



ETANOL UYARIMLI SIÇAN AKUT MİDE MUKOZA HASAR MODELİNDE HYPERİCUM PERFORATUM'UN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF HYPERICUM PERFORATUM ON ETHANOL- INDUCED ACUTE GASTRIC MUCOSAL INJURY IN RATS

İhsan KARABOĞA¹, Ayşe Handan DÖKMECİ¹, Mehmet Akif OVALI², Ahsen YILMAZ³

¹ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Tekirdağ, Türkiye.

² Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD, Çanakkale, Türkiye

³ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Tekirdağ, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışma sıçanlarda absölu alkol ile oluşturulan gastrik ülserde H. perforatum'un antiapoptotik ve antiinflamatuar etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrılmıştır. Grup I (Kontrol, n=10), Grup II (Etanol, n=10, 1 ml etanol, oral, 90 dk), Grup III (H. perforatum+etanol, n=10, 1 ml H.perforatum, 120 dk; 1 ml etanol, 120 dk, oral), Grup IV (Zeytinyağı+etanol, 1 ml zeytinyağı, 120 dk; 1 ml etanol, 120 dk, oral). Gastrik ülser skoru mide mukozasında ülserasyon alanlarının ölçülmesiyle hesaplandı. Gastrik dokuda histopatolojik boyamalar, immunohistokimyasal İNOS ve PCNA boyaması, TUNEL boyaması, IL-6 ve IL-10 ifadeleri (ELISA) ve MDA, SOD ve CAT enzim seviyeleri değerlendirildi..

Bulgular: Etanol uyarımlı gastrik hasar modelinde yüksek ülser indeksi ve artmış IL-6, iNOS, TUNEL ve MDA seviyeleri tespit edildi (p<0.05). H. perforatum ve Zeytinyağı ile ön tedavi yapılmış gruplarda gastrik lezyonların etanol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak H. perforatum ve zeytinyağı gastrik mukozal ülserasyon riskini azaltmak için potansiyel bir tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar Kelimeler: Gastrik ülser, Hypericum perforatum, iNOS, PCNA, TUNEL, İnterlökin-6, İnterlökin-10

Abstract

Aim: This study was conducted to evaluate the antiapoptotic and antiinflammatory effect of Hypericum perforatum in the rats induced gastric ulcer by absolute ethanol..

Material and Methods: Forty male Wistar albino rats were used in this study. Rats were divided four group, randomly. Group I (Control, n=10), Group II (Ethanol, n=10, 1 ml ethanol, orally, 90 min) Group III (H. perforatum + ethanol, 1 ml H. perforatum, 120 min; 1 ml ethanol, 90 min, orally), Group IV (Olive oil + ethanol, 1 ml olive oil, 120 min; 1 ml ethanol, 90 min, orally). Gastric ulcer score was determined in gastric mucosa by morphometrically. Histopathological staining, Immunohistochemical iNOS and PCNA staining, apoptotic TUNEL staining, gastric IL-10 and IL-6 expression (ELISA) and SOD, MDA, CAT levels were assessed in gastric tissue.

Results: Elevated ulcer index and increased IL-6, iNOS, TUNEL and MDA levels were detected in the ethanol-induced gastric injury model (grup II). Pre-treatment of H. perforatum and olive oil significantly attenuated the gastric lesions as compared to the group II .

Conclusion: It was concluded that H. perforatum and olive oil may represents a potential therapeutic option to reduce the risk of gastric mucosal ulceration.

Key Words: Gastric ulcer, Hypericum perforatum, iNOS, TUNEL, Interleukin-6, Interleukin-10

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Öğr. Gör. Dr. İhsan KARABOĞA
Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Tekirdağ, Türkiye,
E-posta: ihsankaraboga@gmail.com,
Tel: 0282 250 3121

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 12.09.2017
Date Accepted / Kabul Tarihi: 02.11.2017

Namık Kemal Tıp Dergisi 2017; 5(3): 99 - 108

GİRİŞ

Peptik ülser insan toplumlarında yaklaşık % 5-10 oranında görülen yaygın bir gastrointestinal sistem hastalığıdır¹. Peptik ülserin önemli etiyojik faktörleri arasında *H. pylori* infeksiyonu, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID)'in aşırı kullanımı, alkol tüketimi, sigara kullanımı, fizyolojik ve fizyososyolojik stres bulunmaktadır. Özellikle alkol tüketimi ve NSAID ilaçların kullanımı üst gastrointestinal sistem kanamaları riskini artırmaktadır².

Gastrik ülserler genellikle gastrik mukozal koruyucu faktörler ile mukozanın maruz kaldığı aşındırıcı, agresif faktörler arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Agresif faktörler içerisinde gastrik hidroklorik asit (HCl) salgısı, Reaktif oksijen radikalleri (ROS), mukozal hipoperfüzyon ve alkol tüketimi sayılabilir³. Bunlar içerisinde alkol tüketimi gastrik ülser oluşumuna katkı sağlayan en önemli faktördür ve aşırı alkol tüketimi gastrik mukozal hasar riskini yükseltmektedir⁴. Bundan dolayı etanol uyarımlı gastrik mukoza hasar modelleri, insan gastrik ülserine sebep olan faktörler ve anti-ülser aktivitesine sahip maddelerin incelenmesinde sıkça kullanılmaktadır⁵.

Hypericum perforatum ülkemizde lokal olarak kantaron; İngilizce "St. John's Worth" adıyla bilinmektedir. Hypericaceae familyası Asya, Kuzey Afrika, Avrupa ve Amerika kıtasında yetişebilmektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 80 tür bulunmaktadır⁶. *H.perforatum*, ekstraktı bol miktarda flavonoid ve fenolik asit bulunduran önemli bir farmasötik bitkidir⁷. Literatür incelendiğinde depresyon, yara iyileşmesi, menapozal rahatsızlıklar, yanık tedavisi, baş ağrısı gibi birçok rahatsızlıkta iyileştirici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir^{8,9}.

Sevcovicova ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, *H.perforatum*'da bol miktarda bulunan Hyperforin'in DNA koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir¹⁰. Birçok deneysel model üzerinde yapılan çalışmalarda araştırmacılar *H.perforatum*'un antiinflamatuvar ve serbest radikal temizleyici özelliğini bildirmişlerdir^{8, 11, 12}.

Çalışmamızda, önceki çalışmalarda anti-inflamatuar, serbest radikal temizleyici, DNA koruyucu gibi birçok özelliği rapor edilen *H. perforatum*'un etanol ile oluşturulan akut gastrik mukoza hasarındaki tedavi etkinliğinin, histopatolojik, biyokimyasal, apoptotik yöntemlerle ayrıntılı olarak incelemesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney modeli, Makroskopik ve Mikroskopik İnceleme

Proje çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için gerekli etik kurul izni Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır (HADYEK onay tarihi ve no; 27.06.2016-2016/06-01). Çalışmanın deneysel aşaması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (CÖMÜDAM)' da gerçekleştirildi. Çalışmamızda standart laboratuvar koşullarında (22±1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, erişkin toplamda 40 adet *Wistar albino* erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Deneklerin gruplandırılması aşağıdaki şekilde planlandı; Grup I (Kontrol grubu, n: 10), Grup II (Etanol grubu, n: 10), Grup III (*H. perforatum* + etanol grubu, n: 10), Grup IV (Zeytin yağı + etanol grubu, n: 10). Çalışmamızda tedavi etkinliği incelenen *H.perforatum* soğuk sıkma zeytinyağından geleneksel olarak elde edilen

ekstraktır. Zeytinyağı+etanol grubuna *H.perforatum* ekstraktı eldesinde kullanılan zeytinyağı kullanılmıştır.

Deney prosedürünün başlatılması ile hayvanlar 24 saat aç bırakıldı (içme suyu tüm gruplarda serbest olacak şekilde). Süre sonunda deney gruplarına aşağıda belirtilen uygulamalar yapılarak protokol gerçekleştirildi.

Grup I hayvanları 24 saat açlığın sonunda sakrifiye edilerek mide alındı. Grup II' ye 24 saat açlığın ardından 1 ml/sıçan dozunda absö etanol (>%99,5) oral gavaj kullanılarak verildi ve 90 dk bekletildikten sonra mide alındı. Grup III' e 24 saat açlığı takiben oral gavaj kullanılarak 1 ml/sıçan dozunda *H. perforatum* ekstraktı uygulandı. 120 dk beklendikten sonra 1 ml/sıçan dozunda absö etanol (>%99,5) uygulaması yapıldı ve 90 dk sonra mide dokusu alındı. Grup IV' e 24 saat açlığı takiben 1 ml/sıçan dozunda zeytinyağı uygulandı. 120 dk beklendikten sonra 1 ml/sıçan dozunda absö etanol (>%99,5) uygulaması yapıldı ve 90 dk sonra mide dokusu alındı.

Deney sonunda ketamin-ksilazin (90-10 mg/kg) anestezisi altındaki hayvanlar, kalpten kan alınarak sakrifiye edildi. Elde edilen mide dokusu serum fizyolojik ile yıkanarak makroskopik incelemesi yapıldı ve ülser skorları hesaplandı. Makroskopik gastrik ülser skorunun hesaplanmasında Özbakış-Dengiz ve ark.'nin kullandığı yöntem kullanıldı¹³. Ülser indeksi= ülserli alan(mm²) /toplam mide yüzeyi alanı (mm²) x 100 olarak hesaplandı. Ülser skoru hesaplanan mide dokuları % 4'lük nötral formaldehit ile fikse edildi ve rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömölüp bloklar elde edildi. Mikrotom yardımıyla alınan 5 µm' lik kesitler makroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı.

İmmünohistokimyasal ve TUNEL Boyama

Kesitlere indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve Prolifere hücre nükleer antijeni (PNCA) immünohistokimyasal boyaması da yapıldı. Streptavidin-peroksidaz yöntemi kullanılarak yapılan boyamalarda primer antikor olarak iNOS (iNOS, Abcam, ab15323) PCNA (Novus Biologicals, PC10) nemli inkübasyon kabında 1 saat süre ile 1:100 dilüsyonda uygulandı. İmmünohistokimyasal işaretlemelerde kromojen olarak AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) ve zıt boyama amacıyla Mayers hematoksilen kullanıldı.

Ayrıca mukoza yüzeyini örten mide epitelinde ülserasyon sonucu meydana gelebilecek apoptozis TUNEL (TdT-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling) metodu kullanılarak gösterildi¹⁴.

İmmünohistokimyasal ve TUNEL boyama sonuçlarından elde edilen doku mikrofotografaları kamera ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus CX40) ve görüntü analiz programı (Kameram Gen II, Argenit, İstanbul) kullanılarak değerlendirildi. (40X objektif ile çekilen fotoğraflarda pozitif hücre sayıları belirlendi ve bu sayı mm²'ye dönüştürüldü).

ELISA ölçümleri

Mide dokusu IL-6 (CLOUD-CLONE CORP, CCC, USA, SEA079Ra) ve IL-10 (CLOUD-CLONE CORP, CCC, USA, SEA056Ra) seviyeleri sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı.

Biyokimyasal Ölçümler

MDA tayini; Lipit peroksidayon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley (1990)'in çift kaynatmalı tiyobarbiturik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü¹⁵.

SOD tayini; Süperoksit anyon radikallerinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksit katalize

eden SOD enziminin tayini Durak ve ark.'nın tariflediği modifikasyona göre tayin metodu olan ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirilmesi esasına göre ölçüldü ¹⁶.

CAT tayini; Toksik hidrojen peroksitin hücrelerden uzaklaştırılmasını sağlayan CAT enziminin aktivitesi Aebi (1974)' ün metodu ile belirlendi ¹⁷.

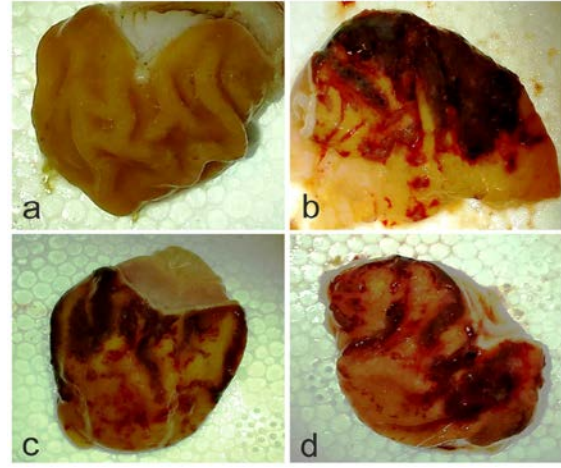
İstatistiksel Analiz

Sayısal değerler SPSS (SPSS 18.0, PASW Statistics 18) programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama standart sapma değerleriyle ifade edildi. 4 gruba ait sayısal parametreler non-parametrik test (Kruskal-Wallis) kullanılarak değerlendirildi. İki yönlü karşılaştırma yapılan gruplarda elde edilen değerlerin anlamlılığı Mann-Whitney U-testi ile ölçüldü. Gruplar arasındaki fark 0.05'ten daha az olduğu durumda anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Makroskopik Gastrik Ülser Skoru Bulguları

Kontrol grubu hayvanların mide mukozası normal görünümdeydi. Etanol grubuna ait mide dokusunda ödemli, hiperemik ve ülserli alanların artması dikkat çekiciydi. Zeytinyağı+etanol grubu ve *H. perforatum*+Etanol grubu, etanol grubuna kıyasla daha az hiperemik ve ülserli alan içermekteydi (Şekil 1). Makroskopik gastrik ülser skorları kıyaslandığında; Zeytinyağı+Etanol (%3.5±2.5) ve *H. perforatum*+Etanol (%21±2.8) grubu, Etanol grubuna (%42±2.9) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük skor puanına sahipti (p <0.05, Tablo 1).



Şekil 1. Gruplara ait mide mukozalarının makroskopik görünümüleri a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı + etanol, d; *H.perforatum* + etanol

Tablo 1. Gruplara ait gastrik ülser skorları (%)

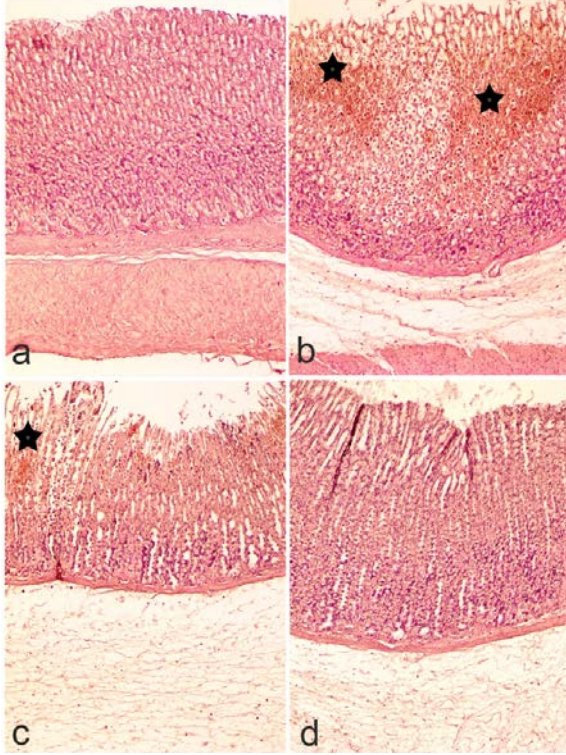
Gruplar	Ülser skoru (%)
Kontrol	0
Etanol	42±2.9 ^a
Zeytinyağı+etanol	31.5±2.5 ^b
<i>H.perforatum</i> +etanol	21±2.8 ^{b,c}

(a; p<0.05, kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.05, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; p<0.05, Zeytinyağı+etanol grubu ile kıyaslandığında)

Mikroskopik Bulgular

H&E ile boyanmış mide kesitleri incelendiğinde, kontrol grubu mide dokularının yapısı normal olarak izlenmiştir. Gastrik çukurcuklar, mide bezleri, lamina propria, submukoza ve muskularis eksterna normal histolojik yapı göstermektedir (Şekil 2a). Etanol grubu mide dokuları incelendiğinde mukozada gastrik çukurcukları ve yer yer mide bezlerini de içine alacak şekilde hiperemik alanlar izlenmiştir. Bu alanlarda mukozayı örten epitelin dejenere olduğu ve çok sayıda hücrenin nükleuslarının piknotikleştiği izlendi. Mukoza ile beraber submukozada ödemin sebep olduğu kalınlaşma izlenmiştir (Şekil 2b). Zeytinyağı+etanol grubu midelerin histolojik yapısına bakıldığında kanama alanlarının varlığının devam ettiği fakat etanol grubuna nazaran histopatolojik bulguların azaldığı izlenmiştir (Şekil 2c). *H. perforatum*+etanol

grubu midelerin mukozasında kanama alanlarının çok az olduğu, histopatolojik bulguların etanol ve Zeytinyağı+etanol grubuna kıyasla daha seyrek izlendiği görüldü. Mukoza histolojik yapısı kontrol grubu mide mukozasına benzerdi (Şekil 2d).



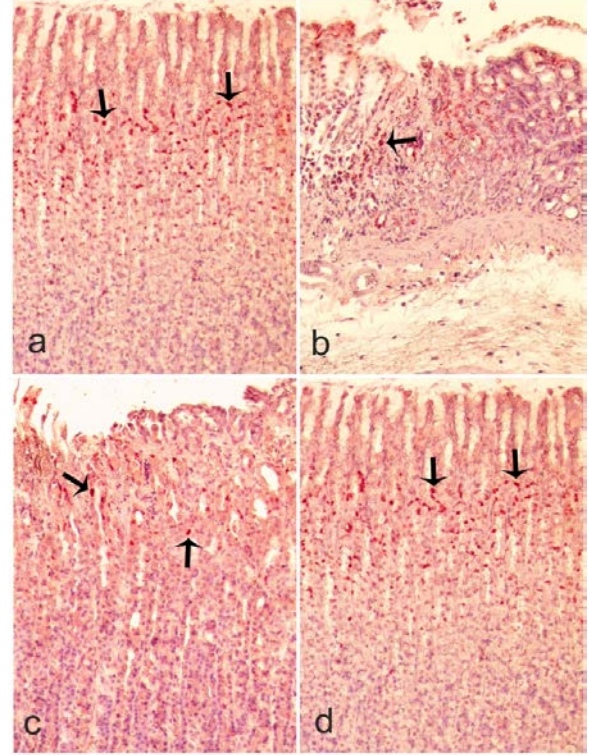
Şekil 2. Mide dokularına ait histolojik görünüm. a; Kontrol grubu, b; Etanol grubu, c; Zeytinyağı+etanol grubu, d; *H. perforatum*+etanol grubu (Büyütme; 100X, Yıldız; kanama alanları, H&E)

İmmünohistokimyasal Bulgular

Anti-PCNA Boyama Bulguları

Anti-PCNA ile immünohistokimyasal olarak işaretlenen mide dokuları incelendiğinde özellikle mide bezlerinin boyun kısımlarında, mide bezlerinin kök hücre nişinin bulunduğu isthmus bölgesinde pozitif boyanan hücrelerin daha yoğun yerleştiği görüldü (Şekil 3). Birim alandaki (mm^2) pozitif hücre sayıları incelendiğinde; kontrol grubu (138.8 ± 9.2) ile kıyaslandığında etanol grubunda (35.6 ± 4.3) Anti-PCNA (+) hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu

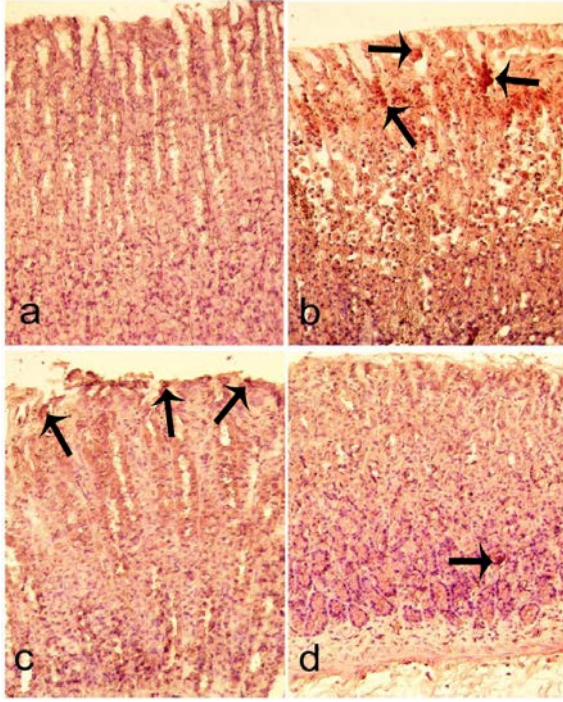
görülmüştür ($p < 0.05$) Zeytinyağı+etanol (58.5 ± 9.2) ve *H. perforatum*+etanol grubunda (94.2 ± 8.5), Etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$).



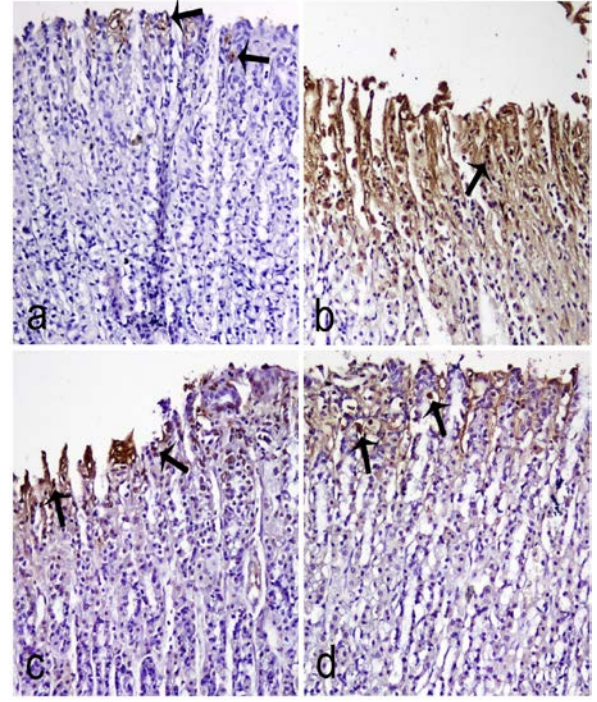
Şekil 3. Anti-PCNA boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+etanol, d; *H. perforatum* +etanol (Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Büyütme; 200X)

Anti-iNOS Boyama Bulguları

Kontrol grubu sıçanların mide mukozasında iNOS aktivitesi çok zayıf izlenirken, Etanol grubunda hemen hemen mukozanın tamamına yayılan bir aktivite izlendi (Şekil 4-b). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum* +etanol gruplarında ise H&E boyama bulgularıyla uyumlu olarak normal histolojik yapının daha hakim olduğu mukozada iNOS aktivitesinde belirgin bir azalma izlendi (Şekil 4c-d).



Şekil 4. Anti-iNOS boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+etanol, d; *H. perforatum*+etanol, Mayer's Hematoksilen zit boyama, Büyütme; 200X, oklar; iNOS(+) boyanan hücreler)



Şekil 5. TUNEL boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+etanol, d; *H. perforatum*+etanol, (Mayer's Hematoksilen zit boyama, Ok; TUNEL (+) hücre, Büyütme; 200X)

Kontrol grubu (1.5 ± 0.8) ile kıyaslandığında etanol grubunda (25.7 ± 3.4) iNOS aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Zeytinyağı+etanol (16 ± 2.4) ve *H. perforatum*+etanol grubunda (9.4 ± 1.7), Etanol grubuna (25.7 ± 3.4) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$).

TUNEL Boyama Bulguları

Birim alandaki (mm^2) TUNEL(+) hücre sayıları değerlendirildiğinde, Etanol grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol gruplarında ise Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). (Kontrol; 1.4 ± 0.6 , Etanol; 59.1 ± 5.7 , Zeytinyağı+etanol; 37 ± 4.6 , *H. perforatum*+etanol; 17.7 ± 5.5). Gruplara ait boyama bulguları Şekil 5' te izlenmektedir.

ELISA Bulguları

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Etanol grubunda IL-6 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış göstermiştir ($p < 0.05$). Zeytinyağı+etanol grubunda IL-6 seviyesi, Etanol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. ($p < 0.05$). *H. perforatum* grubu Etanol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterirken ($p < 0.05$) Zeytinyağı+etanol grubuna kıyasla daha düşük IL-6 seviyesine sahip olmasına karşın aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p = 0.52$). (Kontrol; 90.36 ± 7.3 , Etanol; 142.98 ± 9.7 , Zeytinyağı+etanol; 109.98 ± 13.5 , *H. perforatum*+etanol; 104.51 ± 9.7)

Antiinflamatuvar IL-10 doku düzeyleri incelendiğinde Etanol grubunda, Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0.001$). Zeytinyağı+etanol grubu ile Etanol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.09$). *H. perforatum* ve etanol grubu arasında istatistiksel olarak

anlamli bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol grupları arasında anlamli bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.89$, IL-10 doku seviyeleri (pg/ml):Kontrol;159.1±48.2, Etanol;86.76±14.8, Zeytinyağı + etanol;107.2±42.4 *H. Perforatum* + etanol;118.5±38.2).

Biyokimyasal Bulgular

Mide dokusu MDA seviyeleri incelendiğinde Etanol grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol grubunda, Etanol grubuna kıyasla anlamli bir azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). *H. perforatum* + etanol ve Zeytinyağı+etanol grupları arasında anlamli bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.89$). (Mide dokusu MDA seviyeleri: Kontrol; 0.04±0.2, Etanol; 0.17±0.0, Zeytinyağı + etanol ; 0.08±0.02, *H. Perforatum* + etanol; 0.07±0.1) Katalaz aktivitesinin gruplardaki dağılımı incelendiğinde; Etanol grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamli bir azalma görülmüştür ($p<0.05$). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol grupları arasında anlamli bir farklılık olmamakla ($p=0.481$) birlikte her iki grupta da etanol grubuna kıyasla anlamli bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$, CAT seviyeleri: Kontrol 17.46±5.9, Etanol; 9.14±1.7, Zeytinyağı + etanol; 13.97±2.8, *H. Perforatum* + etanol; 16.48±3.4).

SOD aktivitesi yönünden gruplar incelendiğinde; Etanol grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamli derecede bir azalma izlenmiştir ($p<0.05$). Zeytinyağı uygulaması SOD enzim aktivitesini artırsa da, Etanol grubuna kıyasla bu artış anlamli bulunmamıştır ($p=0.481$). *H. Perforatum* + etanol grubunda SOD aktivitesi Etanol grubuna kıyasla anlamli derece artış göstermiştir ($p<0.05$, SOD seviyeleri: Kontrol 0.28±0.009, Etanol; 0.15±0.008, Zeytinyağı +

etanol; 0.18±0.06, *H. Perforatum* + etanol; 0.23±0.02)

TARTIŞMA

Sunulan bu çalışmada etanol uyarımlı akut gastrik ülser modelinde, zeytinyağı ve Türk geleneksel halk tıbbında yoğun olarak ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan kantaron yağının koruyucu etkileri farklı yöntemlerle belirlendi. Geleneksel yöntemlerle üretilen Kantaron yağı, zeytinyağı içerisine atılan *H. perforatum* çiçeklerinin dört hafta boyunca güneş gören bir yerde cam kavanozlar içerisinde bekletilmesiyle elde edilmektedir¹⁸. Bu karışım belirtilen süre sonunda süzülerek kullanılmaktadır. Kantaron yağının bilinen faydalı etkilerinde içinde bulunduğu zeytinyağının da rolü olması muhtemeldir. Bu sebeple, bu çalışmada oluşturulan IV. grupta sadece zeytinyağı kullanılmış ve zeytinyağının olası mide koruyucu etkisi de yorumlanmıştır. Bu çalışmada mide ülseri oluşumunda absölu etanol (>%99,5) kullanılmıştır. Peptik ülser ve anti-ülser aktivitesi konulu çalışmalar incelendiğinde etanol, aspirin, indomethacin gibi ajanların kullanıldığı görülmektedir^{5, 19, 20}. Deney protokolü sonunda sakrifiye edilen sıçanların mide dokularının makroskopik inceleme sonuçları değerlendirildiğinde; Etanol grubunda farklı araştırmacıların bulgularıyla benzer olarak gastrik ülser indeksinde belirgin bir artış olduğu gözlemlendi^{21, 22}. Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol gruplarında ülser indeksinin Etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamli derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Bu çalışmayla uyumlu olarak, Odabaşoğlu ve ark. zeytinyağının indomethacin uyarımlı gastrik ülser modelinde gastrik ülser indeksini düşürdüğü göstermişlerdir²³. *H. perforatum*'un daha önce gastrik ülser üzerinde tedavi

etkinliklerinin incelendiği iki deneysel çalışmada çalışmamızla benzer şekilde ülser indeksinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir^{18,20}.

Yapılan histopatolojik incelemelerde etanol grubu sıçanların mide mukozasında mukozal erozyon, kanama, vasküler konjesyonlar ile hem mukoza hem de submukozada ödem oluşumu izlenmiştir. Etanol ile indüklenen farklı çalışmalar incelendiğinde benzer bulgulara ulaşıldığı görülmektedir^{5,8}. Zeytinyağı ve *H. perforatum* uygulamasının, belirlenen bu histopatolojik değişiklikleri azalttığı çalışmamızda belirtilmiştir. Zeytinyağı ve *H. Perforatum*'un deneysel ülser modellerinde kullanıldığı diğer çalışmalarda histopatolojik bulguların yer almadığı görülmüştür^{20,24,25}.

Çalışmamızda mide dokusu PCNA ve İNOS antikorları ile indirek immünohistokimyasal metotla işaretlenmiştir. Etanol grubu mide mukozasında PCNA(+) hücre sayısı anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Bu bulgularla uyumlu olarak literatürde gastrik ülser modeli oluşturulan çalışmalarda ülserli mide mukozalarındaki PNCA aktivasyonunda düşüş olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur^{24,26,27}. Bu deneysel çalışmalarda, bizim çalışmamızda uyumlu olarak, gastrik mukoza hasarını engelleyen ajanlar PCNA aktivitesini yükseltmiştir.

Sunulan bu çalışmada, anti-iNOS immünreaktivite sonuçları incelendiğinde etanol grubunda yüksek (25.7 ± 3.4) bulunan oran, Zeytinyağı (16.0 ± 2.4) ve *H. perforatum* (9.4 ± 1.7) grubunda istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.05$). Çalışmamızla benzer olarak Odabaşoğlu ve ark.'ları indometasin ile oluşturulan gastrik ülser modelinde İNOS aktivitesinin yükseldiğini göstermişlerdir²⁸. Gastrik ülser patogenezinde mukozaya nötrofil

infiltrasyonu kritik bir prostestir ve İNOS aktivitesi çeşitli gastrik mukozal hasarlarda bir belirteç olarak kullanılmaktadır^{2,26}. Bu açıdan zeytinyağı ve *H. perforatum*'un İNOS sentezini baskılayarak mukozaya nötrofil infiltrasyonunu azaltmak yoluyla mukozal yapının korunmasına imkan sağladığı söylenebilir.

İnterlökinler mukozal bariyerin düzenlenmesinde hayati öneme sahip sitokinlerdir⁵. Gastrik ülserde mukozal pro-inflamatuar IL-6 seviyesi artarken, anti-inflamatuar IL-10 seviyesinde düşüş meydana gelir²⁹. Çalışmamızda ELISA yöntemiyle mide dokusunda seviyesi belirlenen IL-6 seviyesi literatürle uyumlu olarak etanol grubunda artış gösterirken, Zeytinyağı ve *H. perforatum* grubunda istatistiksel olarak anlamlı derece bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). Mukozal bariyerin devamlılığı için anti ve pro-inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin korunması elzemdir²⁹. Zeytinyağı ve *H. perforatum*'un proinflamatuar IL-6 seviyesini azaltırken, anti-inflamatuar IL-10 seviyesini artırarak ülser oluşumunu azalttığı söylenebilir.

Etanol uyarımlı gastrik mukozal hasarın artmış ROS seviyesi ile yakın ilişkili olduğu ve artan ROS' un temel kaynağının aktive nötrofiller olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur⁵. Artan ROS seviyesini baskılayabilmek amacıyla organizmada SOD, GSH, GSH-Px gibi enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir^{5,30}. Etanol uygulaması gastrik mukozada lipit peroksidasyonunu artırırken, CAT, GSH ve mukozadaki diğer koruyucu faktörleri azaltır³¹. Literatür ile uyumlu olarak etanol grubunda SOD ve CAT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun son ürünüdür ve gastrik mukozada lipit peroksidasyonunun

göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır^{32,33}, Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak sadece etanol uygulanan grupta MDA seviyesi anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Zeytinyağı+etanol ve *H. perforatum*+etanol gruplarında MDA seviyesindeki azalma diğer bulgularla birlikte lipid peroksidasyonunun azaldığını göstermektedir ($p<0.05$).

Elde edilen bu verilen *H. perforatum* ve Zeytinyağı ön tedavisinin etanol uyarımlı ülser modelinde proinflatuar sitokin IL-6' nın baskılanması ve antiinflatuar IL-10' un sentezlenmesinde artış sağlaması ve oksidatif stresi azaltmak yoluyla mukozal lezyonların azalmasını sağladığını göstermektedir. Bu ajanlar Gastrik ülserde mukozal hasarın hafifletilmesinde kullanılabilir. Gastrik ülser patogenezi ve bu ajanların tedavi etkinlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜRLER

Finansal desteğinden dolayı Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine teşekkür ederiz (NKUBAP.23.DS.16.055).

Bu çalışma "3rd International Conference on Engineering and Natural Sciences (ICENS 2017)" de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani K, et al. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology and Therapeutics*. 2003;98(1):109-27.
- Behrman SW. Management of complicated peptic ulcer disease. *Archives of surgery*. 2005;140(2):201-8.
- Ham M, Kaunitz JD. Gastrointestinal defense. *Current opinion in gastroenterology*. 2007;23(6):607-16.
- Franke A, Teyssen S, Singer MV. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Digestive Diseases*. 2006;23(3-4):204-13.
- Liu Y, Tian X, Gou L, Fu X, Li S, Lan N, et al. Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2012;34(2):280-7.
- Öztürk Y, Aydın S, Başer K, Kirimer N, Kurtar, Öztürk N. Hepatoprotective activity of *Hypericum perforatum* L. alcoholic extract in rodents. *Phytotherapy Research*. 1992;6(1):44-6.
- Bayramoglu G, Bayramoglu A, Engur S, Senturk H, Ozturk N, Colak S. The hepatoprotective effects of *Hypericum perforatum* L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Cytotechnology*. 2014;66(3):443-8.
- Kıyan S, Uyanıkgil Y, Altuncı YA, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil EÖÇ, 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. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2015;21(5):323-36.
- Linde K, Berner MM, Kriston L. St John's wort for major depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008; 4: CD000448
- Ševčovičová A, Šemeláková M, Pišiková J, Loderer D, Imreová P, Gálová E, et al. DNA-protective activities of hyperforin and aristoforin. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(3):631-7.
- Castro FC, Magre A, Cherpinski R, Zelante PM, Neves LM, Esquisatto MA, et al. Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in Wistar rats. *Homeopathy*. 2012;101(3):147-53.
- Ocak T, Duran A, Özyalvaçlı G, Ocak Z, Terzi EH, Tosun M, et al. Protective effects of montelukast and *Hypericum perforatum* against intestinal ischemia-reperfusion injury in hamsters. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2014;44(3):381-6.
- Özbakiş-Dengiz G, Hekimoğlu A, Kandemir N, Kurcer Z. Effects of statins in an indomethacin-induced gastric injury model in rats. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2012;23(5):456-62.
- Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arıkan S, Ersan I, et al. Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
- Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology* 1990;186:421-31.
- Durak I, Yurtarlan Z, Canbolat O, Akyol Ö. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue

- tetrazolium (NBT) reduction. *Clinica Chimica Acta*. 1993;214(1):103-4.
17. Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer, H.U., Ed., *Methods of Enzymatic Analysis* Verlag Chemie/Academic Press Inc., Weinheim/NewYork, 1974; 673-680.
18. Yesilada E, Gurbuz I. Evaluation of the antiulcerogenic effect of the flowering herbs of *Hypericum perforatum* L. *Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 1998;15(2):77-84.
19. Holzer P, Pabst M, Lippe IT. Intra-gastric capsaicin protects against aspirin-induced lesion formation and bleeding in the rat gastric mucosa. *Gastroenterology*. 1989;96(6):1425-33.
20. Turan MI, Bilen H, Demiryılmaz I, Ozgeris FB, Baykal H, Turkoglu M, et al. Effects of *Hypericum perforatum* and *Hippophae rhamnoides* extracts on indomethacin-induced gastric oxidative stress in rats. *Biomedical Research*. 2013;24(3).
21. El-Maraghy SA, Rizk SM, Shahin NN. Gastroprotective effect of crocin in ethanol-induced gastric injury in rats. *Chemico-biological interactions*. 2015;229:26-35.
22. Velázquez-Moyado JA, Martínez-González A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;174:403-9.
23. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Aygun H, Suleyman H, et al. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2008;591(1):300-6.
24. Arsić I, Žugić A, Antić DR, Zdunić G, Dekanski D, Marković G, et al. *Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress-Induced Gastric Lesions. *Molecules*. 2010;15(10):6688-98.
25. Zdunić G, Gođevac D, Milenković M, Vučićević D, Šavikin K, Menković N, et al. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an anti-inflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytotherapy Research*. 2009;23(11):1559-64.
26. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(1):59-65.
27. Yi S-X, Peng Y, Chang X-R, Peng N, Yan J, Lin Y-P. Effect of pre-moxibustion on apoptosis and proliferation of gastric mucosa cells. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(15):2174.
28. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Translational Research*. 1967;70(1):158-69.
29. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine*. 2000;51(1):289-98.
30. Rtibi K, Jabri MA, Selmi S, Souli A, Sebai H, El-Benna J, et al. Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):292.
31. Rozza AL, de Mello Moraes T, Kushima H, Tanimoto A, Marques MOM, Bauab TM, et al. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E 2. *Chemico-biological interactions*. 2011;189(1):82-9.
32. Hui S, Fangyu W. Protective effects of bilobalide against ethanol-induced gastric ulcer in vivo/vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:592-600.
33. Ma L, Liu J. The protective activity of *Conyza blinii* saponin against acute gastric ulcer induced by ethanol. *Journal of ethnopharmacology*. 2014;158:358-63.