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) oily extract for the care and treatment of pressure sores; a case report. *Journal of Ethnopharmacology*,**2017**; 196:236-241.
191. **Altıparmak M, Eskitaşçıoğlu T.** Comparison of Systemic and Topical *Hypericum perforatum* on Diabetic Surgical Wounds. *Journal of Investigative Surgery*,**2015**. (Electronic Journal)  
Erişim: <http://dx.doi.org/10.1080/08941939.2016.1272654>.
192. **Hajhashemi M, Ghanbari Z, Movahedi M, Rafieian M, Keivani A, Haghollahi F.** The Effect of *Achillea millefolium* and *Hypericum perforatum* ointments on episiotomy wound healing in primiparous woman. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*,**2017**. (Electronic Journal)  
Erişim: <http://dx.doi.org/10.1080/1476058.2016.1275549>
193. **Kolesnikova AG.** Bactericidal and immunocorrective properties of plant extracts. *Zhurnal Mikrobiologii i Epidemiologii I Immunobiologii*,**1986**; 3: 75-78.
194. **Reichling J, Wseler A, Saller R.** A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*,**2001**; 34: S116-S118.

195. **Avato P, Raffo F, Gulglielmi G, Vitali C, Rosato A.** Extracts from St. John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy research*,**2004**; 18:230-232.
196. **Mazandarani M, Yassaghi S, Rezaei MB, Mansourian AR, Ghaemi EO.** Ethnobotany and antibacterial activity of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Assian Journal of Plants Sciences*, **2007**; 6:354-358.
197. **Conforti F, Poli F.** Comparative chemical composition and variability of biological activity of methanolic extracts from *Hypericum perforatum* L. *Natural Product Research*,**2005**; 19: 295-303.
198. **Barbagallo C, Chisari G.** Antimicrobial activity of three *Hypericum* species. *Fitoterapia*,**1987**; 58: 175-177.
199. **Molochko VA, Lastochkina TM, Krylov IA, Brangulis KA.** The antistaphylococcal properties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylactic formulations for the skin. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*,**1990**; 8: 54-56.
200. **Danilo MS, Laptev Yu V, Bochkaryova MV.** Antibacterial effects of some medicinal plants of the Eastern Kazakhstan. *Medicinal Raw Material and Phytopreparations for Medicine and Agriculture*,**1999**; 318.
201. **Meral GE, Karabay NU.** In vitro antibacterial activities of three *Hypericum* species from West Anatolia. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology (Special Issue)*,**2002**; 6:10.
202. **Lasik M, Nowk J, Stachowiak B, Czarnecki Z.** Evaluation of the antagonistic properties of natural antibacterial substances extracted from herbs: poster presentation. *Eurobiotech*,**2007**; 54: 10.
203. **Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NJ, Bicsboer DD, Bey RF.** Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*,**2008**; 2:98-110.
204. **Milosevic T, Solujic S, Sukdolak S.** In Vitro Study of Ethanolic Extract of *Hypericum perforatum* L., on Growth and Sporulation of Some Bacteria and Fungi. *Turkish Journal of Biology*,**2007**; 31: 237-241.
205. **Maskovic P, Solujic S.** A preliminary study on the antifungal activity of the ethanol extract of *hypericum perforatum* L. The book of abstracts. *Eleventh annual conference "YUCOMAT 2009"*, Herceg-Novri, August 31-September, **2009**; 4: p. 192.
206. **Vattikuti RUM, Ciddi C.** An overview on *Hypericum perforatum* Linn. *Natural Product Radiance*,**2005**.
207. **Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W.** Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res*,**1990**;13: 313-325.
208. **Kraus GA, Pratt D, Tossberg J, Carpenter S.** Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs. *Biochem Biophys Res Commun*,**1990**;172: 149-153.
209. **Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GHN.** Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res*,**1991**;15: 101-112.
210. **Hudson JB, Harris L, Towers GHN.** The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin. *Antiviral Res*,**1993**; 20:173-178.
211. **Moraleda G, Wu TT, Jilbert AR, Aldrich CE, Condreay LD, Larsen SH, Tang JC, Colacino JM, Mason WS.** Inhibition of duck hepatitis B virus replication by hypericin. *Antiviral Res*,**1993**;20: 235-247.

212. **Fehr MJ, Carpenter SL, Petrich JW.** The role of oxygen in the photoinduced antiviral activity of hypericin. *Bioorg Med Chem Lett*,**1994**; 4:1339-1344.
213. **Axarlis S, Mentis A, Demetzos C, Mitaku S, Skaltsounis AL, Marselos M, Malamas M.** Antiviral in vitro activity of *Hypericum perforatum* L. extract on the human cytomegalovirus (HCMV). *Phytother Res*,**1998**; 12:507-511.
214. **Huang N, Singh N, Yoon K, Loiacono CM, Kohut ML, Birt DF.** The Immuno-Regulatory Impact of Orally-Administrated *Hypericum perforatum* Extract on Balb/C Mice Inoculated with H1N1 Influenza A Virus. *Plos One*, **2013**; Volume 8, Issue 9.
215. **Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL.** Effect of St.John's wort on free radical production. *Life Sci*,**2001**; 69:181-190.
216. **El-Sherbiny DA, Khalifa AE, Attia AS, Eldenshary EEDS.** *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnesic dose of scopolamine. *Pharmacol Biochem Behavior*,**2003**; 76:525-533.
217. **Herold A, Cremer L, Calugaru A, Tamas V, Ionescu F, Manea S, Szegeli G.** Antioxidant properties of some hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Rom Arch Microbiol Immunol*,**2003**;62: 217-227.
218. **Zhou YP, Lu YH, Wei DZ.** Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem*,**2004**; 52:5032-5039.
219. **Luo L, Sun Q, Mao YY, Lu YH, Tan RX.** Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. *J Ethnopharmacol*,**2004**; 93:221-225.
220. **Benedi J, Arroyo R, Romero C, Martin-Aragon S, Viller AM.** Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Science*,**2004**; 75:1263-1276.
221. **Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP.** Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*,**2005**;90: 157-167.
222. **Ivanova D, Gerova D, Cervenkov T, Yankova T.** Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*,**2005**; 96:145-150.
223. **Radulovic N, Stankov-Jovanovic V, Stojanovic G, Smelcerovic A, Spitteller M, Asakawa Y.** Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chem*,**2007**;103: ,15-21.
224. **Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Crisafulli C, Genvese T, Di Bella P, Esposito E, Menegazzi M, Meli R, Suzuki H, Cuzzocrea S.** Protective effect of *Hypericum perforatum* in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*,**2007**; 16:118-130.
225. **Oblozinsky M, Bezakova L, Holkova I, Vanko M, Kartnig T, Psenak M.** Antilipoxygenase activity of compounds from *Hypericum perforatum*. *Biologia*,**2006**;61: 331-332.
226. **Albert D, Zündorf I, Dingermann T, Müller WE, Steinhilber D, Werz O.** Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharm*,**2002**;64: 1767-1775.
227. **Savikin K, Dobri S, Tadi V, Zduni G.** Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. *Phytother Res*,**2006**; 21:176-180.

228. **Menegazzi M, Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Genovese T, Crisafulli C, Suzuki H, Cuzzocrea S.** *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Free Radical Biology & Medicine*,**2006**; 40:740-753.
229. **Dell'Aica I, Niero R, Piazza F, Cabrelle A, Sator L, Colalto C, Bruetta E, Lorusso G, Benelli R, Albini A, Calabrese F, Agostini C, Garbisa S.** Hyperforin Blocks Neutrophilic Activation of Matrix Metalloproteinase-9, Motility and Recruitment, and Restrains Inflammation-Triggered Angiogenesis and Lung Fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,**2007**; 321:492-500.
230. **Paterniti I, Briguglio E, Mazzon E, Galuppo M, Oteri G, Cardoso G, Cuzzocrea S.** Effects of *Hypericum Perforatum*, in a rodent model of periodontitis. *Complementary & Alternative Medicine*,**2010**; 10:73.
231. **Kaplan HM, İzol V, Aridogan İA, Olgan E, Yegani AA, Pazarci P, Şingirik E.** Protective Effect of *Hypericum perforatum* extract on Gentamicin Induced Nephrotoxicity in mice. *International Journal of Pharmacology*,**2015**; doi:10.3923/ijp.2016.663.668.
232. **Di Carlo G, Nuzzo I, Capasso R, Sanges RM, Galdierp E, Capasso F, Carratelli RC.** Modulation of apoptosis in mice treated with Echinacea and St. John's Wort. *Pharmacological Research*,**2003**; 48:273-277.
233. **Cheung ZH, Leung MCP, Yip HK, Wu W, Siu FKW, So KF.** A Neuroprotective herbal mixture inhibits Caspase-3-independent Apoptosis in retinal Ganglion Cells. *Cell Mol Neurobiol*,**2008**; 28:137-155.
234. **Naziroglu M, Kuluhan S, Övery İS, Akyurt M, Yurekli VA.** Modulation of oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in leukocytes of patients with multiple sclerosis by *Hypericum perforatum*. *Nutritional Neuroscienc*,**2013**; (Electronic Journal)Erişim: <http://dx.doi.org/10.1179/1476830513Y.00000000083>
235. **Novelli M, Beffy P, Menegazzi M, De Tata V, Martino L, Sgrabosa A, Porozov S, Pippa A, Masini M, Marchetti P, Masiello P.** St. John's Wort extract and hyperforin protect rat and human pancreatic islet against cytokine toxicity. *Acta Diabetol*,**2014**; 51:113-121.
236. **Özdemir ÜS, Nazıroğlu M, Şenol N, Ghazizadeh V.** *Hypericum perforatum* Attenuates Spinal Cord Injury-Induced Oxidative Stress And Apoptosis in the Dorsal Root Ganglion of Rats: Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Mol Neurobiol*,**2016**; 53:3540-3551.
237. **Uslusoy F, Naziroglu M, Çiğ B.** Inhibition of the TRPM2 and TRV1 Channels through *Hypericum perforatum* in Sciatic Nerve Injury-Induced Rats Demonstrates their key role in apoptosis and Mitochondrial oxidative stress of sciatic nerve and Dorsal root Ganglion. *Frontiers in Physiology*,**2017**; doi:10.3389/fphys.2017.00335
238. **Hadjur G, Richard MJ, Parat MO, et al.** Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cells line MRC5. *J Photochem Photobiol Biol B*,**1995**; 27:139-146.
239. **Linde K, Ramirez G, Mulrow C, et al.** St. John's wort for depression- an overview and metaanalysis of randomized clinical trials. *BMJ*,**1996**; 313: 253-261.
240. **Vandenbogaerde AL, Delaey EM, Vatienghem AM, et al.** Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem Photobiol*,**1998**; 67:119-125.
241. **Colasanti A, Kisslinger A, Luizzi R, Quarto M, Riccio P, Roberti G, Tramontano D, Villani F.** Hypericin photosensitization of tumour and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem. Photobiol. B.*,**2000**; 54:103-107.

242. **Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, Karsan A, De witte PA.** Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res.*,**2000b**; 20:2579-2584.
243. **Liu CD, Kwan D, Saxton RE, McFadden DW.** Hypericin and Photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J. Surg. Res.*,**2000**; 93:137-143.
244. **Chung PS, Rhee CK, Kim KH, Paek W, Chung J, Paiva MB, Eshraghi AA, Castro DJ, Saxton RE.** Intratumoral hypericin and KTP laser therapy for transplanted squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*,**2000**; 1312-1316.
245. **Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, Witte PA.** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Im J Biochem Cell Biol*,**2002**; 34(3): 221-241.
246. **Miskovsky P.** Hypericin- a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Cure Drug Targets*,**2002**; 3(1):55-84.
247. **Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, et al.** Inhibition of human cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's Wort that acts by inhibition of apoptosis. *OncoGene*,**2002b**; 21:1242-1250.
248. **Stavropoulos NE, Kim A, Nseyo UU, Tsimaris I, Chung TD, Miller TA, Redlak M, Nseyo UO, Skalkos D.** *Hypericum perforatum* L. extract-Novel photosensitizer against human bladder cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*,**2006**; 84:64-69.
249. **Brockmüller J, Reum T, Bauer S, Kerb R, Hübner WD, Roots I.** Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*,**1997**;30:94-101.
250. **Schempp C, Winghofer B, Langheinrich M, Schopt E, Simon JC.** Hypericin levels in human serum and interstitial skin blister fluid after oral single-dose and steady-state administration of *Hypericum perforatum* extract (st. John's wort). *Skin pharmacol. App. Skin Physiol*,**1999**; 12:299-304.
251. **Pitisuttithum P, Migasena S, Suntharasamai P.** International Conference on AIDS,**1996**; 11(1):285. Cited by Mills & Bone 2000.
252. **Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, Crumpacker C, Biebs L, Stein DS, Meehan P, Hussey S, Forcht J.** Phase 1 studies of hypericin the active compound in St. John's wort as an antiretroviral agent in HIV-influenced adults. *Ann. Intern. Med.*,**1999**; 130:510-514.
253. **Schempp CM, Ludtke R, Winghofer B, Simon JC.** Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's Wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. *Photodermatol, Photoimmunol, photomed.*,**2000**; 16:125-128.
254. **Kasper S.** Treatment of seasonal affective disorder (SAD) with hypericum extract. *Pharmacopsychiatry*,**1997**;30(suppl):89-93.
255. **Wheatley D.** Hypericum in seasonal affective disorder (SAD). *Curr. Med. Res. Opin.*,**1999**; 15:33-37.
256. **Mueller BM.** Effect of hypericum extract HYP811 in patients with psychovegetative disorders. *Adv. Ther.*,**1998**; 15:255-260.
257. **Volz HP, Murck H, Kasper S, Meller HJ.** St. John's wort extract (LI 160) in somatoform disorders: result of placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*,**2002**; 164:294-300.
258. **Overstreet DH, Keung WM, Rezvani AH, et al.** Herbal remedies for alcoholism: promises and possible pitfalls. *Alcohol Clin Exp Res*,**2003**; 27:177-185.

259. **Moretti ME, Maxson A, Hanna F, Koren G.** Evaluating the safety of St. John's wort in human pregnancy. *Reproductive Toxicology*,**2009**; 28:96-99.
260. **Yu PH.** Effect of *Hypericum perforatum* on serotonin turnover in the mouse brain. *Pharmacopsychiatry*,**2000**; 33:60-65.
261. **Chrubasik-Hausmann S, Vlachojannis J, McLachlan AJ.** Understanding drug interactions with St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Impact of hyperforin content. *Pharmacy and Pharmacology*,**2018**; doi:10.1111/jphp.12858
262. **Obach RS.** Inhibition human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,**2000**; 294:88-95.
263. **Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Sing CJ, Wilson TM, Collins JL, Kliewer SA.** St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of pregnane X receptor. *Proc. Natl Acad. Sci.*,**2000**; 97:7500-7502.
264. **Annon.** CSM advice on St. John's Wort. *Phrm J.*,**2000**; 264:25.
265. **Breckenridge A.** Important interactions between st. John's wort (*Hypericum perforatum*) preparations and prescribed medicines, **2000**. (electronic Journal)Erişim: <http://www.open.gov.uk>
266. **Isacchi B, Bergnozi MC, Van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR.** Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed. Anal.*,**2007**; 45(5):756-761.
267. **Ishii Y.** Smoking and Respiratory Diseases. *Nihon Rinsho*,**2013**; 71(3): 416-420.
268. **Bhisey RA.** Chemistry and Toxicology of smokeless tobacco. *Indian J Cancer*,**2012**; 49(4):367-372.
269. **Gibbons DL, Byers AL, Kurie JM.** Smoking, p53 mutation, and lung cancer. *Mol Cancer Res.*,**2014**; 12(1):1-13.
270. **Hecht SS.** Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int. J. Cancer*,**2012**; 131(12):2724-2732.
271. **Smith CJ, Pertetti TA, King JA.** Perspective on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal. Toxicol.*,**2006**; 18:(667-677)
272. **Ekpu VU, Brown AK.** The Economic Impact of smoking and of reducing smoking prevalence: review of evidence. *Tob Use Insights*,**2015**; 8:1-35.
273. **Fedewa SA, Sauer AG, Siegle RL, Jemal A.** Prevalence of major risk factors and use of screening test for cancer in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*,**2015**; 24(4):637-52.
274. **Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joo GF, Brusselle GG.** Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *BioMed Central*,**2006**; 7:53.
275. **Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A.** Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest*,**2004**; 125:626-632.
276. **Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN.** Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J*,**2005**; 25:447-454.
277. **Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M.** Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*,**2000**; 117:684-694.

278. **Majo J, Ghezzi H, Cosio MG.** Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*,**2001**; 17:946-953.
279. **Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM.** Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J*, **2005**; 25:250-258.
280. **Liu YH, Liu GH, Mei JJ, Wang J.** The preventive effect of hyperoside on lung cancer in vitro by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through caspase-3- and p53 signaling pathway. *Biomedicine and pharmacotherapy*,**2016**; 83:381-391.
281. **Aoshi K, Yokohori N, Nagai A.** Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol*,**2003**; 28:555-562.
282. **Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC.** Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*,**2003**; 29:88-97.
283. **Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF.** Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*,**2000**; 106:1311-1319.
284. **Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S.** Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*,**2004**, 114:1248-1259.
285. **Hammer KD, Birt DF.** Evidence for contribution of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of *Hypericum perforatum*. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*,**2014**; 54(6):781-9.
286. **Kisalari Z, Baluchnejadmojarad T, Roghani M.** *Hypericum perforatum* hydroalcoholic extract mitigates motor dysfunction and is neuroprotective in intrastriatal 6-hydroxydopamine Rat model of Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol.*,**2016**; 36(4): 521-30.
287. **Dante G, Neri I, Facchinetti F.** Herbal therapies in pregnancy: What Works? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*,**2014**; 26(2):83-91.

## ÖZGEÇMİŞ

13.09.1984 yılında Mersin' de doğdu. İlkokulu Aliye Pozcu İlkokulu' nda, ortaokulu Bahçelievler Ortaokulu' nda ve lise eğitimini de Yusuf Kalkavan Anadolu Lisesi'nde adı geçen şehirde tamamlamıştır. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden birincilikle mezun olmuştur. Yine aynı üniversite bünyesinde Farmakognozi Anabilim Dalı'nda 2006-2009 yılları arasında yüksek lisansını tamamlamıştır. 2012 yılından itibaren Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı' nda doktora eğitimine başlamıştır. 2006 yılında mezun olduktan sonra eczacı ünvanıyla soyadını taşıyan Silahtaroğlu Eczanesi adlı işletmesini hayata geçirerek serbest eczacılığa başlamış olup aynı yerde görevine devam etmektedir. İyi derecede İngilizce ve orta derecede İspanyolca bilmektedir.